



MARIA DA SAÚDE DE OLIVEIRA

**O ENVELHECIMENTO DO PÂNCREAS ENDÓCRINO:
FISIOPATOLOGIA DO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E A
CARACTERIZAÇÃO DA INCRETINOPATIA COM INÍCIO NA
SENECTUDE**

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARIA DA SAÚDE DE OLIVEIRA

**O ENVELHECIMENTO DO PÂNCREAS ENDÓCRINO:
FISIOPATOLOGIA DO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E A
CARACTERIZAÇÃO DA INCRETINOPATIA COM INÍCIO NA
SENECTUDE**

Orientador : Prof. Dr. Bruno Geloneze Neto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MARIA DA SAÚDE DE OLIVEIRA E
ORIENTADO PELO PROF. DR. BRUNO GELONEZE
NETO.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

OL41e Oliveira, Maria Saúde, 1970-
O envelhecimento do pâncreas endócrino :
fisiopatologia de diabetes mellitus tipo 2 e a
caracterização da incretinopatia com início na senectude
/ Maria da Saúde de Oliveira. -- Campinas, SP : [s.n.],
2013.

Orientador : Bruno Geloneze Neto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Incretinas. 2. Diabetes mellitus - Idosos. 3. Técnica
Clamp de glucose. 4. Resistência à insulina. I. Geloneze
Neto, Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The aging of endocrine pancreas : physiopathology of diabetes mellitus type 2 and characterization of incretinopathy starting on senescence

Palavras-chave em inglês:

Incretins

Diabetes type 2 in elderly

Glucose Clamp technique

Insulin resistance

Keyword

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Bruno Geloneze Neto [Orientador]

Wilson Nadruz Júnior

Walmir Ferreira Coutinho

Data da defesa: 22-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

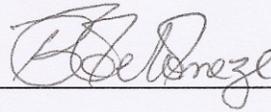
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIA DA SAÚDE DE OLIVEIRA

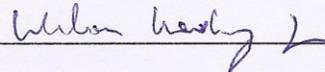
Orientador (a) PROF(A). DR(A). BRUNO GELONEZE NETO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). BRUNO GELONEZE NETO



2. PROF(A). DR(A). WILSON NADRUZ JUNIOR



3. PROF(A). DR(A). WALMIR FERREIRA COUTINHO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de julho de 2013

DEDICATÓRIA

A Deus que nos dá coragem e genialidade para a realização dos nossos sonhos;

Ao meu esposo, Lúcio Magno;

Aos meus pais, Anália e Manoel em memória;

Aos meus irmãos, sobrinhos e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Geloneze pelo o qual sou muito grata pelos seus ensinamentos, além do incentivo e confiança ao longo desses anos de convivência. Um exemplo de incentivo à pesquisa associado a um grande profissionalismo. Muito obrigada!

Ao professor o Dr. José Carlos Pareja pelos ensinamentos científicos e de vida.

Ao professor o Dr. Ricardo Meirelles do Instituto Estadual de Diabetes / PUC- Rio de Janeiro, por fazer parte da minha formação Profissional e humana.

Aos voluntários que participaram deste estudo com dedicação e paciência.

A minha grande amiga, Dra. Ana Carolina Vasques, pela incansável ajuda na elaboração dos testes dinâmicos e análises estatísticas deste trabalho, além da parceria em outros projetos de pesquisa do nosso laboratório LIMED. Obrigada pelos momentos compartilhados, você realmente é parte deste mestrado!

Aos meus queridos amigos endocrinologistas, Fernanda Satake Novaes, Marcelo Oliveira Lima pela parceria no atendimento ambulatorial, sempre com competência, associada a um grande carinho aos nossos pacientes.

À enfermeira Daniela Regiane pela colaboração nos testes dinâmicos realizados, e ao biólogo Antonio Calixto pelo capricho nas análises sérica do nosso laboratório de pesquisa. À Eleonora Comucci, Ana Cláudia e demais amigos da equipe do LIMED (GASTROCENTRO-UNICAMP).

Ao pesquisador Prof. Dr. Lício Velloso do Laboratório de Biologia Molecular da FCM-UNICAMP pela sua grande colaboração científica na pós-graduação.

Agradeço ao meu grande companheiro, Lício Magno pelo constante estímulo e apoio nas minhas decisões, conviver com você é um grande prazer !

Agradeço profundamente aos meus pais por minha formação pessoal e profissional.

E por fim agradeço a MSD , financiadora deste projeto de pesquisa.

“O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é o dicionário”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da patogênese do DM2. Adaptado de DeFronzo e col., 2009.	45
Figura 2: Ações do GLP-1 no corpo humano. Adaptado: Kieffer et al. Endocrine Rev 1999.	49
Figura 3: Fisiopatologia do DM2 no idoso. Adaptado de Scheen AJ. Diabetes Metab. 2005.	57
Figura 4: Relação hiperbólica entre sensibilidade à insulina e secreção de insulina. Adaptado de Kahn e col., 1993.	58
Figura 5: D Diagrama de representação da amostra. TNG = Tolerância normal à glicose; DM2 = diabetes tipo 2.....	70
Figura 6: (a) Medida do diâmetro abdominal sagital; (b) Instrumento caliper abdominal ..	73
Figura 7: Teste de bioimpedância	74
Figura 8: Esquema para as coletas de sangue e suas respectivas dosagens durante o <i>clamp</i> hiperglicêmico.....	77
Figura 9: HOMA-IR dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan.....	86
Figura 10: Taxa de depuração metabólica da glicose dos quatros grupos estudado. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan.....	87
Figura 11: Sensibilidade da insulina à glicose oral (OGIS) dos quatros grupos. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan.....	87
Figura 12: Taxa de infusão de glicose (TIG) durante o teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan	88
Figura 13: Índice de sensibilidade à insulina (ISI) obtido do o teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan	88
Figura 14: Índice insulinogênico (IGI) obtido do teste de refeição padrão dos quarto grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan.....	89
Figura 15: Níveis plasmáticos de insulina durante o teste de refeição padrão nos quatro grupos estudados. Gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva da insulina (AUC _{ins0-180 min}). Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan.	90
Figura 16: Primeira fase de secreção de insulina obtida do teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan	91

Figura 17: Representação da segunda fase de secreção de insulina obtido na última hora do <i>clamp</i> hiperglicêmico. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan	92
Figura 18: Níveis plasmáticos de insulina durante o teste de arginina nos quatro grupos estudados	93
Figura 19: Índice de disposição de primeira fase secreção de insulina obtida do teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico dos quatro grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan	94
Figura 20: Índice de disposição da segunda fase de secreção de insulina obtida do teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico dos quatro grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan	95
Figura 21: Índice de disposição no AIRarg/TIG obtido pelo produto da secreção aguda de insulina do teste de arginina e da taxa de infusão de glicose, obtida do do teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico dos quatro grupos estudados	96
Figura 22: Relação hiperbólica obtida pelo o produto da secreção de insulina pela sensibilidade da insulina entre os grupos estudados. (a) sem ajuste para massa magra (b) após o ajuste para massa magra.	97
Figura 23: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos do glucagon obtida durante o teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva do glucagon nos intervalos de tempo de 0-60 minutos e 0-180 minutos	98
Figura 24: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos da insulina obtida durante o teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Gráfico de barra construído com os valores da área sob a curva da insulina neste mesmo intervalo de tempo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste <i>pos hoc</i> de Duncan.....	99
Figura 25: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos do GIP obtida durante o teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Gráfico de barra construído com os valores da área sob a curva do GIP neste mesmo intervalo de tempo . Com um valor de <i>p</i> sem nenhuma diferença estatística significativa entre eles	100
Figura 26: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos do GLP-1 obtida durante o teste de refeição padrão nos quatro grupos estudados. Acima gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva do GLP-1 neste mesmo intervalo de tempo, $p < 0,05$ mostrando uma diferença estatística significativa entre eles	101
Figura 27: Correlação entre as áreas abaixo da curva do GLP-1 e glucagon no teste de refeição padrão, intervalo de tempo de 0 - 180 minutos. Teste de correlação de Pearson	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para diagnóstico de diabetes mellitus	42
Tabela 2 - Características dos principais testes utilizados para avaliar a função da célula-beta	65
Tabela 3: Valores de glicose plasmática para diagnóstico de diabetes mellitus	72
Tabela 4: Protocolo para a realização do teste de bioimpedância	74
Tabela 5: Principais características clínicas, antropométricas e parâmetros metabólicos basais entre os grupos do estudo.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

%GC	Percentual de gordura corporal
A1c	Hemoglobina glicada
ADA	Do inglês "American Diabetes Association" em português "Associação Americana de Diabetes"
AGL	Ácido graxo livre
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Do inglês " <i>area under the curve.</i> " em português "área sob a curva "
Ca	Cálcio
CoIT	Colesterol total
DAS	Diâmetro abdominal sagital
DCV	Doença cardiovascular
DI	Do inglês "Disposition index " em português " Índice de disposição da glicose "
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
DP	Desvio padrão
DPP	Do inglês " Diabetes Prevention Program", em português "programa de prevenção do diabetes "
DPP-4	Do inglês " dipeptidil peptidase 4", em português "inibidor da dipeptidil peptidase -4 "
E-DM	<i>Elderly diabetes mellitus</i>
EGIR	Do inglês "European Group for the Study of Insulin Resistance", do português "Grupo Europeu para o Estudo da Resistência à Insulina"

EIMC	Espessura da íntima média carotídea
ELISA	Do inglês "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", em português "ensaio enzimático de imunoabsorção"
E-NGT	<i>Elderly normal glucose tolerante</i>
GGT	Gama glutamiltransferase
GIP	Do inglês "glucose-dependent insulintropic peptide", em português polipeptídeo insulíntrópico glicose dependente"
GJ	Glicose de jejum
GLP-1	Do inglês "glucagon-like peptide-1", em português "peptídeo semelhante ao glucagon 1"
GLUT4	Do inglês "glucose transporter type 4", em português "transportador de glicose tipo 4"
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HC	<i>Hyperglycemic Clamp</i>
HDL	Do inglês "high density lipoprotein", em português "lipoproteínas de densidade alta"
HOMA-IR	Do inglês "homeostasis model assessment insulin resistance index", em português "modelo de avaliação da homeostase - resistência à insulina"
HPLC	Do inglês "high performance liquid chromatography", em português "cromatografia líquida de alta performance"
I	Idosos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGI	Índice insulínogênico
IL-6	Interleucina 6

IMC	Índice de massa corporal
INS	Insulina
IRS-1	Do inglês "insulin receptor substrate 1", em português "substrato receptor de insulina "
ISI	Índice de sensibilidade à insulina
ISI_{mm}	Índice de sensibilidade à insulina ajustado para a quantidade de massa magra
IVGTT	Teste de tolerância à glicose intravenosa
K⁺	Potássio
LDL	Do inglês "low density lipoprotein", em português "lipoproteínas de densidade baixa"
LIMED	Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes
MA-DM	<i>Middle aged diabetes mellitus</i>
MA-NGT	<i>Middle aged normal glucose tolerante</i>
MCR_{est}	Do inglês "glucose clearance estimate", do português " depuração estimada da glicose "
MI	Meia idade
MO	Macrófagos
OGIS	Do inglês "oral glucose insulin sensitivity", do português "sensibilidade da insulina à glicose oral"
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR-us	Do inglês "polymerase chain reaction ultra sensitivity", do português "reação em cadeia da polimerase ultra sensível "

PEPC	Peptídeo C
RCV	Risco cardiovascular
RI	Resistência à insulina
SE	Do inglês "standard error", em português "desvio padrão"
SGLT1	Do inglês "sodium-glucose cotransporter 1", em português "co-transportador de sódio e glicose 1"
SGLT2	Do inglês "sodium-glucose cotransporter 2", em português "co-transportador de sódio e glicose 2"
SI	Sensibilidade à insulina
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
TA	Tecido adiposo
TAV	Tecido adiposo visceral
TIG	Taxa de infusão de glicose
TTGO	Teste de tolerância à glicose oral
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TNG	Tolerância Normal à glicose
TRP	Teste de refeição padrão
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumo

Objetivo: Estimar o impacto do envelhecimento e do diabetes na sensibilidade à insulina, função da célula beta, adipocitocinas e produção de incretina

Métodos: Foram realizados *clamps* hiperglicêmicos, testes de arginina e testes de refeição padrão em 50 pacientes não obesos para medir a sensibilidade à insulina e secreção de insulina, assim como os níveis plasmáticos do glucagon, GLP-1 e GIP. Os pacientes com diabetes e do grupo controle saudáveis foram divididos nos seguintes grupos: meia idade com diabetes tipo 2 (MI-DM2), idosos com diabetes tipo 2 (I-DM2), meia idade ou idosos com tolerância normal à glicose (MI-TNG, I-TNG).

Resultados: A sensibilidade à insulina (SI), determinada pelo modelo de avaliação da homeostase, taxa de infusão de glicose e pela sensibilidade à insulina a glicose oral, foi reduzida no grupo de idosos e nos grupos com DM2, comparados com o grupo de meia idade com tolerância normal à glicose, mas foi similar no grupo MI-DM2 e grupo I-DM2. O índice insulinogênico, a primeira e segunda fase de secreção de insulina e o índice de disposição, com exceção da resposta da insulina à arginina, foram reduzidos com o envelhecimento e nos grupos com DM2. A produção pós-prandial média de glucagon no tempo total de 0 - 180 minutos foi maior no grupo de DM2 comparado ao grupo de TNG, sendo que na primeira hora da produção de glucagon o grupo de I-DM2 apresentou uma média mais elevado em relação ao grupo de MI-DM2. Embora a produção de GLP-1 tenha sido reduzida no grupo I-DM2, nenhuma diferença entre os grupos foi observada em relação a produção de GIP.

Conclusão: O diabetes e o envelhecimento desencadearam uma redução da sensibilidade à insulina em pacientes não obesos. A produção de insulina foi reduzida com o envelhecimento e exacerbada pela condição do diabetes. As deficiências associadas ao envelhecimento se sobrepõe a fisiopatologia do diabetes, particularmente relacionada a produção de GLP-1. Por outro lado, a secreção de insulina independente da glicose foi preservada. O entendimento desta complexa relação entre envelhecimento e diabetes poderia ajudar no desenvolvimento de terapias farmacológica baseada em fisiopatologia.

Palavras-chave: incretinas, diabetes *mellitus* no idoso, técnica do *clamp* hiperglicêmico, resistência à insulina.

Abstract

Objective: To estimate the impact of aging and diabetes on insulin sensitivity, beta-cell function, adipocytokines, and incretin production.

Methods: Hyperglycemic clamps, arginine tests and meal tolerance tests were performed in 50 non-obese subjects to measure insulin sensitivity (IS) and insulin secretion as well as plasma levels of glucagon, GLP-1 and GIP. Patients with diabetes and healthy control subjects were divided into the following groups: middle-aged type 2 diabetes (MA-DM), elderly Type 2 diabetes (E-DM) and middle-aged or elderly subjects with normal glucose tolerance (MA-NGT or E-NGT).

Results: IS (insulin sensitivity), as determined by the homeostasis model assessment glucose infusion rate and oral glucose insulin sensitivity, was reduced in the aged and DM groups compared with MA-NGT, but similar in MA-DM and E-DM groups. Insulinogenic index, first and second phase of insulin secretion and the disposition indices, except insulin response to arginine, were reduced in the elderly and DM groups. The average postprandial glucagon production on the interval of 0-180 min was higher in DM groups compared to NGT groups, furthermore noticed that in the first hour of glucagon secretion, group E-DM had a higher average value compared to group MA-DM. Whereas the GLP-1 production was reduced in A-DM, no differences between groups were observed in GIP production.

Conclusions: In non-obese subjects, diabetes and aging impair insulin sensitivity. Insulin production is reduced by aging, and diabetes exacerbates this condition. Aging associated defects superimposed diabetic physiopathology, particularly regarding GLP-1 production. On the other hand, the glucose-independent secretion of insulin was preserved. The knowledge of the complex relationship between aging and diabetes could support the development of physiopathological and pharmacological based therapies.

Key words: incretins; diabetes type 2 in elderly; hyperglycemic clamp technique; insulin resistance.

SUMÁRIO

1	Introdução	37
1.1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	40
1.1.1	Epidemiologia	40
1.1.2	Base anatômica e fisiológica do pâncreas.....	41
1.1.3	Definição e critério de diagnóstico para diabetes <i>mellitus</i>	41
1.1.4	Patogênese do diabetes tipo 2	43
1.1.5	Resistência à insulina	45
1.1.6	Secreção de insulina	46
1.1.7	O eixo êntero insular.....	47
1.1.8	Ações da insulina e do glucagon e a importância da inter-relação entre eles na homeostase glicêmica	50
1.2	Diabetes mellitus tipo 2 no idoso.....	51
1.2.1	Mecanismos envolvidos na RI do idoso.....	51
1.2.2	Mecanismo envolvidos no defeito da secreção de insulina nos idosos	54
1.3	Avaliação da função de célula beta.....	57
1.4	Testes realizados em jejum.....	58
1.4.1	Insulina basal.....	59
1.4.2	Peptídeo-C basal e Método de deconvolução	59
1.4.3	HOMA.....	60
1.5	Testes dinâmicos	61
1.5.1	Teste de tolerância oral a glicose	61
1.5.2	Teste de refeição padrão.....	62
1.5.3	Teste do <i>clamp</i> hiperglicêmico	63
1.5.4	Teste de arginina: resposta aguda à Insulina	64
2	Objetivos	67
2.1	Objetivo geral	68
2.2	Objetivo específico	68
3	Material e métodos experimentais	69
3.1	Delineamento do estudo e cálculo amostral.....	70
3.1.1	Critérios de inclusão	70
3.1.2	Critérios de exclusão	71
3.2	Diagnóstico, exames e técnicas.....	72
3.2.1	Anamnese	72
3.2.2	Avaliação dos sinais vitais	72
3.2.3	Avaliação antropométrica, composição corporal e gordura visceral	73
3.2.4	Parâmetros bioquímicos e hematológicos	74
3.2.5	Teste de refeição padrão.....	75
3.2.6	Técnica do <i>clamp</i> hiperglicêmico.....	76
3.2.7	Teste de arginina: Resposta aguda à Insulina.....	78
3.2.8	Considerações sobre os cálculos	79
3.2.9	Análise Estatística.	80
3.3	Aspectos Éticos.....	81
4	Resultados	83
4.1	Características dos participantes do estudo.....	84
4.2	Sensibilidade à insulina.....	85
4.2.1	HOMA-IR.....	86

4.2.2	Depuração metabólica da glicose.....	86
4.2.3	Sensibilidade da insulina à glicose oral	87
4.2.4	Taxa de infusão de glicose	87
4.2.5	Índices de sensibilidade a insulina.....	88
4.3	Secreção de Insulina.....	88
4.3.1	Índice insulinogênico	89
4.3.2	Área sob a curva da secreção de insulina	89
4.3.3	Primeira fase da secreção de insulina	90
4.3.4	Segunda fase da secreção de insulina	91
4.3.5	Secreção de insulina no teste de arginina	92
4.4	Índice de disposição (Função de célula beta)	93
4.4.1	Índice de disposição de primeira fase de secreção de insulina	94
4.4.2	Índice de disposição de segunda fase de secreção de insulina	94
4.4.3	Índice de disposição no AIRarg/TIG	95
4.5	Adaptação a redução da sensibilidade a insulina	96
4.6	Teste de refeição padrão: resposta hormonal.....	97
4.6.1	Área sob a curva no tempo 0-180 min do glucagon	97
4.6.2	Área sob a curva no tempo 0-180 min da insulina.....	98
4.6.3	Área sob a curva no tempo de 0-180 minutos do GIP	99
4.6.4	Área sob a curva no tempo 0-180 min do GLP-1.....	100
4.6.5	Relação inversa entre GLP-1 e glucagon (AUC 0 – 180 min)	101
4.7	Adipocitocinas e ácidos graxos livre.....	102
5	Discussão.....	103
6	Conclusão	111
7	Referências bibliográficas	113
8	Anexos	125
8.1	Carta de aprovação do presente projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.	126

1 Introdução

A melhora na expectativa de vida atual aumentou o número de pessoas com mais de 65 anos de idade. Nos Estados Unidos estima-se que em 2020 os idosos corresponderão a 20% da população americana (aproximadamente 60 milhões). No Brasil, os dados do IBGE de 2005, mostram que a população de idosos estava em 9% (20 milhões), e a estimativa para 2030 será de 15% da população (mais do que 40 milhões de indivíduos).

O envelhecimento eleva o número de doenças crônico-degenerativas, dentre elas, o diabetes *mellitus* tipo 2. Estamos frente a uma epidemia de diabetes na senectude neste século. Porém, a fisiopatologia do DM2 idoso é pouco conhecida comparada a do adulto jovem e diversos são os fatores associados ao envelhecimento que interagem e contribuem para a intolerância à glicose e ao DM2, que podemos citar: o aumento da adiposidade visceral, diminuição da atividade física associada a algum grau de sarcopenia, resultando em mudanças na composição corporal e na resistência à insulina (NING E COL., 2010; SCHEEN E COL., 2005). O envelhecimento é também associado a deficiência na secreção de insulina pela célula beta (PALMER E COL., 1975).

Uma análise retrospectiva do grupo de Estudo Europeu de Resistência à Insulina (EGIR) revelam um declínio na taxa de liberação de insulina na faixa etária dos 18 aos 85 anos, apesar do controle do índice da massa corporal (IMC) para a glicose e a sensibilidade à insulina (IOZZO E COL., 1999), sugerindo que o envelhecimento diminui a função da célula beta. Outros mecanismos além da sensibilidade e secreção de insulina estão envolvidos na fisiopatologia do diabetes no idoso, como a não supressão da secreção de glucagon com conseqüente hiperglicemia (STUMVOLL E COL., 1998; MCCONNELL E COL., 1983).

Vários estudos envolvendo a ação dos hormônios incretínicos e diabetes no idoso são bastante heterogêneos. Alguns mostram respostas de GLP-1 e GIP como normais (ELAHI E COL., 1984; MACINTOSH E COL., 1999) ou respostas elevadas em idosos saudáveis comparados aos grupos controles de jovens (RANGANATH E COL., 1998; KOROSI E COL., 2001). Em outros trabalhos, os idosos com diabetes, a secreção de GIP foi elevada (ELAHI E COL., 1984) ou normal (KOROSI E COL., 2001). Já em outro estudo, a resposta da célula beta a ambos os hormônios

incretínicos foi deficitária nos pacientes idosos, sendo mais comprometida no idoso com diabetes (MENEILLY E COL., 1998; ELAHI E COL., 1994).

No entanto ainda não é claro se essa alteração na liberação dos hormônios incretínicos contribuem para o defeito na secreção de insulina no idoso com diabetes. Tendo em vista a patogênese do DM2 no idoso uma área de intensa investigação, consideráveis controvérsias e contínua descoberta, esta dissertação tenta explorar se a sensibilidade à insulina, função de célula beta, adipocinas e incretinas são alteradas pelo envelhecimento e pela condição de diabetes em pacientes de meia idade e idosos. A influência do IMC e da atividade física foi controlada nesse estudo em função da homogeneidade dos grupos, ausência de obesos e sedentários.

1.1 Diabetes *mellitus* tipo 2

1.1.1 Epidemiologia

O diabetes *mellitus* tipo 2 é a forma predominante de diabetes, sendo responsável por cerca de 90% dos casos da doença em todo o mundo. Em 2010, cerca de 285 milhões de pessoas eram portadoras de diabetes *mellitus* tipo 2. Em setembro de 2011 a Federação Internacional de Diabetes anunciou que 336 milhões de pessoas em torno do mundo têm diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). As estimativas para 2030, são que esse número de pessoas com DM2 suba para 439 milhões, o que representa 7,7% da população adulta total do mundo com idade entre 20-79 anos (SHAW E COL., 2010). Em caucasianos com até 75 anos este índice pode atingir 20%, podendo ser ainda maior para outras etnias, especialmente negros, hispânicos, índios e micronésios (GRAYDON E COL., 2001).

Nos Estados Unidos a doença acomete aproximadamente 12% dos adultos e mais de 25% das pessoas acima de 65 anos. No Brasil, dados de um estudo multicêntrico realizado pelo Ministério da Saúde demonstraram que a prevalência de diabetes aumenta com a idade, sendo 1,7% dos indivíduos entre 30 e 39 anos de idade, e 3,9% entre 40 e 49 anos; 13,6% entre 50 e 59 anos, chegando a atingir 17,3% a faixa etária de 60 a 69 anos (Brasil-MS, 1991). No ano de 2012, a Sociedade Brasileira de Diabetes publicou o número total de portadores de diabetes no Brasil estimado em 12.054.827 indivíduos (SBD, 2012).

O DM2 não se restringe ao mundo ocidental (ASHCROFT & RORSMAN, 2012), a previsão é que haja um aumento mais acentuado da prevalência de DM2 nos países em desenvolvimento em relação aos países desenvolvidos. Isto é visto em função de um grande aumento na incidência de DM2 em países asiáticos como a Índia (57 milhões), seguindo-se da China (38 milhões).

Esta enfermidade aumenta o risco de doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e complicações microvasculares, tais como cegueira, falência renal e neuropatia periférica. Hoje o DM2 é um dos principais problemas de saúde pública globalmente

e com grande agravamento na economia dos governos e individuais. O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos desta doença é essencial para uma abordagem preventiva e ou terapêutica (ASHCROFT & RORSMAN., 2012).

1.1.2 Base anatômica e fisiológica do pâncreas

O pâncreas de um ser humano adulto, com peso médio de 70 kg, possui entre 300.000 a 1.500.000 ilhotas. O volume do parênquima pancreático aumenta na infância e chega a um patamar máximo aos 20 anos de idade. Dos 20 aos 40 anos de idade o volume do pâncreas é estável, podendo aumentar para compensar alterações de demanda, tais como na gravidez, obesidade ou na resistência à insulina. Assim, ao longo de uma vida inteira, poderão ocorrer mudanças compensatórias na função e na massa das células- β . Após os 60 anos de idade o volume do pâncreas diminui de forma linear; sendo essa diminuição em consequência do processo de envelhecimento (YOSHIFUMI & COL., 2013). Esse órgão tem dois compartimentos fundamentais, o exócrino e o endócrino (KAIHOH & COL., 1986). O compartimento exócrino tem função digestiva, através das células acinares que secretam enzimas digestivas e outros componentes não enzimáticos no duodeno. Quanto ao compartimento endócrino, esse executa a sua função através das ilhotas de Langerhans, que são agrupamentos de células compactas e esféricas, que se espalham por todo o tecido exócrino mais abundante. Essas ilhotas consistem em quatro tipos diferentes de células que secretam hormônios na corrente sanguínea, cuja função é controlar a homeostase da glicose. São elas, as células- β produtoras de insulina (70 a 80% da massa), células α produtoras de glucagon (15 a 20%), células δ produtoras de somatostatina (5%) e células PP produtoras de polipeptídeos pancreáticos (1%). A massa de ilhotas dentro do pâncreas é dinâmica, conforme exposto acima, alterando-se com o crescimento e desenvolvimento, bem como com os desafios funcionais, ao longo da vida para manter a euglicemia.

1.1.3 Definição e critério de diagnóstico para diabetes *mellitus*

Diabete *mellitus* é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizado por níveis de glicose elevados no sangue. Alterações importantes em seus critérios

diagnósticos ocorreram em 1997, onde os níveis plasmáticos foram reduzidos de 140 para 126 mg/dl. Foi ainda introduzida a categoria glicemia de jejum alterada (GJA) e tolerância diminuída à glicose (TDG). Deve ser sempre confirmado os resultados anormais, em função do coeficiente de variação intra-individual que ocorre. O diagnóstico pode ser feito pelos critérios atuais da ADA (Associação Americana de Diabetes), tanto com base na concentração elevada da glicemia plasmática de jejum, quanto por uma glicose plasmática aleatória elevada na presença de sintomas hiperglicêmicos.

Os critérios diagnósticos para os pacientes idosos são idênticos aos dos pacientes jovens. O teste de tolerância à glicose oral (TTGO) é uma importante ferramenta, mas não é recomendado o uso rotineiro no diagnóstico da doença (WILLIAMS, 2011). A tabela 1 a seguir refere-se aos valores plasmáticos da glicose para o diagnóstico da doença:

Tabela 1: Critérios para diagnóstico de diabetes mellitus

	Jejum**	2 h após 75g de glicose	Casual
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	Maior que 100 a menor que 126	Igual ou superior a 140 e menor que 200	
Diabetes mellitus*	≥ 126	≥ 200	Igual ou superior a 200 com (sintomas clássicos)***

FONTE :WILLIAMS., 2011.

*Um diagnóstico de diabetes deve ser confirmado no dia subsequente através da determinação da GPj¹, GP de 2 horas ou de uma glicose plasmática aleatória (se os sintomas estiverem presentes***). O Exame da GPj é preferido devido à sua facilidade de administração, conveniência, aceitabilidade pelos pacientes e custo mais baixo. O jejum** é definido como ausência de ingestão calórica por no mínimo 8 horas. ***Os sintomas clássicos de diabetes incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.

(1) GPj: glicose plasmática de jejum; GJA: glicemia de jejum alterada; TDG: tolerância diminuída à glicose; GP: glicose plasmática.

1.1.4 Patogênese do diabetes tipo 2

Até pouco tempo, as perdas da capacidade produtora e secretória das células-beta eram atribuídas apenas ao diabetes tipo 1, às formas genéticas de diabetes e ao diabetes decorrente da perda funcional pancreática, produzida por agentes externos ou doenças do pâncreas exócrino que afetava a função endócrina. Hoje é sabido que o DM2 ocorre em indivíduos geneticamente predispostos e que estão expostos a uma série de influências ambientais, associados a outros fatores como idade, sexo e etnia, todos precipitando o surgimento clínico da doença. A predisposição genética faz-se presente, sendo que os parentes de primeiro grau de indivíduos com DM2 possuem maior probabilidade de desenvolverem intolerância à glicose e o diabetes (MIRIAN E COL., 2007). Gêmeos idênticos em que um irmão não é afetado pelo DM2, são possíveis identificar alterações no metabolismo dos carboidratos (VAAG E COL., 1995). Quanto aos fatores ambientais, esses possuem um importante papel no desenvolvimento da doença destacando-se a inatividade física, ingestão excessiva de calorias conducente a obesidade. Destacam-se ainda fatores que desencadeiam ou aceleram o aparecimento do DM2 como a gravidez e o envelhecimento.

Diversos são os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, pelo menos oito anormalidades metabólicas ou hormonais contribuem para o desenvolvimento da hiperglicemia (DEFRONZO E COL., 2009) como mostra a figura 1 a seguir. No pâncreas as alterações ocorrem tanto nas células betas quanto nas alfas. A disfunção da célula beta acarreta uma diminuição na secreção de insulina com hiperglicemia de jejum e pós-prandial. Quando essa alteração é na célula alfa, há um aumento na secreção de glucagon, desencadeando uma produção excessiva de glicose pelo fígado. No músculo a resistência à insulina diminui a utilização da glicose nos tecidos periféricos, com o aumento da glicose de jejum e pós-prandial. No fígado a RI manifesta-se por uma super produção de glicose durante o estado basal, a pesar da presença da hiperinsulinêmica em jejum, existe uma falha na produção hepática de glicose em resposta à insulina como ocorre após um período alimentar. No intestino ocorre uma diminuição da relação de secreção de GLP-1/GIP, e uma resistência dessa relação na célula beta pancreática, com conseqüente redução da secreção de insulina pós-prandial. No tecido adiposo há um aumento da

lipólise com conseqüente elevação da concentração plasmática de ácidos graxos livres que exacerbam a resistência à insulina no músculo e no fígado, piorando a função de célula beta. No cérebro a disfunção dos neurotransmissores e a resistência à insulina acarretam falhas na via de sinalização da saciedade com conseqüente elevação nos níveis de glicose plasmática. O rim é responsável por filtrar 180 litros de plasma, e uma concentração de glicose de 5 mmol/l diariamente, esse órgão filtra aproximadamente 162g (900mmol) de glicose por dia, mantendo os níveis plasmáticos de glicose normais (aproximadamente 5,6 mmol/l) isso ocorre graças a um eficiente sistema de proteínas co-transportadoras de sódio e glicose 1 e 2 (SGLT1 e SGLT2) que limpam toda a glicose filtrada. Sendo que o SGLT2 é responsável por 80 a 90% da reabsorção de glicose renal. Os pacientes portadores de DM2 possuem uma maior expressão da proteína SGLT2, conseqüentemente, maior reabsorção de glicose ocorre (glicotoxicidade) exacerbando a resistência à ação da insulina e a disfunção de célula beta (DEFRONZO E COL., 2012). Os agravantes como obesidade, envelhecimento, HAS e dislipidemias envolvem mecanismos que vão desde o aumento da resistência à insulina, passando pela produção nos adipócitos de fatores circulantes pró-inflamatórios e pró-oxidação. Portanto em função dessa variedade de fatores envolvidos na fisiopatologia do DM2, fica evidente que essa doença possui uma etiopatogenia bastante complexa. A figura 1 ilustra as oito anormalidades metabólicas ou hormonais que contribuem para o desenvolvimento da hiperglicemia do DM2.

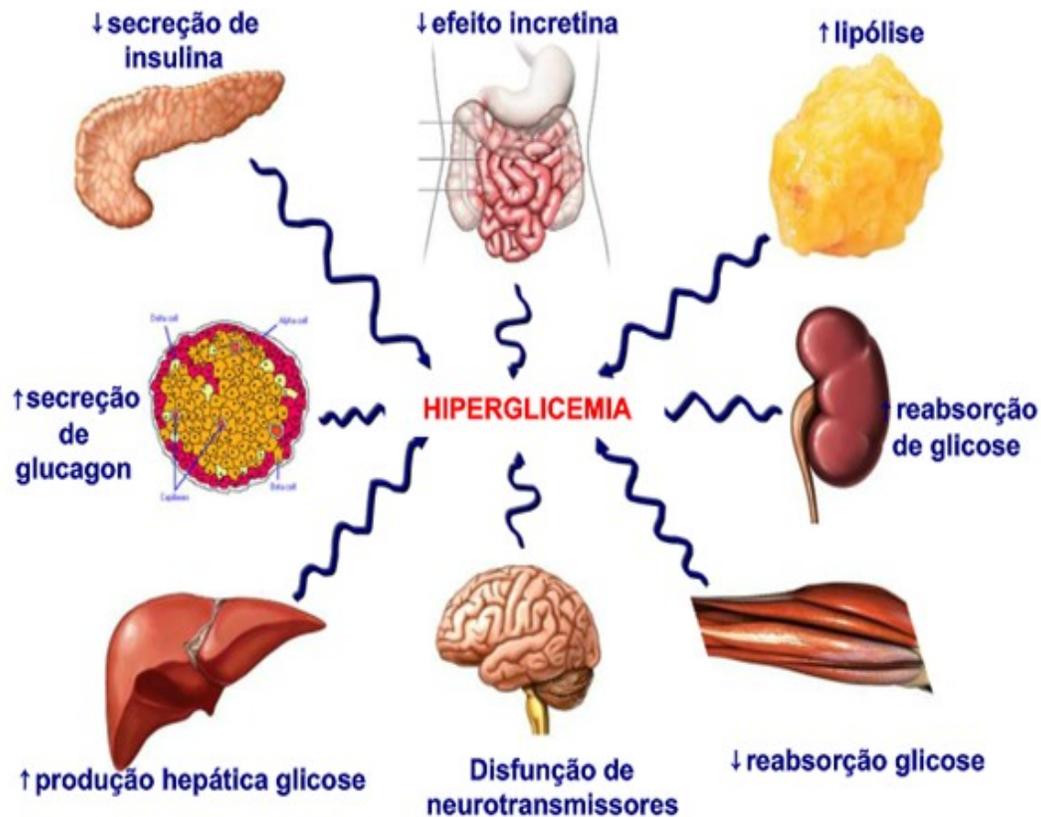


Figura 1: Ilustração da patogênese do DM2. Adaptado de DeFronzo e col., 2009.

1.1.5 Resistência à insulina

A resistência à insulina (RI) é definida com uma resposta biológica abaixo da normal a uma dada concentração de insulina, que parece causar disfunção da célula beta via um mecanismo de exaustão, e um aumento na demanda secretória devido a uma resistência periférica tecidual à sinalização da insulina, resultando num contínuo hiper-estímulo da célula beta e uma eventual falência, a RI pode preceder a disfunção da célula beta. Em três estudos longitudinais envolvendo um grande número de participantes de grupos populacionais, como o americano de origem japonesa (WEYER E COL., 1999), o americano de origem mexicana “San Antonio Heart Study” (CHEN E COL., 1995) e finlandeses - “Botnia Study” (FERRANNINI E COL., 2004), determinaram que a deterioração da tolerância à glicose ocorria em função da incapacidade da célula beta de compensar a RI existente. Existe um elo fisiopatológico entre obesidade e RI; indivíduos obesos possuem um aumento

progressivo da concentração sanguínea basal de insulina, esse incremento pode ser mantido em algumas pessoas e perdido em outras. As primeiras se manterão normoglicêmicas e resistentes à insulina, enquanto as segundas perderão definitivamente a capacidade de manter a homeostase da glicose (MENEILLY E COL., 1999). Embora a RI seja altamente relacionada ao desenvolvimento de DM2, ela não é necessária e nem suficiente para o desenvolvimento da doença, pois muitos dos indivíduos com RI não irão desenvolver o diabetes. Portanto, a RI isoladamente não pode ser considerada o fator patogênico determinante do diabetes tipo 2, enquanto parece claro que a deterioração na secreção de insulina pelas células-beta é crucial para o desenvolvimento da hiperglicemia, tornando-a o centro da questão (CERASI & FERRANNINI., 2004), a resistência a ação da insulina no músculo, fígado e no tecido adiposo, associada à falha de secreção de insulina formam a base central desta doença.

1.1.6 Secreção de insulina

Análises por microscopia eletrônica de amostras teciduais em autópsias humanas, mostram que uma redução de mais de 60% na massa de célula beta é relatado no paciente com DM2 (BUTLER E COL., 2003), em paralelo há uma extensa redução na secreção de insulina induzido pela glicose (DELGUERRA E COL., 2005). Pela dificuldade em se obter amostras de tecido pancreático humano in vivo, não existe nenhum estudo longitudinal deixando claro, mostrando-se que pacientes com DM2 começam com uma massa de célula beta mais baixa, ou se desenvolvem em consequência de uma hiperglicemia sustentada. Também não se sabe quanto de massa de célula beta é necessária para se manter a euglicemia. Um simples cálculo baseado na taxa de liberação de insulina por dia num indivíduo não diabético, sugere que menos de 40% de massa de célula beta seria adequado para manter o controle glicêmico, esse número é aceito pelo conhecimento de que a remoção de metade do pâncreas tem apenas um pequeno efeito na tolerância à glicose (ASHCROFT & RORSMAN, 2012). Isso mostra que a função da célula beta possui um papel mais importante do que o número de células beta na etiologia do DM2. A perda funcional das células-beta é condição essencial para o surgimento do quadro hiperglicêmico.

O momento do desenvolvimento do diabetes tipo 2, no qual a disfunção da célula beta se inicia é incerto, contudo, evidências recentes apontam que o início é precoce, podendo ter iniciado até 10 anos antes do diagnóstico, quando a glicemia é ainda classificada como normal, bem antes do surgimento do pré-diabetes (PRENTKY & NOLAN, 2006), levando a deterioração da capacidade secretória da célula-beta de forma progressiva, talvez essa disfunção anteceda ou ainda contribua para o desenvolvimento da resistência a insulina. Em um estudo longitudinal realizado com os índios da tribo norte-americana Pima, a disfunção das células-beta foi o principal determinante da progressão do estado de normoglicemia para hiperglicemia (WEYER E COL., 2009). As disfunções das células betas resultam principalmente de alterações primárias moleculares e metabólicas (KAHN E COL., 2000). A primeira causada por radicais oxidantes e ativação da cascata das enzimas caspase 3 e 8 que são as principais moléculas envolvidas na via da apoptose da célula beta (morte celular). Quanto as alterações metabólicas, destacam-se a glicotoxicidade e a lipotoxicidade. A hiperglicemia crônica é danosa às células beta por dessensibilização destas a ação da insulina (perda da resposta à insulina induzida pela glicose) e mesmo morte celular. A lipotoxicidade causada por níveis excessivos de ácidos graxos livres são igualmente tóxicos quando presentes de forma crônica (WAJCHENBERG., 2007). No DM2 além do aumento da apoptose, existe uma diminuição importante no processo de regeneração e da neogênese celular (DELGUERRA E COL., 2005). Outros fatores como resistência a leptina, elevação de outras citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1), e a formação de amilóide, todos contribuem para a morte da célula beta.

1.1.7 O eixo êntero insular

Existe uma conexão entre o trato gastro intestinal e o pâncreas, promovida pelos chamados hormônios intestinais ou peptídeos semelhantes ao glucagon, dos quais iremos nos deter ao GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon) e GIP (polipeptídeo inibitório gástrico). Esses hormônios são conhecidos como incretinas, porque aumentam a secreção de insulina dependente de glicose (MCINTYRE ET AL., 1964). O chamado efeito incretínico é o processo pelo qual a glicose oral possui um maior

efeito estimulatório sobre a secreção de insulina, do que quando essa mesma quantidade de glicose é administrada por via endovenosa. Nos seres humanos, esse efeito parece ser primariamente mediado pelos chamados hormônios incretínicos, GLP-1 e GIP, que possuem diversos efeitos glucorregulatório e hoje constituem uma das novas terapias para o tratamento do DM2, os quais serão comentados a seguir.

1.1.7.1 Peptídeo semelhante ao glucagon (GLP – 1)

Representa o produto do gene do pré-pró-glucagon, expresso no sistema nervoso central e nas células L do intestino delgado. É rapidamente secretado após a alimentação de maneira proporcional à ingestão calórica (DRUCKER., 2002). O GLP-1 é principalmente secretado na forma GLP-1(7-36) NH₂, enquanto o restante é secretado como GLP-1(7-37), ambos são bioativos e interagem com receptores específicos nas células beta pancreáticas, no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central. O GLP-1 estimula a produção intracelular de AMPc, o qual atua via mecanismos dependentes e independentes da proteína quinase A (PKA) para amplificar a exocitose dos grânulos, bem como para otimizar o fechamento dos canais de K⁺ dependentes de ATP, atividade elétrica da célula-beta e a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. A maior parte desses efeitos manifesta-se apenas na presença de níveis glicêmicos elevados, o que representa a glicose-dependência do GLP-1 para potencializar a secreção de insulina. A liberação dos hormônios incretínicos GLP-1 e GIP (polipeptídeo insulínico dependente), explica porque um estímulo com glicose oral produz uma secreção de insulina muito maior comparado ao estímulo com glicose intravenosa (ASHCROF E RORSMAN., 2012). Diversos são os efeitos metabólicos do GLP-1 no nosso corpo; este peptídeo tem efeito sacietógeno e influencia o peso corporal, aumenta a secreção de insulina (glicose- dependente), por estimular a expressão do gene da insulina e por potencializar todos os passos de sua biossíntese, conforme acima explicado, aumenta a captação de glicose nos tecidos periféricos (músculo, gordura e fígado), além do seu efeito proliferativo e anti-apoptótico sobre as células beta. Torna o esvaziamento gástrico mais lento, e inibe secreção ácido-gástrica e a

hiperglucagonemia inapropriada (HUDA E COL., 2006). O GLP-1 possui uma meia vida plasmática muito curta, de 1 a 2 minutos, devido à degradação N-terminal pela enzima dipeptideo peptidase IV (DPP-IV). Diversas técnicas farmacológicas foram desenvolvidas para aproveitar o potencial da sinalização do GLP-1 para tratar o diabetes. Na verdade, a rápida reversão da glicemia e o aumento da secreção de insulina, provocados pela administração de GLP-1, demonstra que a capacidade de célula beta no DM2, ainda que latente, é suficiente para a estabilidade glicêmica (ASHCROFT & RORSMAN., 2012). A figura 2 a seguir ilustra as ações fisiológicas do GPL-1 no corpo humano.

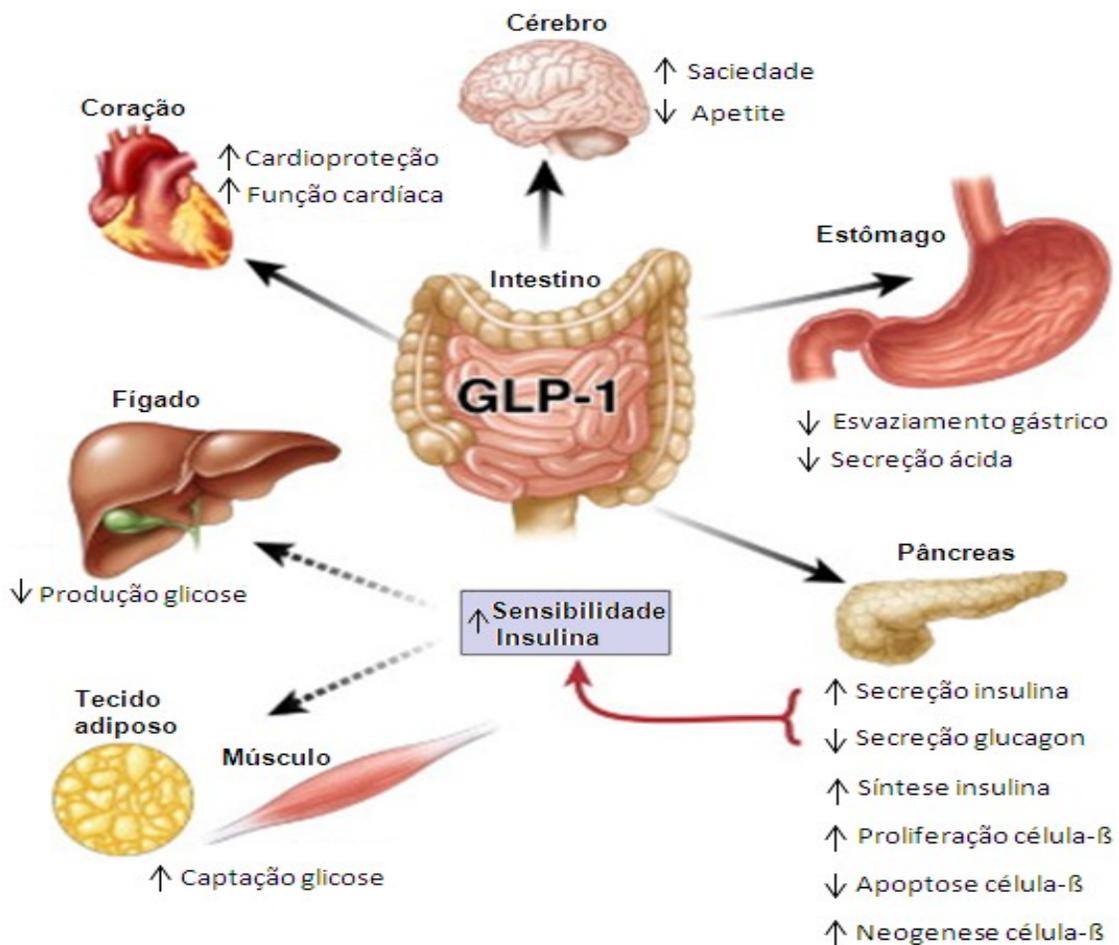


Figura 2: Ações do GLP-1 no corpo humano. Adaptado: Kieffer et al. Endocrine Rev 1999.

1.1.7.2 Polipeptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP)

Sintetizado e secretado no duodeno e jejuno proximal, principalmente em resposta à glicose e à gordura. Estimula a síntese e secreção de insulina (IRWIN E FLATT, 2009). Especula-se que haja resistência ao GIP em pacientes com DM2 devido à diminuição na expressão do receptor de GIP.

1.1.8 Ações da insulina e do glucagon e a importância da inter-relação entre eles na homeostase glicêmica

A insulina e o glucagon exibem funções coordenadas e opostas para manter uma estrita estabilidade glicêmica em indivíduos normais. A insulina age em vários tecidos periféricos incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem aumento da captação de glicose, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose (via diminuição da neoglicogênese e glicogenólise) da lipólise e da proteólise. O glucagon tem ações contrárias a da insulina, diminui a captação hepática de glicose, promove glicogenólise, gliconeogênese, cetogênese e diminuição da síntese de glicogênio (KIEFFER & HABENER., 2001). A insulina é o mais importante regulador endógeno da secreção do glucagon, e condições como RI e DM2 elevam as concentrações sanguíneas do glucagon e exacerbam a sua função. Com a evolução do DM2, a hiperglucagonemia manifesta-se mais claramente com a perda da relação inversa e pulsátil da insulina versus glucagon. Em 2007, Lee & cols. mostraram que o glucagon era essencial para a condição de hiperglicemia, pois camundongos nocauteados para o receptor de glucagon, não desenvolviam hiperglicemia, mesmo na ausência absoluta de insulina. O glucagon é codificado pelo gene pré-pró-glucagon, que é comum ao GLP-1 e ao GLP-2. A clivagem do pré-pró-glucagon no pâncreas dá a forma ativa do glucagon, e a sua clivagem no intestino geram as formas ativas do GLP-1 e GLP-2. Os estudos de Toft – Nielsen e colaboradores mostraram que portadores de DM2, após um teste de refeição, possuíam uma resposta de GLP-1 diminuída, enquanto a do glucagon estava aumentada. Em fim, o papel do glucagon é essencial para a hiperglicemia e as manifestações clínicas do DM2.

1.2 Diabetes mellitus tipo 2 no idoso

O envelhecimento é responsável por perda de muitas das funções fisiológicas humanas, sendo que até poucas décadas atrás, acreditava-se que o Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) ocorria naturalmente em função do processo de envelhecimento humano, e que todos os idosos teriam a doença em graus variados, porém essa teoria foi descartada, hoje o DM2 é considerada uma doença, a pesar do declínio da tolerância à glicose como parte do envelhecimento humano (DIABETES SPECTRUM, 2006). Existe uma predisposição genética nos indivíduos parentes de primeiro grau de pacientes com DM2 com 50% de chance de desenvolver a doença com o envelhecimento, esse percentual diagnóstico aumenta com o avançar da idade, sendo 3,9% em pessoas entre 40-49 anos e 13,2% em pessoas acima dos 75 anos (SCHEEN AJ, 2006). Noventa por cento ou mais da ocorrência de DM2 que acomete o idoso é em função da reduzida sensibilidade ou falha na secreção pulsátil da insulina pela célula beta. Os mecanismos envolvidos para o desenvolvimento da RI juntamente com os defeitos na secreção da insulina com o envelhecimento são diversos, sendo que os de mais alta relevância serão descritos a seguir.

1.2.1 Mecanismos envolvidos na RI do idoso

1.2.1.1 Mecanismos contribuidores da RI no envelhecimento

Com o aumento da massa gorda total que ocorre com o envelhecimento, elevam-se os níveis plasmáticos de leptina, e existe uma possível relação entre níveis plasmáticos de leptina e uma diminuição da captação de glicose mediada pela ação da insulina. O aumento do tecido adiposo visceral se correlaciona com intolerância à glicose e RI severa, sendo que este aumento da gordura abdominal é comum nos idosos. A RI do idoso parece estar muito mais relacionada a gordura abdominal do que com a idade (SCHEEN AJ, 2006).

A sarcopenia está envolvida na gênese da resistência a ação da insulina com o envelhecimento e caracteriza-se por uma perda progressiva e generalizada da massa e da força muscular, é parte do envelhecimento normal, sendo claramente acelerada pela inatividade física. Essa perda de massa magra contribui para uma

síndrome de fragilidade, sendo essa descrita por uma diminuição da reserva e resistência ao estresse, clinicamente expressa por fraqueza muscular, pobreza na tolerância ao exercício físico, perda da mobilidade com freqüentes quedas e risco de fraturas ósseas, tendo como desfechos desabilidade física, péssima qualidade de vida e morte (DIABETES METABOLISM., 2011). A redução de massa magra e alteração da composição muscular ocorrem nos idosos, mesmo que eles não ganhem peso, acometendo cerca de 19% dos homens e 12% das mulheres. O idoso com diabetes quando comparado ao idoso que não tem a doença, são duas a três vezes menos capaz de caminhar 400 metros, fazer suas atividades do lar e de preparar sua própria refeição. A sarcopenia possui etiologia incerta, mas importantes fatores têm sido identificados dentre eles, a perda de neurônio motor alfa, declínio da contratilidade da célula muscular e a deficiência de diversos hormônios, como a falta de estrogênios e de androgênios. O tratamento da sarcopenia com exercícios físicos de resistência são considerados seguros e efetivos, pois um dos mecanismos envolvidos no músculo é a diminuição do sistema de sinalização da insulina, através da diminuição da atividade da enzima AMPK (proteína adenosina 5 monofosfato ativada). O aumento do recrutamento da AMPK pelo exercício físico resistivo, pode ajudar a corrigir a RI desses pacientes (SCHEEN., 2005). Portanto deve-se investir nas técnicas de atividades físicas resistivas apropriadas ao idoso, objetivando evitar as conseqüências da desabilidade física que acomete esta população (CONSENSO EUROPEU DE NUTRIÇÃO., 2000).

Outros mecanismos biológicos envolvidos na etiologia da RI com o envelhecimento são: o aumento na expressão dos marcadores de inflamação e coagulação, que podem contribuir para os efeitos adversos da doença, resultando em complicações micro e macrovasculares, piorando ainda mais a massa magra e incapacitando o paciente; hábitos alimentares pobres, devido a ingestão de gordura saturada e carboidratos simples, acrescidos de inatividade física, também aumentam a RI no idoso. Ressalta-se ainda as comorbidades, que juntamente ao uso de diversos medicamentos, formam um conjunto de fatores responsáveis pela RI que acomete essa população.

1.2.1.2 Mecanismos marcadores da RI no envelhecimento

O aumento da insulina plasmática ocorre precocemente para tentar superar a RI e manter a euglicemia. Após os 50 anos de idade os níveis plasmáticos de insulina após teste de tolerância à glicose oral de 2 horas diminuem, e os níveis de glicose sobem para 0,5 mmol/l, sendo superiores aos observados nos níveis de jejum que se elevam para 0,06 mmol/l por década de vida. A diminuição da captação de glicose insulino-mediada, observada no teste do *clamp* hiperglicêmico, juntamente com uma diminuição do índice de sensibilidade à insulina em resposta à infusão gradual de glicose intravenosa, ocorreu nos idosos em relação ao adulto jovem (SCHEEN., 2005). A sensibilidade hepática à insulina é preservada nos idosos, sendo que a produção hepática de glicose parece quase não ser afetada, predominando a resistência à insulina no músculo esquelético, sendo que a intolerância à glicose nessa faixa etária, manifesta-se principalmente por elevação na glicemia pós-prandial. Uma outra causa que contribui para a hiperglicemia pós-prandial é uma menor captação de glicose nos tecidos periféricos, o idoso tem RI no tecido muscular, adiposo e esplênico.

1.2.1.3 Outros possíveis mecanismos envolvidos na RI do idoso

A diminuição dos transportadores da glicose, ou seja, nos níveis da isoforma proteica mais freqüente no músculo esquelético, o Glut 4, cuja função é captar a glicose não mediada pela insulina, é um dos possíveis mecanismos da RI do idoso, uma vez que 50% da captação da glicose após uma refeição padrão é insulino não mediada.

A redução dos níveis séricos de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina) que ocorre na população idosa, está relacionada a RI. A diminuição do aumento do fluxo sanguíneo insulino mediado, explicado pelo efeito vasodilatador da insulina, parece estar diminuído nos idosos, piorando a RI nesta população, porém este mecanismo permanece incerto. Por fim, a diminuição da sinalização da insulina na célula medida através da atividade do receptor tirosina quinase, parece ser alterada no idoso com diabetes e RI, mas não é certo se é a causa ou a consequência dos elevados níveis de glicose nesses pacientes (SCHEEN., 2005).

A correção de todos esses fatores acima descritos, incluindo perda de peso, atividade física e uma alimentação balanceada, promoverão melhora da RI com diminuição da intolerância à glicose e o DM2 que ocorre nesta faixa etária (SCHEEN., 2005).

1.2.2 Mecanismo envolvidos no defeito da secreção de insulina nos idosos

Diversos são os mecanismo envolvidos no defeito da secreção de insulina nos idosos e podem ser descritos da seguinte forma:

1.2.2.1 Mecanismos contribuidores no defeito da secreção de insulina no idoso

Os hábitos alimentares pobres e o uso de diversos medicamentos é muito freqüente na população de idosos, e essas variáveis sempre devem ser levadas em consideração quando se avalia a secreção de insulina nesta faixa etária.

1.2.2.2 Mecanismos marcadores do defeito da secreção de insulina no idoso

A alteração na ação pulsátil da insulina no idoso caracteriza-se por uma diminuição na amplitude dos pulsos ultradianos, que são observados a cada 1,5 a 2 horas e podem estar presentes no estado basal, mas que são amplificados no período pós-prandial. Ocorre ainda uma diminuição da responsividade da secreção de insulina às oscilações de glicose plasmáticas comparada aos adultos jovens, defeitos esses precoces, explicando parte da intolerância à glicose que ocorre no idoso (SCHEEN., 2005).

O aumento sérico da pró-insulina e da razão pró-insulina / insulina foi descrito em idosos, no entanto esses resultados não foram confirmados quando ajustados para o IMC, portanto continua duvidoso se essa alteração no processamento da insulina dentro da célula beta, poderia ser um fator predisponente maior ao desenvolvimento de intolerância à glicose que ocorre no idoso (RODER E COL., 2000).

A amilina é um hormônio secretado pela célula beta em resposta a ingesta alimentar, ajuda a regular a secreção pós-prandial de glucagon e lentificar a taxa de liberação de glicose para o plasma, retardando o esvaziamento gástrico. Com o

envelhecimento ocorre uma diminuição da secreção desse peptídeo, sendo este achado relacionado a diminuição da função de célula beta (MAEDLER E COL., 2006).

Há uma redução dos níveis de insulina sérica pós-sobrecarga de glicose na primeira hora nos idosos comparado ao adulto jovem. Há uma diminuição relativa na resposta da insulina a infusão gradual glicose nos idosos comparado aos adultos jovens, quando se leva em consideração a sensibilidade da insulina, sendo uma redução de 46% da primeira fase de secreção da insulina e 56% da segunda fase de secreção da insulina, avaliadas pelo estudo do *clamp* hiperglicêmico (SCHEEN., 2005). A baixa resposta aguda da insulina em resposta à glicose intravenosa, relacionando apenas a idade, não é claramente demonstrada em estudos mais recentes, apesar dos indivíduos mais velhos serem mais intolerantes, contudo não foram diagnosticados como diabéticos. Idosos com intolerância à glicose são insulino resistentes e tende a ter uma menor secreção aguda de insulina comparados aos idosos normotolerantes. A diminuição da resposta da insulina a estímulos que não sejam glicose, como por exemplo a administração de arginina, a capacidade secretória da célula beta foi 48% mais baixa no idoso comparada ao jovem (SCHEEN., 2005).

1.2.2.3 Outros potenciais mecanismos envolvidos na secreção de insulina nos idosos

Há uma diminuição da sensibilidade da célula beta aos hormônios incretínicos como o GIP e o GLP-1, que possuem as mais importantes propriedades, como promover a secreção de insulina, inibir a produção do glucagon e da somatostatina, manter a massa de células beta, retardar o esvaziamento gástrico promovendo saciedade, todos tendo como finalidade manter a homeostase da glicose sem induzir hipoglicemia. Há hipóteses de que a falha da ação desses hormônios com o envelhecimento contribuem para a reduzida tolerância à glicose desses pacientes (MENEILLY E COL., 1998; ELAHI E COL., 1994).

O envelhecimento se correlaciona com a diminuição da proliferação de células beta e um aumento da sensibilidade à apoptose induzida pela glicose. Essa falência foi associada a uma diminuição do PDx1 (um fator de transcrição que regula a

diferenciação e a função da célula beta, além de promover a replicação e a citoproteção da mesma). Além do mais, o envelhecimento leva a mudança na plasticidade das células beta, predispondo ao desenvolvimento de diabetes nesta população (MAEDLER E COL., 2006). O avançar da idade aumenta os depósitos de β amilóide no tecido pancreático, porém se esse é uma causa ou uma consequência da doença ainda merece mais investigações (MAEDLER E COL., 2006).

Anormalidades moleculares como a alteração no gene da glicoquinase (sensor de glicose na célula beta), poderia explicar o defeito na secreção de insulina em idosos com diabetes, mas não está claro se a função deste gene é falha no idoso com diabetes. Alterações hormonais como baixos níveis de testosterona e da proteína ligadora dos hormônios sexuais (SHBG) no homem, e níveis elevados nas mulheres, parecem ter importância no desenvolvimento de síndrome metabólica e DM2 (FERRANNINI E COL., 2004). Há controvérsias referentes aos efeitos do envelhecimento na secreção absoluta de insulina em resposta à glicose oral ou intravenosa, no entanto, parece que a secreção de insulina diminui com a idade, juntamente com uma significativa diminuição da sensibilidade da célula beta à glicose. Esses dados devem sempre ser analisados em concomitância, devido ao elo entre diminuição de secreção e aumento de resistência à insulina, que explicam a maioria das alterações do metabolismo da glicose que ocorre no idoso (SCHEEN E COL., 2005). Quando todos esses fatores são corrigidos, os estudos ainda não deixam claro se a idade por si, tenha um efeito independente na captação periférica de glicose. A figura 3 a seguir faz um resumo da fisiopatologia do DM2 no idoso.

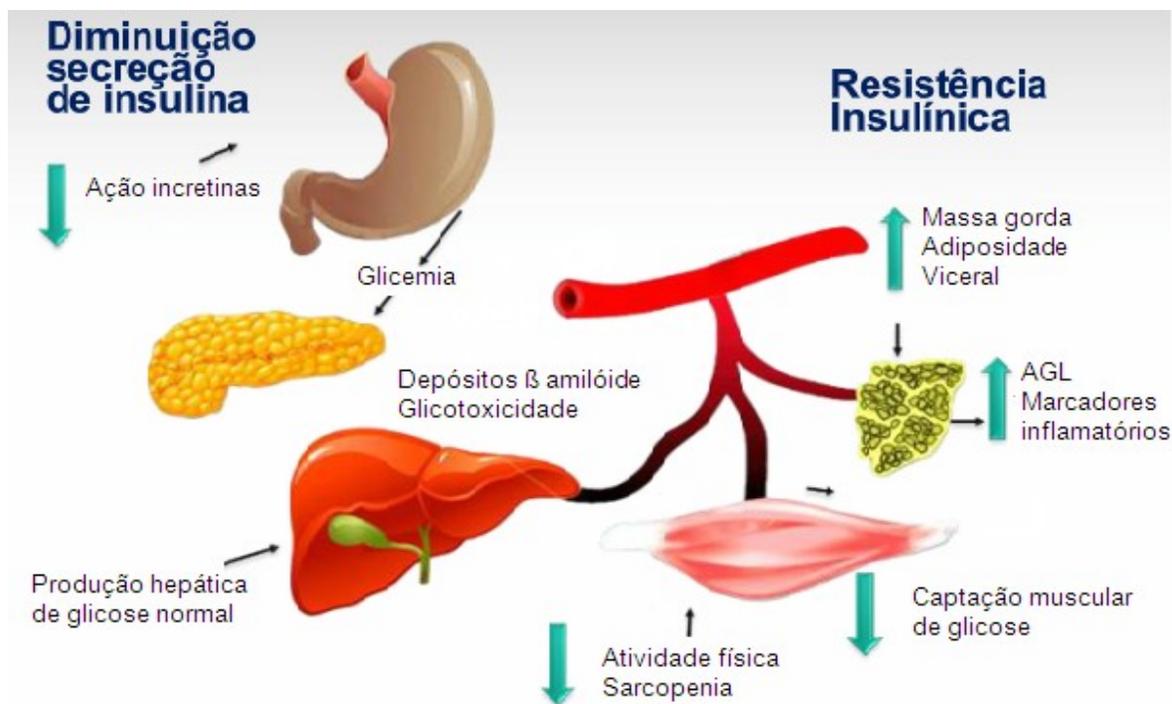


Figura 3: Fisiopatologia do DM2 no idoso. Adaptado de Scheen AJ. Diabetes Metab. 2005.

1.3 Avaliação da função de célula beta

Para uma avaliação acurada da secreção de insulina faz-se necessário uma verificação frente ao nível de sensibilidade à insulina individual. Existe uma função hiperbólica entre essas duas variáveis, pois o produto da sensibilidade à insulina vezes a secreção de insulina é constante para um dado grau de tolerância à glicose. O produto entre SI e secreção de insulina foi denominado de índice de disposição de glicose. A relação hiperbólica também significa que uma modificação em uma das variáveis é espelhada por uma recíproca modificação na outra variável (BERGMAN E COL., 1981). A figura 4 exemplifica esta relação

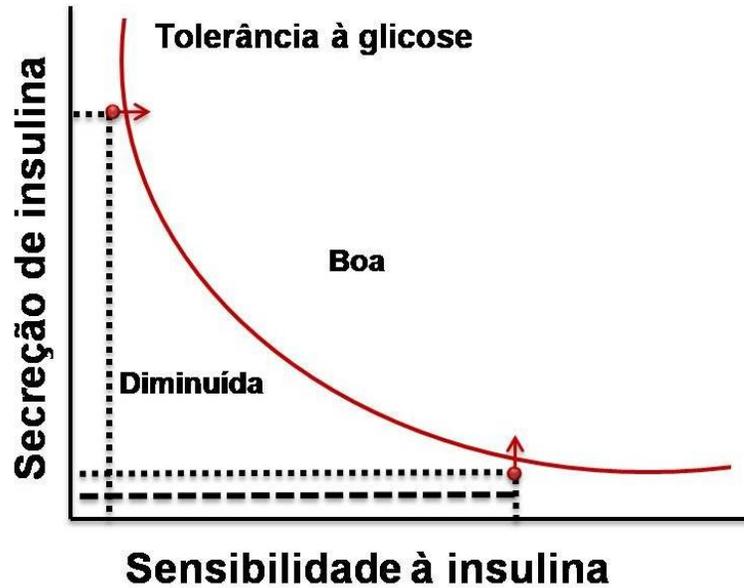


Figura 4: Relação hiperbólica entre sensibilidade à insulina e secreção de insulina. Adaptado de Kahn e col., 1993.

A tolerância à glicose encontra-se diminuída se o indivíduo estiver localizado abaixo da hipérbole e normal se o indivíduo estiver localizado acima da linha. As setas indicam possíveis abordagens terapêuticas para o indivíduo se mover da área de tolerância diminuída para a normal, por meio de melhora na sensibilidade à insulina e na sua secreção.

Os testes laboratoriais para avaliação da capacidade funcional das células- β podem ser divididos em:

1.4 Testes realizados em jejum

Os testes em jejum se baseiam na avaliação da homeostase glicêmica. Eles dependem fortemente da precisão dos ensaios utilizados, pois pequenos erros nas dosagens podem afetar significativamente os índices calculados. Dessa forma, a comparação entre diferentes estudos só é possível com a padronização dos ensaios de insulina (VASQUES E COL., 2008). Esse são os principais teste de jejum:

1.4.1 Insulina basal

A utilização da insulina plasmática de jejum para avaliação da função de célula- β é uma abordagem clássica, porém é menos acurada, pois apresenta inúmeras dificuldades metodológicas: a insulina possui uma meia vida curta (4 minutos) e após a sua secreção na veia porta ela sofre extração hepática da ordem de 50-60% e passa por uma depuração periférica significativa e variável sob diferentes condições metabólicas. Além disso, a insulina tem reação cruzada com a pró-insulina, sofre interferência dos anticorpos anti-insulina, e ainda existe a ineficácia na distinção de insulina endógena da exógena. Assim, a simples utilização da insulinemia periférica reflete parcialmente a secreção de insulina (MARI & PACINI., 2007).

1.4.2 Peptídeo-C basal e Método de deconvolução

O peptídeo-C plasmático é um indicador da secreção pancreática, pois é secretado em concentrações equimolares com a insulina. O peptídeo-C não sofre extração hepática, possui uma depuração periférica relativamente constante e uma meia vida mais longa que a da insulina (30 minutos). Em função dessas características, a medida do peptídeo-C plasmático pode ser utilizada com a finalidade de evitar o problema da não constância da depuração da insulina (EATON E COL., 1980), pois a dosagem do peptídeo-C plasmático juntamente com a dosagem da insulina sérica permite a reconstrução da taxa de secreção pancreática de insulina de forma mais precisa (MARI E PACINE., 2007) através da utilização de técnica matemática de deconvolução. A deconvolução é uma operação matemática na qual a taxa de secreção de insulina é calculada por meio da concentração do peptídeo-C plasmático. A convolução, operação inversa, é a representação matemática da relação entre taxa de secreção de insulina e concentração plasmática de peptídeo-C. O determinante dessa relação é a concentração plasmática de peptídeo-C em resposta a uma injeção em bolo de peptídeo-C biossintético, a qual descreve quantitativamente a cinética do peptídeo-C. Uma vez conhecida a cinética do peptídeo-C, é possível inverter o operador de convolução e calcular a taxa de secreção do peptídeo-C a partir de sua própria concentração. A padronização de

constantes extraídas de variáveis, com interferência na cinética do peptídeo-C (sexo, idade, grau de obesidade e nível de tolerância à glicose) a partir de uma amostra bastante heterogênea e com um n considerável de 200 indivíduos foram realizadas por Van Couter e cols. (1992). Com essa abordagem, o estudo da secreção de insulina pela célula-beta, a partir da dosagem do peptídeo-C, pode ser realizado levando em consideração sua cinética e permitindo estimar a secreção de insulina de forma mais acessível e acurada, com variações de apenas 10 a 12% em relação aos dados de cinética do peptídeo-C obtidos individualmente.

1.4.3 HOMA

O modelo de avaliação da homeostase (Homeostasis Model Assessment), refere-se a um modelo matemático o qual postula-se que a deficiência da secreção de insulina pelas células- β pode ser determinada a partir da hiperglicemia apresentada, uma vez conhecida a quantidade de insulina secretada para uma determinada concentração glicêmica (MATTHEWS E COL., 1985). O modelo possibilita o cálculo dos índices HOMA1- β , para a função das células- β e HOMA1-IR, que avalia o nível de resistência à insulina a partir dos valores de glicemia e a insulinemia basais obtidos da mesma amostra. As fórmulas para o cálculo dos dois índices são:

$$HOMA_{\beta} = 20 \times IJ / (GJ - 3,5) \quad (\text{eq. 01})$$

$$HOMA_{IR} = IJ \times GJ / 22,5 \quad (\text{eq. 02})$$

Onde IJ corresponde à insulinemia de jejum em mU/l, e GJ , à glicemia de jejum em mmol/l. O HOMA- β não deve ser analisado de forma isolada mas sim em conjunto com a resistência à insulina. Indivíduos com elevada sensibilidade à insulina secretam menos insulina e, nesses casos, a avaliação isolada pode levar ao diagnóstico falso-positivo de disfunção da célula-beta (WALLACE E COL., 2004). Foram encontradas fortes correlações entre a RI avaliada pelo HOMA e pelo *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, método padrão ouro para avaliação da RI. Porém, o HOMA é questionável porque assume que a RI seria a mesma no fígado e tecidos periféricos. Ainda assim é uma boa alternativa às técnicas mais sofisticadas (DEFRONZO., 1979).

1.5 Testes dinâmicos

Os testes dinâmicos fornecem uma avaliação mais confiável da secreção de insulina que os testes em jejum. Proporcionam uma obtenção das medidas da secreção de insulina independentes dos índices de sensibilidade à insulina (AHRÉN E COL., 2004). A utilização dos testes dinâmicos faz-se necessária para uma avaliação funcional da célula beta, porém um teste isolado não é capaz de revelar a função da célula beta, além disso não existe um padrão ouro para avaliar seu funcionamento, em virtude da complexidade de resposta desta célula (MARI E PACINI, 2007). A utilização de vários testes dinâmicos se complementam e quanto maior for o número de informações obtidas dos mesmos, melhor será a aproximação da secreção de insulina sob condições fisiológicas (COBELLI E COL., 2007). Mencionaremos os seguintes teste de estímulo:

1.5.1 Teste de tolerância oral a glicose

O teste de tolerância oral à glicose (TTGO) é bastante utilizado para avaliação da função das células- β em estudos epidemiológicos devido à sua facilidade de aplicação e ao relativo baixo custo (STUMVOLL E COL., 2000). O TTGO possui uma abordagem relativamente simples, o teste convencional consiste na ingestão oral de 300ml de solução glicosada contendo 75g de glicose em cinco minutos, após um jejum noturno de 8 a 12 horas. As determinações da glicose, insulina e ou peptídeo-C plasmáticos são realizadas durante duas a três horas. Em geral a glicemia é avaliada nos tempos zero, pré-carga, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Os cálculos para a análise da função das células- β a partir dos dados obtidos no TTGO não podem ser realizados em termos absolutos de concentração de insulina, uma vez que a taxa de aparecimento da glicose ingerida no plasma varia muito de indivíduo para indivíduo por causa da velocidade de absorção da glicose no trato digestivo e também da influência dos hormônios gastrointestinais. Além do mais, a própria sobrecarga de glicose pode induzir variados graus de supressão na produção hepática de glicose, bem como pode induzir a sua própria metabolização.

Diante dessas dificuldades, a sensibilidade tecidual à insulina e a função das células- β devem ser determinadas a partir de equações que possuem bases empíricas ou que são derivadas de modelos matemáticos. A validade desses índices depende claramente da validade dessas pressuposições e esta é a principal deficiência do teste (MARI E COL., 2001).

1.5.2 Teste de refeição padrão

O teste de refeição padrão (TRP) possui a mesma interpretação e cálculos semelhantes aos utilizados para o TTGO. Seu grande diferencial diz respeito à ingestão de alimentos contendo não somente a glicose, mas também outros macronutrientes como proteínas, lipídeos e inclusive outros tipos de carboidratos, os quais estimulam a secreção de insulina e de incretinas de forma diferente, que aproxima ainda mais de uma situação fisiológica ou normal (KARHUNEN, 2008). Em geral, os protocolos são realizados com o paciente após jejum de 12 horas, com a ingestão da refeição dentro de 10 minutos, com coletas de sangue nos tempos -15, zero, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 (DALLA E COL., 2005). Entre os índices empíricos obtidos a partir do TRP, o mais utilizado para avaliação da secreção de insulina é o índice insulinogênico, calculado da seguinte maneira:

$$\text{Índice_insulinogênico} = (I_{30} - I_0)/(G_{30} - G_0) \quad (\text{eq. 03})$$

onde, I_{30} e I_0 correspondem à insulinemia nos tempos 30 e 0 minutos, respectivamente, e G_{30} e G_0 à glicemia nestes mesmos intervalos. Apesar da facilidade para o cálculo deste índice e da sua habilidade em detectar anormalidades na função da célula- β em circunstâncias diferentes, ele não possibilita a avaliação específica da secreção insulina, como por exemplo, o padrão bifásico de secreção. Foram desenvolvidas equações preditoras da secreção de insulina pelo TRP por meio de análise de regressão linear múltipla com a utilização de dados clínicos (idade, sexo e índice de massa corporal) e os resultados obtidos nos testes de *clamp*

hiperglicêmico. As equações para predição da primeira e da segunda fase de secreção de insulina estão apresentadas a seguir :

$$1^{\text{a}} \text{ fase} = 1283 + (1,829 \times I_{30}) - (138,7 \times G_{30}) + (3,772 \times I_0) \quad (\text{eq. 04})$$

$$2^{\text{a}} \text{ fase} = 287 + (0,4164 \times I_{30}) - (26,07 \times G_{30}) + (0,9226 \times I_0) \quad (\text{eq. 05})$$

Outros índices que se baseiam nas áreas sob as curvas de glicemia e insulinemia também são utilizados no teste de refeição padrão.

1.5.3 Teste do *clamp* hiperglicêmico

A avaliação da capacidade funcional das células- β necessita da determinação da resposta secretória de insulina para um dado estímulo. Andrés e colaboradores, em 1966, foram os pioneiros em trabalhar com a técnica de *clamp*. Naquela época, esses autores perceberam as limitações dos testes disponíveis para avaliação da sensibilidade à insulina, principalmente no que diz respeito à baixa reprodutibilidade dos mesmos. Posteriormente, DeFronzo e colaboradores em 1979 desenvolveram a técnica do *clamp* de glicose e suas principais variações: o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico e o *clamp* hiperglicêmico. Sendo este último é um excelente teste para avaliar a primeira e a segunda fase de secreção de insulina (GELONEZE E TAMBASCIA, 2006), permitindo examinar a resposta secretória de insulina à glicose e quantificar o consumo do organismo como um todo, sob condições constantes de hiperglicemia. A técnica do *clamp* hiperglicêmico pode ser usada para fornecer uma medida acurada da sensibilidade e secreção de insulina em pessoas idosas (MENEILLY E COLS., 1998), esses autores encontraram uma excelente correlação entre o índice de sensibilidade à insulina derivado do *clamp* hiperglicêmico e os estudos de *clamp* euglicêmico composto de indivíduos idosos não diabéticos e com diabetes ($r = 0,76$ e $r = 0,71$ respectivamente), sendo o *clamp* hiperglicêmico um dos testes dinâmicos utilizados nesta dissertação.

1.5.4 Teste de arginina: resposta aguda à Insulina

Alguns aminoácidos têm a capacidade de potencializar a ação da glicose, aumentando a secreção de insulina, tais como a leucina, alanina e arginina, sendo este último um potente secretagogo de insulina. A secreção aguda de insulina em estado de hiperglicemia é um indicador da capacidade secretória total da célula- β e utilizada como uma medida aproximada da massa de célula beta residual (MCCULLOCH, 1991).

A arginina, após injeção intravenosa, entra na célula beta através dos transportadores aminoácidos catiônicos (CAT2A) e somente então exerce mudanças de positividade e induz despolarização da membrana com influxo de cálcio e liberação de insulina. A arginina ao contrário da glicose, ainda desencadeia uma secreção de insulina rápida em pacientes com DM2 devido ao seu diferente modo de ação sobre as células- β pancreáticas.

Os experimentos com o teste de arginina são freqüentemente realizados após o teste de tolerância intravenosa à glicose ou após o teste de *clamp* hiperglicêmico, nos quais já existe um quadro hiperglicêmico decorrente das 3 horas do *clamp*. Os trabalhos publicados variam quanto aos valores de hiperglicemia alcançados antes da administração de arginina entre 90-350 mg/dl, podendo-se ainda atingir um platô médio de 460mg/dl a 615mg/dl (WARD e COL., 1984). Não existe um padrão para o teste de arginina, ainda são levemente divergentes do que o IVGTT. Na maioria dos testes a dose de arginina administrada é de 5g, podendo algumas vezes ser ajustada pelo peso (0,125g/kg) a duração da injeção varia de 30 segundos a um minuto. O condicionamento pré-teste é similar a do IVGTT: amostras de sangue são colidas nos tempos T-5, T-10, T0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10 min. A tabela 2 a seguir mostra um resumo dos principais testes utilizados para avaliar função de célula- β :

Tabela 2 - Características dos principais testes utilizados para avaliar a função da célula-beta

Testes	Protocolos	Cálculos	Considerações
IVGTT	Regular: bolo de glicose intravenoso e coletas de sangue por 3 a 4 horas. Modificado: protocolo regular + injeção de insulina administrada aos 20 minutos do teste.	- 1ª fase de secreção de insulina e 2ª fase de secreção de insulina empírica. - SI e HE de insulina.	- Não se aplica em indivíduos com deficiência intensa na secreção de insulina. - Infusão de insulina pode causar hipoglicemia, liberar hormônios contra-reguladores e subestimar a SI. - Demorado. - Alto custo.
Clamp hiperglicêmico	Controle basal, seguido da infusão de glicose em bolo para elevar a glicemia a um valor alvo desejado, com posterior infusão contínua de glicose para manter a glicemia no platô hiperglicêmico por 2 a 3 horas.	- 1ª e 2ª fases de secreção de insulina. - SI e HE de insulina.	
Teste de arginina	Infusão intravenosa em bolo de 5g de arginina com coletas de sangue nos 10 min. subseqüentes. Realizado após IVGTT ou <i>clamp</i> hiperglicêmico, em que já existe um quadro hiperglicêmico, o qual ainda pode ser elevado (~ 450 mg/dl).	- Resposta máxima aguda da secreção de insulina.	- Pode causar desconforto ao avaliado (Cãibras e queda de pressão). - Não permite avaliação da SI. - Alto custo.
TTGO	Controle basal, seguido da ingestão de solução com 75 g de glicose, seguidos de coletas de sangue por 2, 3 ou 4 horas.	- Equações empíricas ou modelos matemáticos para função da célula-beta, SI e HE de insulina.	- Requerem métodos apropriados de normalização da resposta secretória para um dado estímulo, pois equações empíricas podem gerar valores discrepantes.
Teste de refeição padrão	Controle basal, seguido da ingestão de alimentos contendo diversos macronutrientes. As coletas de sangue são realizadas durante as 3 horas subseqüentes à ingestão.		

Fontes: (FERRANNINI E MARI., 2004; COBELLI E COL., 2007)

HE: extração hepática, IVGTT: testes de tolerância à glicose intravenosa, SI: sensibilidade à insulina; TTGO: teste de tolerância oral à glicose.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a fisiopatologia do DM2 com início na meia-idade e na senectude e comparar com indivíduos de meia-idade e na senectude com tolerância normal à glicose.

2.2 Objetivo específico

- Determinar as mudanças patológicas relacionadas a sensibilidade à insulina, função de célula- β , adipocitoquinas e produção de incretinas do DM2 iniciado após os 60 de idade.
- Comparar a capacidade secretória das células- β pancreáticas com indicadores antropométrico de composição corporal e metabólico

3 Material e métodos experimentais

3.1 Delineamento do estudo e cálculo amostral

Estudo transversal conduzido com 50 pacientes. O cálculo amostral foi estimado por meio do software MedCalc 9.3, por meio do método de amostragem para comparação de duas médias. As áreas abaixo da curva para o hormônio GLP-1 em indivíduos normotolerantes à glicose e diabéticos tipo 2 foram consideradas como principal variável de interesse para análise dos resultados. Para tal, dados de literatura foram levados em consideração como referência para os cálculos. Considerando-se um erro alfa de 1% e um erro beta de 10%, o n necessário para identificar significância estatística foi de 46 indivíduos. Portanto, optamos por estudar 50 indivíduos, compondo cada grupo com 25 pacientes, assegurando possíveis perdas amostrais de forma que não venham a comprometer as análises futuras.

A seleção dos voluntários foi realizado no ambulatório do Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes – LIMED / UNICAMP, todos selecionados conforme os critérios apresentados na figura 5 a seguir. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Os candidatos forneceram consentimento livre e esclarecido por escrito antes de participar de qualquer atividade da pesquisa.



Figura 5: D Diagrama de representação da amostra. TNG = Tolerância normal à glicose; DM2 = diabetes tipo 2

3.1.1 Critérios de inclusão

- Peso estável (variação < 5% nos últimos 3 meses);
- Idade: 35 a 50 anos para o grupo meia-idade, e 60 a 80 anos para os idosos;
- IMC: entre 20 e 29,9 kg/m²;

- DM2 com diagnóstico acima dos 35 anos e há menos de 5 anos (grupo meia-idade);
- DM2 com diagnóstico acima de 60 anos e há menos de 5 anos (grupo idosos);
- Tratamento oral antidiabético, com dose estável pelo menos nos últimos 3 meses
- Não ter participado de estudos com intervenção clínica durante os últimos 6 meses.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Uso de estrógeno, progesterona, esteróides, insulina e antipsicóticos ativos;
- Uso contínuo de glitazona;
- Uso contínuo ou de um mês antes da avaliação de inibidores da DPP-IV e incretinomiméticos;
- Não fazer uso de nenhuma outra medicação que alterasse a sensibilidade à insulina;
- Presença de cirrose hepática, falência renal ou qualquer outra condição clínica que prejudique a sensibilidade à insulina;
- Fumo;
- Doenças clínicas relevantes;
- DM2 tratado por métodos não farmacológicos;
- Pacientes submetidos à cirurgia bariátrica;
- Diabetes autoimune latente do adulto (anticorpos positivos para anti-GAD).

Os cinquenta pacientes de ambos os sexos foram distribuídos em 4 grupos de indivíduos como mostra a figura 5. Os voluntários com diagnóstico de DM2 tinham menos de 5 anos de doença. Todos os participantes foram avaliados com exames bioquímicos, avaliações antropométricas, de composição corporal e submetidos a

testes dinâmicos: o teste de refeição padrão, o teste de *clamp* hiperglicêmico uma semana após a consulta inicial, e o teste de estímulo com arginina logo após a realização do *clamp* hiperglicêmico.

3.2 Diagnóstico, exames e técnicas

Os voluntários selecionados no ambulatório tiveram o diagnóstico de tolerância normal à glicose ou de diabetes tipo 2 confirmado segundo os valores do teste de glicemia de jejum e do teste de 2h após-sobrecarga de 75g glicose, realizados após jejum noturno de 12 horas. Na tabela 3 estão apresentados os pontos de corte para o diagnóstico.

Tabela 3: Valores de glicose plasmática para diagnóstico de diabetes mellitus

Categoria	Jejum	2h após 75g de glicose
Glicemia normal (mg/dL)	< 100	< 140
Diabetes <i>mellitus</i> (mg/dL)	≥ 126	≥ 200

Fonte: SBD (2007)

3.2.1 Anamnese

Foi realizada uma anamnese para coleta de dados demográficos, história médica pregressa e antecedentes familiares de doenças de interesse: obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio, angina, acidente vascular cerebral e dislipidemias. Também foram coletadas informações referentes aos hábitos de vida, incluindo prática de exercício físico (modalidade, frequência e duração), tabagismo e consumo de bebida alcoólica.

3.2.2 Avaliação dos sinais vitais

As aferições da frequência cardíaca de repouso e da pressão arterial foram realizadas seguindo as normas propostas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007).

3.2.3 Avaliação antropométrica, composição corporal e gordura visceral

A avaliação antropométrica foi realizada por um único avaliador. Foram aferidos peso, estatura, diâmetro abdominal sagital e perímetros do pescoço, da cintura, do quadril e da coxa. O peso foi aferido em balança eletrônica digital e a estatura em estadiômetro fixo na parede. O diâmetro abdominal sagital foi aferido com o *caliper* abdominal - *Holtain Khan Abdominal Caliper*[®], equipamento desenvolvido exclusivamente para a realização dessa medida. Os perímetros foram aferidos com fita métrica flexível inelástica. As medidas foram tomadas em duplicatas. Em situações em que houve diferença > 1 cm entre as duas medidas foi realizada uma terceira medida, sendo utilizados os dois valores mais próximos (Williamson e cols., 1993). O IMC foi calculado a partir das medidas de peso e altura e foi apresentado em Kg/m^2 , sendo utilizado o critério da WHO (2000) para classificação do estado nutricional.

O percentual de gordura corporal foi avaliado por bioimpedância elétrica com a utilização do equipamento *Bioimpedance Analyzer* - BIA 310. Antes da realização da bioimpedância, cada voluntário foi orientado a seguir o protocolo proposto por Lukaski e cols. (1986), exposto na tabela 4. Todos os exames foram realizados pelo mesmo observador em triplicata. As figuras 6 e 7 mostram as realizações das medidas corporais de circunferência abdominal e bioimpedância, respectivamente:

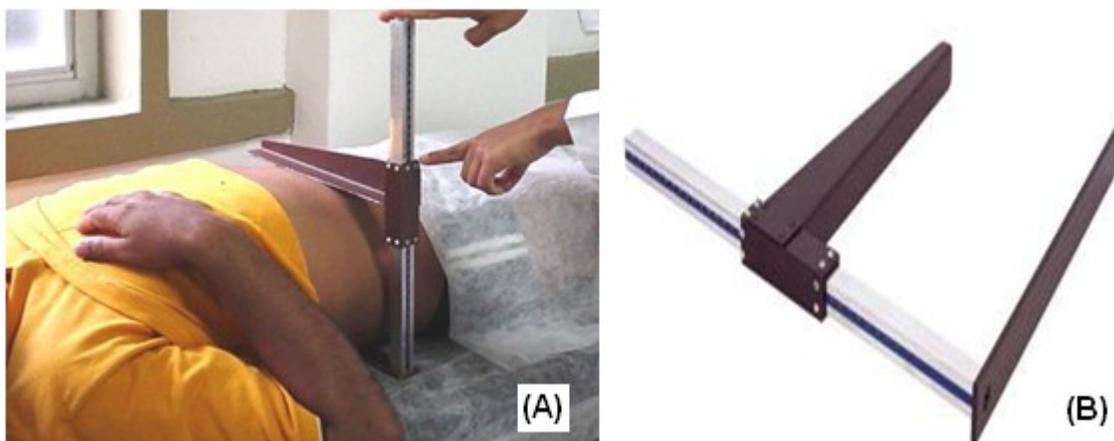


Figura 6: (a) Medida do diâmetro abdominal sagital; (b) Instrumento caliper abdominal

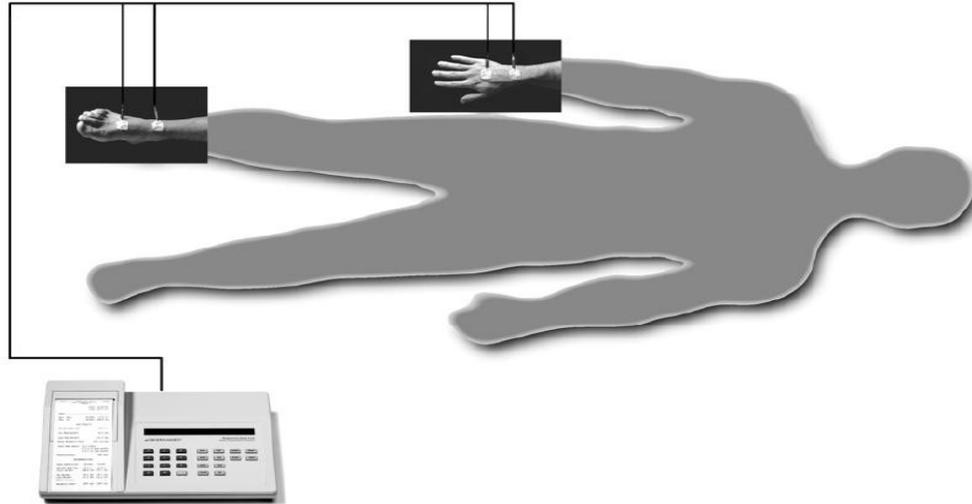


Figura 7: Teste de bioimpedância

Tabela 4: Protocolo para a realização do teste de bioimpedância

Recomendações
<ul style="list-style-type: none">▪ Não fazer uso de nenhum diurético nos 7 dias que antecedem o teste;▪ Não consumir bebidas alcoólicas nas 48 horas anteriores ao teste;▪ Não realizar atividade física extenuante nas 24 horas anteriores ao teste;▪ Estar em jejum de alimentos, bebidas e água por 4 horas antes do teste;▪ Urinar pelo menos 30 minutos antes da realização do teste;▪ Permanecer 5 minutos deitado, em decúbito dorsal, antes da execução do teste.

3.2.4 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os exames de rotina para o ambulatório foram realizados por métodos padronizados pelo laboratório central do Hospital das Clínicas - UNICAMP. Foram eles: hemograma, creatinina, glicemia (método glicose oxidase), colesterol total, HDL, LDL, triglicérides, ácido úrico, GGT (método colorimétrico-enzimático), hemoglobina glicada (método HPLC), AST, ALT, proteína C-reativa (quimioluminescência) e leucograma (contagem global automatizada). As demais dosagens foram realizadas

no Limed – Gastrocentro: A insulina foi mensurada por Elisa, usando um *kit* de insulina humana com reação cruzada negativa com a pró-insulina (Lincoln Research, St. Louis, MO). Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio foram 2,9 a 9,4%, e 5,5 a 8,5%, respectivamente. O peptídeo-C foi mensurado pelo método de eletroquimioluminescência. O glucagon foi medido pelo método de radioimunoensaio (Lincoln Research) com um CV intra e inter-ensaio variando de 1,7 a 8,5%. O GLP-1 e GIP foram mensurados por Elisa (Lincoln Research) com CV de 3 a 8% e 5,7 a 9%. Os ácidos graxos livres e as concentrações de adipocitoquinas foram mensurados por Elisa (R&D Systems, Minneapolis, MN) com CVs abaixo de 10%.

3.2.5 Teste de refeição padrão

A produção de incretinas foi avaliada pelo teste de refeição padrão. Um cateter venoso foi colocado na região antecubital, o qual foi utilizado apenas para coleta de sangue. O paciente permaneceu em repouso absoluto por pelo menos 5 minutos antes da primeira coleta de sangue. Após jejum de 12 horas, os pacientes receberam uma refeição padrão, composta por 237ml de *Ensure Plus* HN e uma barra de *Animal Bar* (40g). O total calórico e os conteúdos de gordura, carboidrato e proteína da refeição foram respectivamente 521,5Kcal, 31,6%, 49,4% e 19% e esta foi ingerida em até 10 minutos. O final da ingestão dos alimentos foi considerado tempo zero. O voluntário permaneceu sentado ou deitado durante todo o período do teste.

As amostras de sangue foram coletadas nos tempos -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Foram utilizados para a coleta os seguintes tubos: tubos secos (sem reagente) e tubos com EDTA K3, EDTA K3 com aprotinina (Trasylol – A-6012, Sigma) e EDTA K3 com diprotina A (Ile Pro Ile – I-9759, Sigma). Os tubos secos permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foram colocados no gelo ou refrigerados. Os demais tubos foram colocados imediatamente no gelo ou refrigerados e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi separado em tubos com tampa, em alíquotas de 1ml e usado para as análises bioquímicas. O restante do sobrenadante foi armazenado a -20 ou -80°C por 6 meses para redosagem em situação de resultados controversos.

3.2.6 Técnica do *clamp* hiperglicêmico

A secreção de insulina pelas células- β foi avaliada pela técnica de *clamp* hiperglicêmico proposta por DeFronzo e cols. (1979), com algumas adaptações, de forma a garantir maior acurácia nos resultados. Esta técnica, padrão-ouro para a avaliação da secreção de insulina, consiste na infusão endovenosa de glicose (o bolus intravenoso de glicose extrai grandes quantidades de secreção de insulina), com o objetivo de aumentar a glicemia agudamente, e a infusão de glicose é mantida em um platô hiperglicêmico fixo por 2 horas. A hiperglicemia estimula a secreção bifásica de insulina e a captação de glicose é aumentada. Entre 2 a 3 horas o estado de equilíbrio é alcançado, sendo que os níveis de insulina variam de acordo com a resposta individual da célula- β .

Antes da realização do *clamp*, os pacientes em uso de medicação anti-diabética oral tiveram a sua administração suspensa respeitando a meia-vida de cada medicamento.

Para a realização do *clamp*, cada voluntário foi orientado a consumir uma dieta para manutenção do peso corporal, contendo pelo menos 200 gramas de carboidratos por dia e 0,8g/kg de proteína nos três dias anteriores ao teste. No dia do *clamp*, cada voluntário compareceu ao laboratório às 8 horas, após jejum noturno de 12 horas.

O voluntário foi pesado em balança eletrônica digital e posteriormente assumiu decúbito dorsal confortável. Foram realizadas duas punções venosas com cateter tipo venocan. A primeira retrógrada em veia antecubital, onde foram coletadas as amostras de sangue para a dosagem de glicose, insulina e peptídeo-C. A segunda no antebraço, próximo ao cotovelo, onde posteriormente foi infundida solução glicosada hipertônica, ambas mantendo-se pérvio com solução fisiológica contínua a 0,9%. A mão onde foi puncionada a veia antecubital permaneceu em caixa aquecida entre 50 e 60°C para arterialização do sangue venoso. Para controle do processo de arterialização, foi avaliada a pO₂ na veia antecubital nos dez primeiros *clamps*.

Por 30 minutos, antes do início da infusão de glicose a 50%, foram colhidas três amostras basais a cada 15 minutos, para dosagem da glicose, insulina e peptídeo-C plasmáticos. A infusão de glicose foi dividida em duas fases: “primeira dose”, que compreendeu uma quantidade suficiente de glicose para elevar a glicemia ao platô

desejado e a “dose de manutenção” que foi calculada a cada intervalo de 5 minutos ao longo do teste. A primeira dose foi infundida em bolo, sendo a quantidade de glicose baseada no peso corporal e na glicemia inicial de cada indivíduo, e foi elevada agudamente a 180mg/dL, segundo a fórmula (Pimenta e cols., 1995):

$$Bolo_inicial_glicose(mL) = 2 \times \frac{Peso(kg) \times 1,5 \times [180(mg/dL) - glicemia_inicial(mg/dL)]}{1000} \quad \text{eq. 06)}$$

Imediatamente após a infusão, a glicemia de 180mg/dL foi mantida por três horas por meio de infusão variável de glicose em bomba de infusão. As quantidades infundidas foram baseadas através dos cálculos derivados dos resultados das medidas de glicemia dosadas a intervalos de 5 minutos no equipamento *Glucose Analyser* em amostras de 1mL. Nos primeiros dez minutos do *clamp*, foram coletadas amostras de sangue a cada 2,5 minutos, e depois a cada 5 minutos. A glicose foi dosada em todas as amostras. A insulina e o peptídeo C foi igualmente quantificados durante os vinte minutos iniciais do *clamp* e depois até o final do estudo, a cada vinte minutos. A figura 8 seguinte ilustra o esquema para as coletas de sangue e suas respectivas dosagens durante o *clamp* hiperglicêmico.

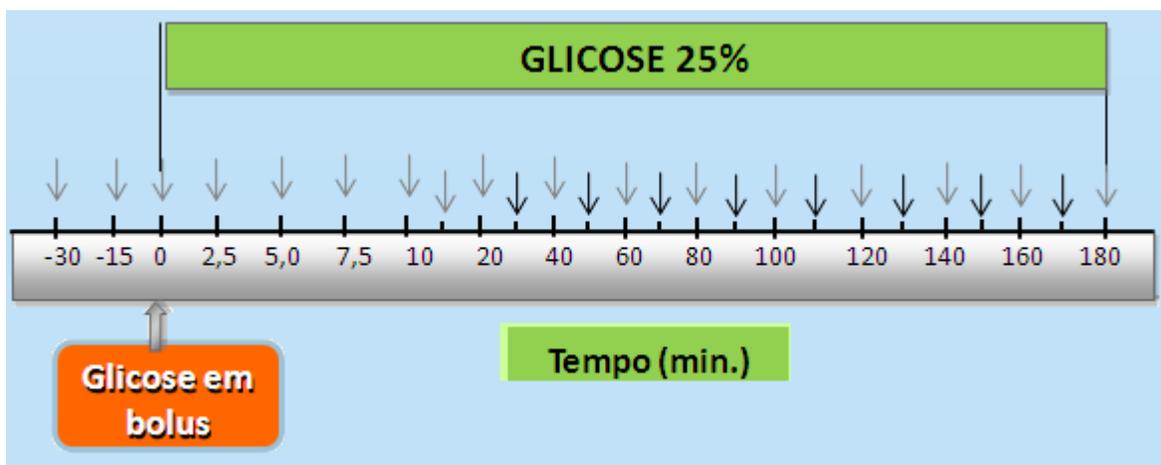


Figura 8: Esquema para as coletas de sangue e suas respectivas dosagens durante o *clamp* hiperglicêmico.

Simbologia:

- Dosagem de glicose
- Dosagem de glicose, insulina e peptídeo C

Ao final do *clamp*, foram retiradas as vias de acesso venoso e arterial e foi oferecida uma refeição ao participante do estudo. O acompanhamento se estendeu até 1 hora após o período do teste.

A secreção de insulina foi avaliada pelo modelo de cinética do peptídeo-C padronizado por Van Couter e cols. (1992), o qual considera as seguintes variáveis de ajuste: sexo, idade, grau de obesidade e nível de tolerância à glicose. A primeira fase de secreção foi avaliada pelas dosagens realizadas nos primeiros 10 minutos. Para a segunda fase, foram computadas as dosagens realizadas na última hora do *clamp* hiperglicêmico, quando as concentrações de insulina e peptídeo-C estavam mais constantes, de acordo com o platô hiperglicêmico (Pimenta e cols., 1995).

A sensibilidade à insulina foi calculada pelo índice de sensibilidade à insulina (ISI), dividindo a média da taxa de infusão de glicose durante a última hora do *clamp*, menos a excreção urinária de glicose ocasional, pela média da insulinemia durante o mesmo período. Sob condições de equilíbrio hiperglicêmico, a taxa de glicose infundida (TIG) forneceu uma estimativa da quantidade de glicose metabolizada pelos tecidos, uma vez que a produção endógena de glicose foi suprimida. Este valor, dividido pela resposta insulinêmica plasmática (segunda fase de secreção de insulina) proporcionou uma estimativa da sensibilidade tecidual à insulina endógena secretada pelo pâncreas.

3.2.7 Teste de arginina: Resposta aguda à Insulina

A resposta aguda à insulina foi obtida através do teste de estímulo com arginina após decorridos os 180 minutos do término do *clamp* hiperglicêmico, para isso foi ministrada glicose em bolus de Dextrose 25% (50g), seguida de uma infusão variável de glicose que manteve o nível da glicemia entre 20 e 25mmol/litros (360 a 450mg/dl) por, no mínimo, 30 minutos. No tempo basal, foram obtidas amostras de sangue para dosagens de glicose e insulina e, então um bolus de 5g de arginina foi administrado intravenosamente em 30 segundos. Após a injeção de arginina, amostras de sangue foram obtidas para dosar insulina e peptídeo c nos tempos 2, 3, 4, 6, 8, e 10 minutos.

3.2.8 Considerações sobre os cálculos

A resistência à insulina foi avaliada através do cálculo do HOMA-IR versão 2.2.2 (CALMO E COL., 2006).

As áreas sob as curvas de insulina, glucagon, GIP e GLP-1 foram obtidas através do teste de refeição padrão (TRP), utilizando um padrão trapezoidal.

O índice insulinogênico, avaliando a primeira fase de secreção de insulina, foi calculado através da equação 3, repetida aqui

$$IGI = (I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0) \quad (\text{eq. 03})$$

onde I_0 , G_0 e I_{30} , G_{30} são os valores da insulina e glicose nos tempos 0 e 30 minutos, respectivamente.

O cálculo da taxa de depuração metabólica da glicose foi obtida através da equação (STUMVOLL E COL., 2000):

$$MCR = 18,8 - 0,27 \times IMC - 0,0052 \times I_{120} - 0,27 \times G_{90} \quad (\text{eq. 08})$$

onde I_{120} , G_{90} são os valores da insulina e glicose nos tempos 120 e 90 minutos, respectivamente.

O índice de sensibilidade à glicose oral (OGIS) representa um índice de sensibilidade à insulina (SI) pela absorção da glicose, ajustado pela superfície corporal com um padrão alimentar, dando uma estimativa do índice de sensibilidade à insulina, podendo ser calculado através da equação abaixo (MARI E COL., 2001):

$$OGIS = f(G_0, G_{90}, G_{120}, I_0, I_{90}, D) \quad (\text{eq. 09})$$

onde G e I são as concentrações de glicose e insulina nos tempos subscritos indicados, D é a dose de glicose oral e f é uma função de ajuste complexa que pode ser obtida no sítio <http://webmet.pd.cnr.it/ogis/>, onde são dadas informações sobre a sua utilização e a teoria envolvida.

A primeira fase de secreção de insulina foi considerado no nível mais alto da insulina, nos primeiros 10 minutos do teste do *clamp* hiperglicêmico.

A segunda fase de secreção de insulina foi obtida através da média da secreção de insulina na última hora do *clamp* hiperglicêmico.

O índice de sensibilidade à insulina (ISI) foi calculado através da equação:

$$ISI = TIG/[média_concentração_insulina_2^{a}\ fase_secreção] \quad (eq. 10)$$

onde TIG representa a taxa de infusão de glicose durante a última hora do *clamp*.

O ISI e o TIG foram ajustados pelo índice de massa magra.

O índice de disposição foi calculado como o produto da primeira e segunda fase de secreção de insulina e do ISI.

A resposta aguda da secreção de insulina obtida no teste de arginina (AIRarg) foi calculada como o incremento da área sob a curva da insulina no intervalo de 0-10min, após a injeção intravenosa de 5 gramas de arginina por teste.

3.2.9 Análise Estatística.

A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram realizadas através do programa *IBM SPSS Statistics 20.0*.

Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk (FIELD., 2000) para avaliar a distribuição das variáveis. Para as variáveis com distribuição normal, os dados foram apresentados em “média ± desvio padrão” e para aquelas sem distribuição normal os dados foram apresentados em “mediana e variação interquartílica e/ou semi-amplitude interquartílica” (MULLER., 1994).

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os quatro grupos estudados (MI-TNG, I-TNG, MI-DM2 e I-DM2). O teste *post hoc* de Duncan foi utilizado para identificar quais grupos diferiram entre si. As correlações lineares entre as variáveis foram testadas usando o coeficiente de correlação de Pearson, uma vez que as análises avaliadas tinham distribuição normal. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.3 Aspectos Éticos

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo 10).

A obtenção do consentimento livre e esclarecido foi realizada pelo pesquisador principal, seguindo as orientações da resolução 196/96 do Ministério da Saúde. O esclarecimento verbal consistiu em uma explicação ao paciente, realizada pelo pesquisador, abrangendo os seguintes tópicos: objetivos da pesquisa; justificativa e procedimentos utilizados; riscos possíveis e benefícios esperados; forma de acompanhamento dos voluntários e assistência; sigilo quanto aos dados da pesquisa e liberdade de se recusar a participar, sem nenhuma forma de prejuízo.

O termo de consentimento livre e esclarecido foi apresentado pelo pesquisador ao indivíduo e, após anuência deste, foi preenchido e assinado em duas vias, uma para o voluntário e outra arquivada pelo pesquisador. Os voluntários receberam auxílio transporte, lanches e almoço nos dias de coleta de dados.

4 Resultados

4.1 Características dos participantes do estudo

As principais características clínicas, antropométricas e parâmetros metabólicos basais entre os grupos do estudo são apresentadas na tabela 5, onde observa-se que não há diferença entre os grupos com relação ao IMC, a pressão sanguínea. A distribuição central de gordura foi influenciada pela idade e pela presença de diabetes (a circunferência de cintura e a relação cintura quadril foram maiores nos grupos com DM2, tanto no MI-DM2 quanto nos I-DM2 e similares entre eles em comparação ao grupo MI-NTG. O diâmetro sargital abdominal, que é um método alternativo para avaliação de gordura visceral (VASQUES E COL., 2009), foi maior nos grupos de DM2, sendo o grupo de MI-DM2 e I-DM2 com resultados similares, em comparação ao grupo MI-NTG.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, a glicose plasmática de jejum e a hemoglobina glicada estavam aumentadas nos grupos com DM2, sendo MI-DM2 com GJ = 109 mg/dl (± 2) e HbA1c = 6,7% ($\pm 1,9$), e I-DM2 com GJ = 118 mg/dl (± 13) e HbA1c = 6,6% ($\pm 1,2$), tendo ambos $p < 0,01$ em relação aos grupos normotolerantes. Os níveis séricos dos ácidos graxos livres foram muito próximos nos grupos com DM2, sendo MI-DM2 com 1,99ng/dl ($\pm 0,26$) e I-DM2 com 2,0ng/dl ($\pm 0,22$). Os níveis séricos de adiponectina foram mais elevados no grupo MI-TNG [6,14ng/ml ($\pm 1,4$)] em relação aos demais grupos, sendo MI-DM2 com 3,8ng/ml ($\pm 0,83$), I-TNG com 3,22ng/ml ($\pm 0,48$) e I-DM2 com 3,6ng/dl ($\pm 0,71$). Quanto ao nível sérico da PCR-us, esse foi mais elevado no grupo I-TNG [0,66 mg/dl ($\pm 1,5$)] em comparação ao grupo MI-TNG [0,13mg/dl ($\pm 0,1$)], já para os grupos com DM2, os valores foram próximos, sendo MI-DM2 com 0,25mg/dl ($\pm 0,2$) e I-DM2 com 0,31mg/dl ($\pm 0,4$). No tocante aos demais parâmetros laboratoriais, como o ácido úrico, creatinina, perfil lipídico e transaminases, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Tabela 5: Principais características clínicas, antropométricas e parâmetros metabólicos basais entre os grupos do estudo.

Variáveis	Meia idade TNG	Meia idade DM2	Idoso TNG	Idoso DM2
Pacientes (homem/mulher)	13 (3/10)	14 (3/11)	10 (4/6)	12 (1/11)
Idade (anos)	44 ±4	47 ±3	64 ±2	66 ±3
IMC (Kg/m ²)	23,7 ±3,8	27,4 ±1,9	27,7 ±3,6	28,6 ± 3,4
Circunferência da cintura (cm)	85,1 ±8,7	96,9 ±7,9	92,9 ±7,2	100,5± 8,2
Diâmetro abdominal sagital (cm)	17,5 ± 2,6	22,2 ±1,8	20,5 ±2,7	22,2± 2,9
Relação cintura/quadril	0,86 ±0,05	0,96 ±0,1	0,91 ±0,1	0,96± 0,1
Percentual de gordura corporal (%)	29,8 ± 5,6	28,9 ±4,5	33,8 ±5,7	36,6 ±5,4
Pressão arterial sistólica (mm/Hg)	114 ±14	124 ±10	122 ±20	115 ±10
Pressão arterial diastólica (mm/Hg)	79 ±10	81 ±10	79 ±14	78 ±8
Glicemia de jejum (mg/dL)	88 ±6	109 ±2	90 ±6	118 ±13
Insulina basal (mU/L)	4,76 ±2,7	10,05 ±4,4	9,4 ±5,6	13,42 ±7,1
Hemoglobina glicada (%)	4,7 ±0,7	6,7 ±1,9	5,6 ±0,1	6,6 ±1,2
Colesterol total (mg/dL)	190,8 ±26	174,4 ±28	201,6 ±36	188,7 ±47
HDL colesterol (mg/dL)	58 ±17	42 ±10	49 ±13	48 ±10
LDL colesterol (mg/dL)	114 ±29	116 ±29	129± 30	115 ±43
Triglicérides (mg/dL)	96 ±55	132 ±55	118± 47	142 ±61
Ácido úrico (mg%)	4,06 ±0,1	5,21 ±0,8	5,8± 1,8	5,25 ±0,8
Creatinina (mg/dL)	0,72 ±0,1	0,84 ±0,3	0,8 ±0,2	0,82 ±0,3
Proteína C reativa (mg/dL)	0,13 ±0,1	0,25 ±0,2	0,66± 1,5	0,31 ±0,4
Gamaglutamil transferase (U/L)	16 ±11	52 ±24	35 ±46	52 ±81
Alanina-amino-transferase (U/L)	17 ±6	31 ±9	20 ±15	25 ±9
Aspartato-amino-transferase (U/L)	18 ±4	26 ±8	22 ±9	23 ±8
Adiponectina (ng/mL)	6,14 ± 1,4	3,8 ± 0,8	3,22 ± 0,4	3,6 ± 0,7
Ácidos graxos livres (ng/mL)	1,46 ± 0,2	1,99 ± 0,2	1,47 ± 0,1	2,0 ± 0,2

Dados são mostrados como médias e desvio padrão (DP). IMC=índice de massa corporal.

4.2 Sensibilidade à insulina

Foram calculados 5 índices de SI: (i) HOMA-IR, (ii) taxa de depuração metabólica da glicose (MCR), (iii) sensibilidade à insulina através da glicose oral (OGIS), (iv) taxa de infusão de glicose (TIG) e o (v) índice de sensibilidade à insulina (ISI). Esses índices serão comentados a seguir:

4.2.1 HOMA-IR

O HOMA-IR foi aumentado em todos os grupos com DM2 e também no I-NTG em comparação ao grupo MI-TNG ($p < 0,001$), conforme mostra figura 9 abaixo:

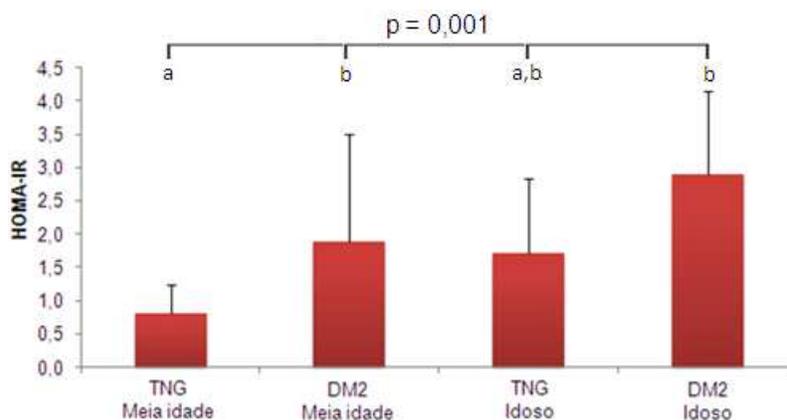


Figura 9: HOMA-IR dos quatro grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Duncan

Observação : a simbologia representada pelas letras *a*, *b* (e eventualmente *c*) na parte superior dos gráficos representam paridade estatística, letras iguais indica probabilidades semelhantes entre os grupos e letras diferentes indicam presença de diferença estatística significativa. Essa descrição serve para todos os demais gráficos que possuem essa simbologia.

4.2.2 Depuração metabólica da glicose

A taxa de depuração metabólica da glicose foi reduzida nos grupos com DM2 e I-TNG em comparação ao grupo MI-TNG ($p < 0,001$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos com DM2 e o grupo I-TNG, conforme ilustra a figura 10 a seguir:

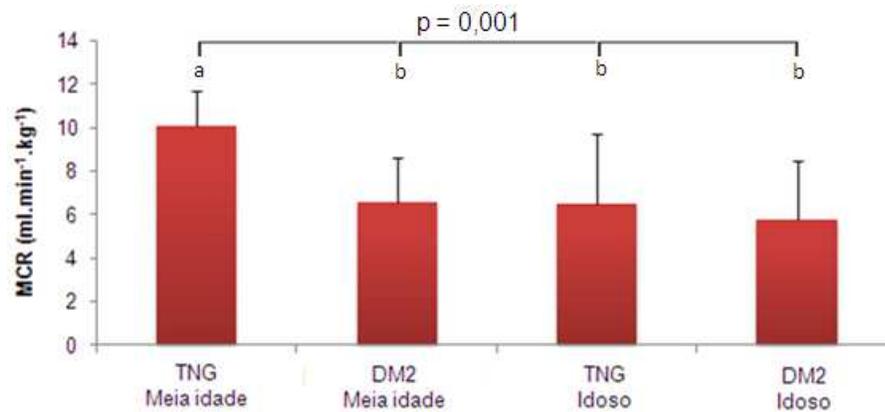


Figura 10: Taxa de depuração metabólica da glicose dos quatros grupos estudado. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.2.3 Sensibilidade da insulina à glicose oral

A sensibilidade à insulina à glicose oral (OGIS) foi similarmente reduzido em ambos os grupos com DM2 e também I-TNG ($p < 0,001$) em comparação ao grupo MI-TNG, conforme ilustra a figura 11 abaixo:

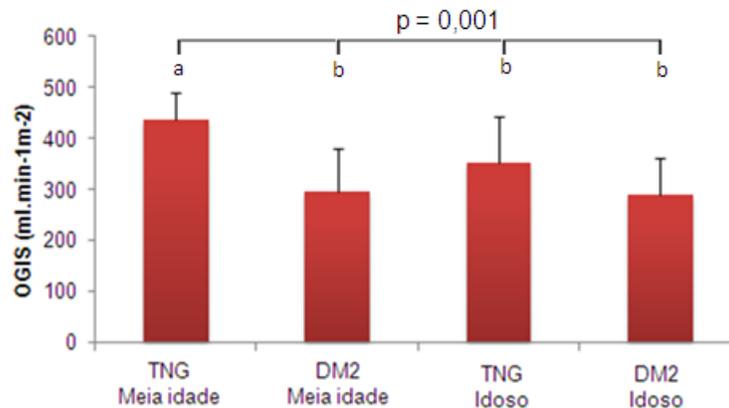


Figura 11: Sensibilidade da insulina à glicose oral (OGIS) dos quatros grupos. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.2.4 Taxa de infusão de glicose

A taxa de infusão de glicose (TIG) foi reduzida nos grupos com DM2 em comparação aos grupos TNG ($p < 0,001$), sendo que o grupo I-TNG apresentou uma menor TIG quando comparado ao grupo MI-TNG, conforme ilustra a figura 12 abaixo:

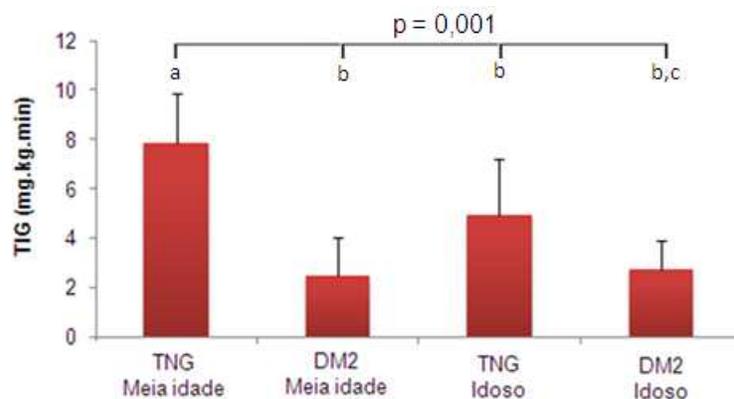


Figura 12: Taxa de infusão de glicose (TIG) durante o teste do *clamp* hiperglicêmico dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.2.5 Índices de sensibilidade a insulina

O índice de sensibilidade à insulina (ISI) foi reduzido nos grupos com DM2 em comparação aos grupos TNG ($p < 0,001$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos I-DM2 e MI-DM2. O grupo I-TNG apresentou uma sensibilidade à insulina próxima aos grupos DM2. A SI foi inversamente correlacionada com a idade e ruim no grupo I-TNG, conforme ilustra a figura 13 a seguir:

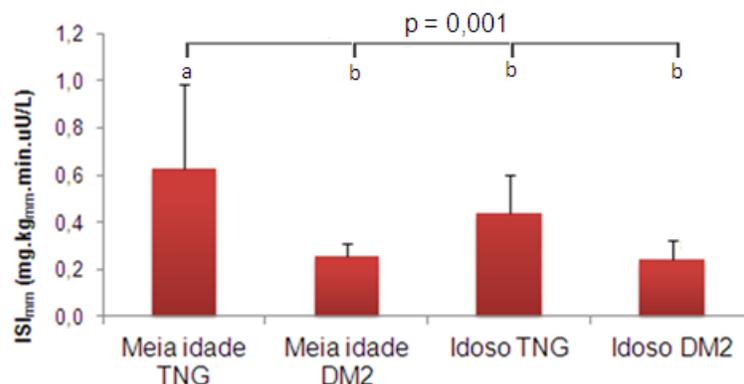


Figura 13: Índice de sensibilidade à insulina (ISI) obtido do o teste do *clamp* hiperglicêmico dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.3 Secreção de Insulina

A secreção de insulina foi obtida da seguinte forma : (i) o índice insulinogênico (IGI), derivado do teste de refeição padrão (TRP). (ii) a área sob a curva da insulina, derivado do mesmo teste, (AUC_{ins}0-180 min). (iii) a primeira fase da secreção de

insulina e (iv) a segunda fase da secreção de insulina, ambos obtidos através do *clamp* hiperglicêmico, e por fim, (v) a secreção de insulina obtida no teste de arginina. A injeção de arginina produziu uma grande descarga de insulina e representa a forma máxima da primeira fase de secreção de insulina. A arginina foi injetada após o teste do *clamp* hiperglicêmico com uma glicose fixa em 20mmol/l. Os respectivos resultados são mostrados a seguir:

4.3.1 Índice insulinogênico

O IGI foi próximo em ambos os grupos I-DM2 (0,8) e MI-DM2 (0,5) e reduzido em comparação aos grupos I-TNG (2.1) e MI-TNG (2.0) e com um $p < 0.019$. O envelhecimento em si parece não ter afetado o IGI, mas em ambos os grupos de diabetes ele foi reduzido, refletindo alguma falha da primeira e segunda fase da secreção de insulina, conforme ilustra a figura 14 a seguir:

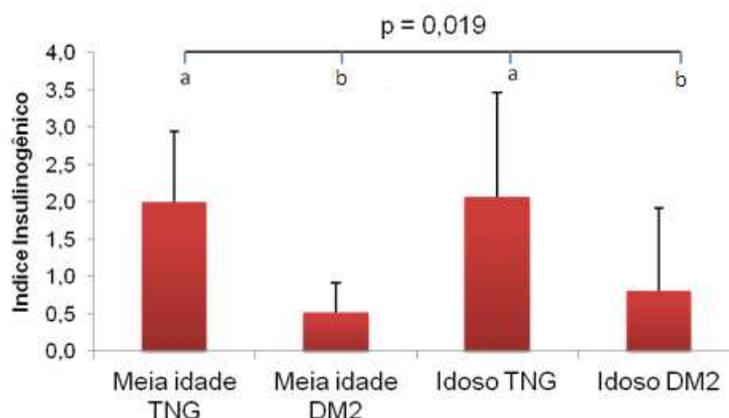


Figura 14: Índice insulinogênico (IGI) obtido do teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.3.2 Área sob a curva da secreção de insulina

A produção de insulina não foi ajustada pela RI. O resultado da $AUC_{ins} 0-180 \text{ min}$ foi maior para o grupo I-TNG em comparação ao grupo de MI-TNG, ($p < 0,033$). O grupo I-DM2 apresentou uma secreção de insulina levemente superior em relação ao grupo MI-DM2, conforme ilustração na figura 15 a seguir:

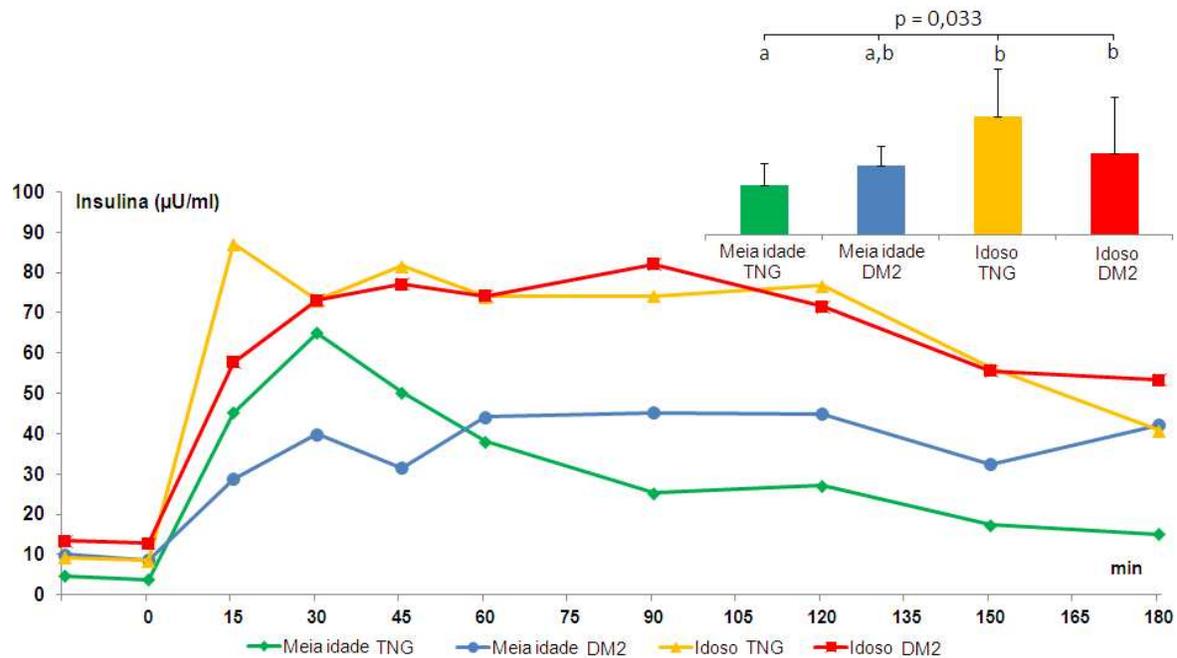


Figura 15: Níveis plasmáticos de insulina durante o teste de refeição padrão nos quatro grupos estudados. Gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva da insulina (AUCins0-180 min). Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan.

4.3.3 Primeira fase da secreção de insulina

A primeira fase de secreção de insulina foi reduzida no grupo com DM2 em relação ao grupo TNG ($p < 0,001$). Após um ajuste para a RI, o grupo de I-TNG mostrou uma primeira fase de secreção menor em relação ao MI-TNG, conforme representado na figura 16 a seguir:

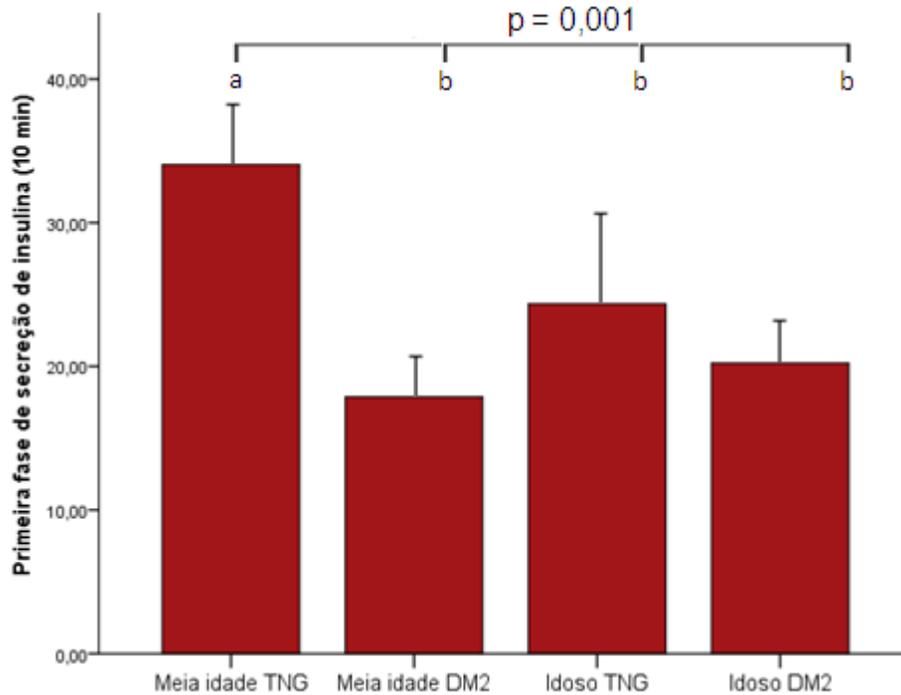


Figura 16: Primeira fase de secreção de insulina obtida do teste do *clamp* hiperglicêmico dos quatro grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.3.4 Segunda fase da secreção de insulina

Quanto a segunda fase de secreção de insulina, o grupo com DM2 apresentou uma menor secreção em relação ao grupo com TNG ($p < 0,001$). O grupo I-TNG apresentou uma segunda fase de secreção de insulina muito próxima ao grupo I-DM2. O grupo MI-TNG foi o que apresentou melhor segunda fase de secreção de insulina, conforme ilustrado na figura 17 abaixo:

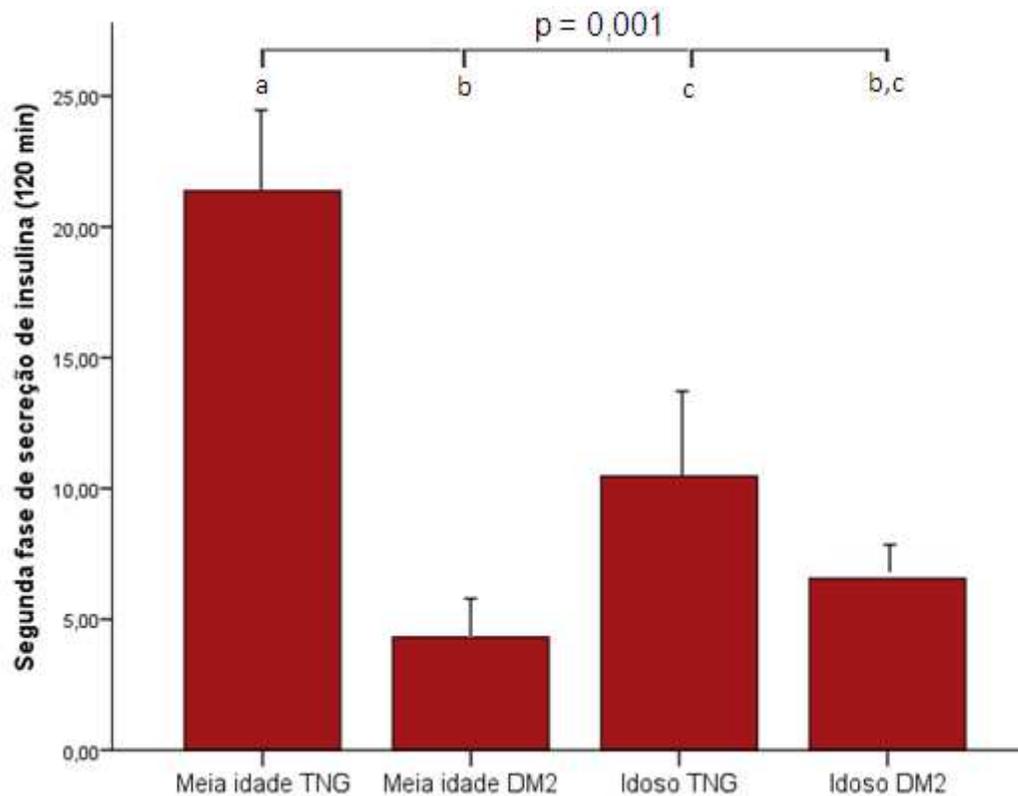


Figura 17: Representação da segunda fase de secreção de insulina obtido na última hora do *clamp* hiperglicêmico. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.3.5 Secreção de insulina no teste de arginina

A secreção de insulina no teste de arginina (estímulo farmacológico máximo) mostrou uma tendência de elevação no grupo I-TNG em relação ao grupo MI-TNG, mas sem nenhuma diferença estatística entre eles ($p = 0,041$), o mesmo ocorreu em relação aos grupos I-DM2 e MI-DM2, conforme mostra a figura 18 a seguir:

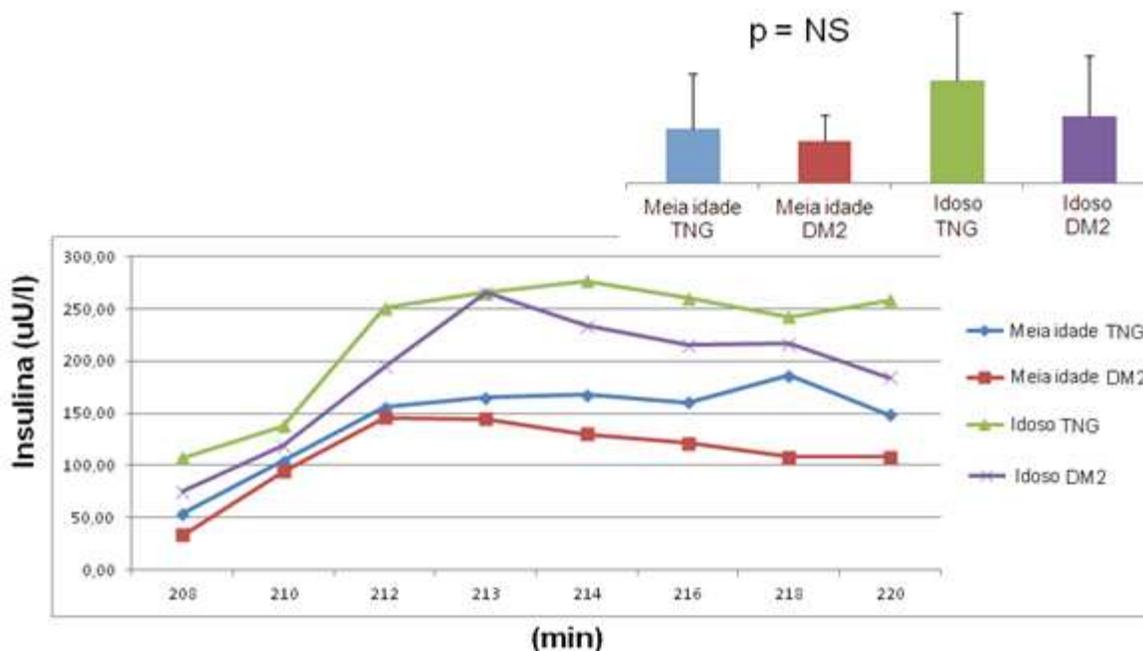


Figura 18: Níveis plasmáticos de insulina durante o teste de arginina nos quatro grupos estudados. Gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva da insulina (AUC₀₋₁₈₀ min). Teste de Kruskal-Wallis.

4.4 Índice de disposição (Função de célula beta)

Para um correto julgamento da secreção de insulina, faz-se necessário um ajuste com relação a SI num mesmo indivíduo. Para isso foi realizado o cálculo do Índice de disposição (DI), obtido pelo produto da secreção de insulina versus o índice de sensibilidade à insulina. Para avaliar a adaptação da secreção de insulina, três índices de disposição foram calculados: (i) o Índice de disposição de primeira fase secreção de insulina (DI 1ª fase), (ii) o Índice de disposição da segunda fase de secreção de insulina (DI 2ª fase), ambos derivados do *clamp* hiperglicêmico, e o (iii) Índice de disposição AIRarg/TIG. Este último foi obtido pelo produto da secreção aguda de insulina no teste de arginina (AIRarg) versus o índice de sensibilidade à insulina, derivado da TIG no teste do *clamp* hiperglicêmico. Os resultados são mostrados logo a seguir:

4.4.1 Índice de disposição de primeira fase de secreção de insulina

O Índice de disposição de 1ª fase de secreção de insulina foi reduzido entre os grupos I-TNG, I-DM2 e MI-DM2 em relação ao grupo MI-TNG ($p = 0,006$). Os grupos com DM2, apresentaram resultados muito próximos entre si. O grupo I-TNG mostrou um menor DI de primeira fase de secreção em relação ao grupo MI-TNG, conforme mostra a figura 19 a seguir:

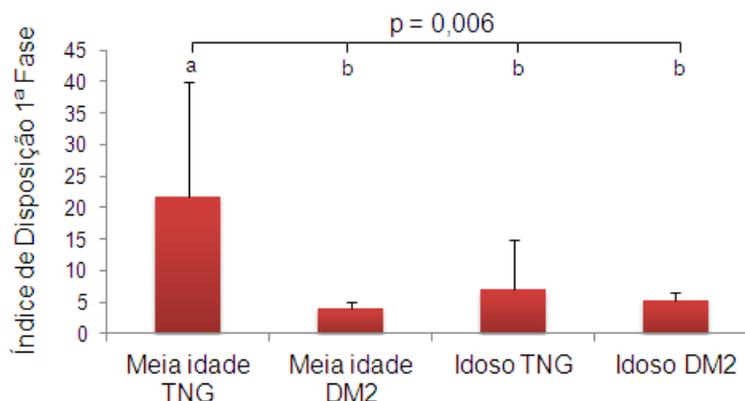


Figura 19: Índice de disposição de primeira fase secreção de insulina obtida do teste do *clamp* hiperglicêmico dos quatros grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.4.2 Índice de disposição de segunda fase de secreção de insulina

O Índice de disposição de 2ª fase de secreção de insulina apresentou resultado muito próximo ao DI de 1ª fase de secreção, sendo reduzido entre os grupos I-TNG, I-DM2 e MI-DM2 em relação ao grupo MI-TNG ($p = 0,001$). O grupo de I-TNG mostrou um menor DI (tanto de primeira, quanto de segunda fase de secreção), em relação ao grupo de MI-TNG. A secreção de insulina foi inversamente correlacionada com o envelhecimento no grupo TNG, considerando o DI de 1ª fase e de 2ª fase ($p < 0.006$ e $p < 0.001$ respectivamente), com valores de "p" bastante significativos. Ilustração na figura 20 a seguir:

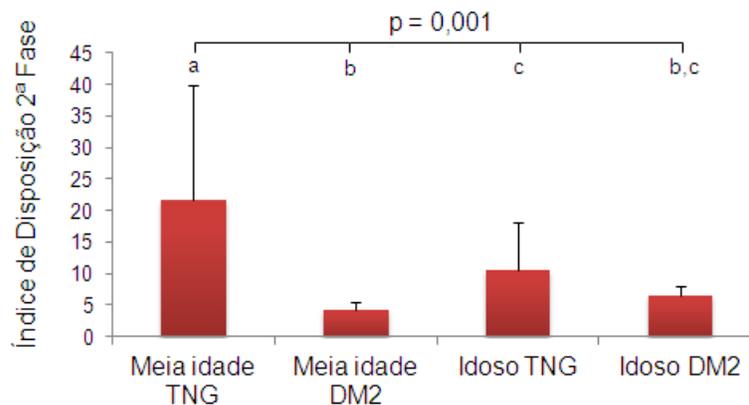


Figura 20: Índice de disposição da segunda fase de secreção de insulina obtida do teste do *clamp* hiperglicêmico dos quatro grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Duncan

4.4.3 Índice de disposição no AIRarg/TIG

O Índice de disposição (DI AIRargGIR) foi reduzido nos grupos com DM2 em relação aos grupos TNG ($p = 0,041$). O grupo I-DM2 apresentou uma tendência de DI AIRargGIR superior com relação ao grupo MI-DM2, porém não houve diferença significativa entre eles. Ambos os grupos com DM2 tiveram resposta reduzida da secreção de insulina à arginina, sugerindo algum grau de falência de célula- β . O envelhecimento não afetou a secreção máxima de insulina. Ilustração na figura 21 a seguir:

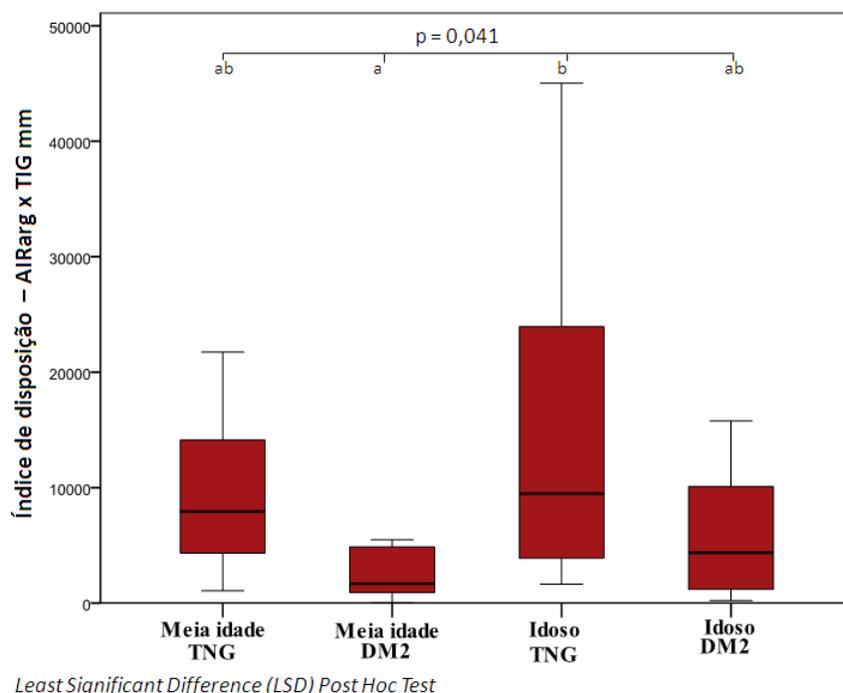


Figura 21: Índice de disposição no AIRarg/TIG obtido pelo produto da secreção aguda de insulina do teste de arginina e da taxa de infusão de glicose, obtida do do teste do *clamp* hiperglicêmico dos quatros grupos estudados

4.5 Adaptação a redução da sensibilidade a insulina

Em função da magnitude da resposta da secreção de insulina ser determinada em parte pelo grau da SI (KAHN E COL., 1993), nós mostramos que o princípio da relação hiperbólica não linear está presente, através do Índice de disposição obtido da secreção de insulina, (derivado do TRP) versus o ISI (derivado do *clamp*. Essa relação hiperbólica foi observada em todos os grupos, sem ou com o ajuste para massa magra, independente do teste utilizado. Ilustração na figura 22 a seguir:.

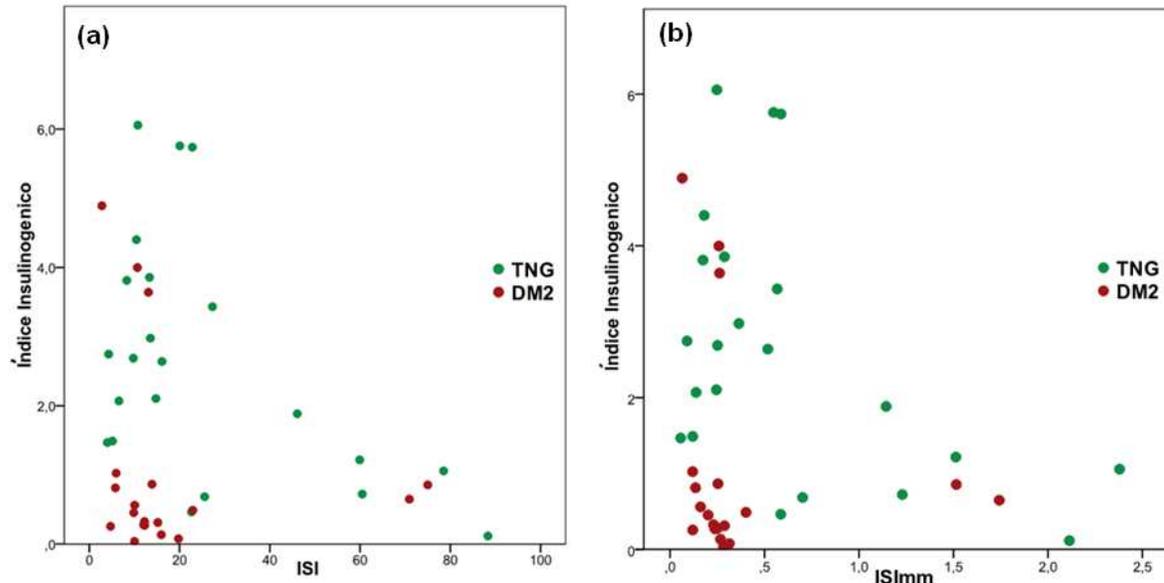


Figura 22: Relação hiperbólica obtida pelo o produto da secreção de insulina pela sensibilidade da insulina entre os grupos estudados. (a) sem ajuste para massa magra (b) após o ajuste para massa magra.

4.6 Teste de refeição padrão: resposta hormonal

No teste de refeição padrão foram obtidas as áreas sob a curva (AUC no tempo de 0-180 minutos) da secreção dos seguintes hormônios glucagon, insulina, GIP e do GLP-1. Seus respectivos resultados são mostrados a seguir:

4.6.1 Área sob a curva no tempo 0-180 min do glucagon

A AUC no tempo total de 0-180 minutos da produção do glucagon mostrou similaridade entre os grupos MI-DM2, I-DM2 versus MI-NTG, I-NTG sem nenhuma diferença significativa entre eles. Por outro lado, a produção do glucagon na primeira hora do teste (AUC no período de 0-60 min) foi mais elevada no grupo I-DM2 em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). Ilustração na figura 23 a seguir:

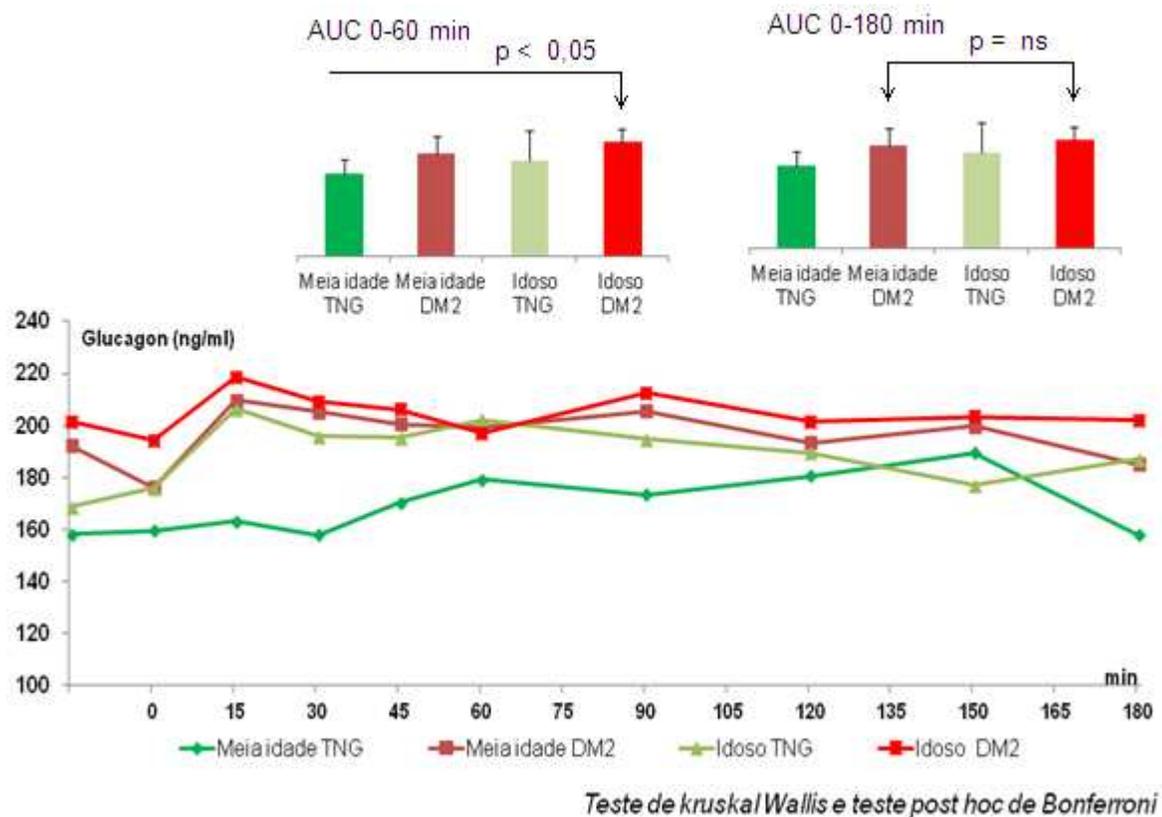


Figura 23: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos do glucagon obtida durante o teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva do glucagon nos intervalos de tempo de 0-60 minutos e 0-180 minutos

4.6.2 Área sob a curva no tempo 0-180 min da insulina

A AUC no tempo de 0-180 minutos da insulina foi maior para o grupo I-TNG em comparação ao grupo de MI-TNG, ($p < 0,033$). O grupo I-DM2 apresentou uma secreção de insulina levemente superior em relação ao grupo MI-DM2.

Ilustração na figura 24 a seguir:

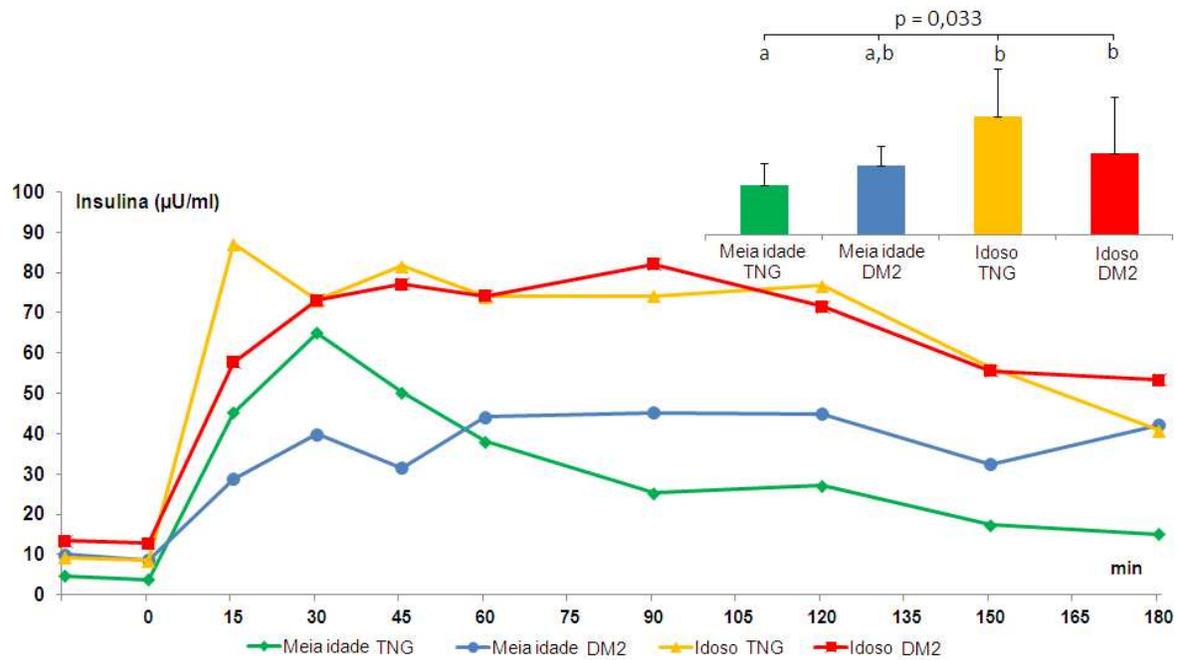


Figura 24: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos da insulina obtida durante o teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Gráfico de barra construído com os valores da área sob a curva da insulina neste mesmo intervalo de tempo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Duncan

4.6.3 Área sob a curva no tempo de 0-180 minutos do GIP

Com relação a concentração do GIP, a AUC no tempo de 0-180 minutos mostrou que não existe nenhuma diferença entre os grupos. Ilustração na Figura 25 a seguir :

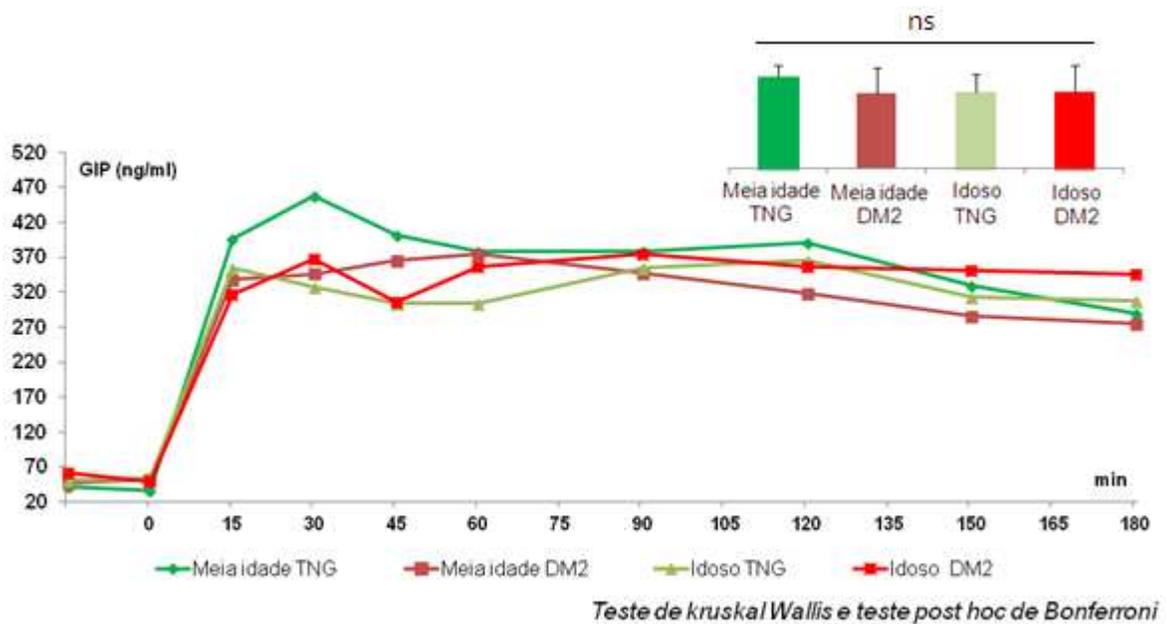
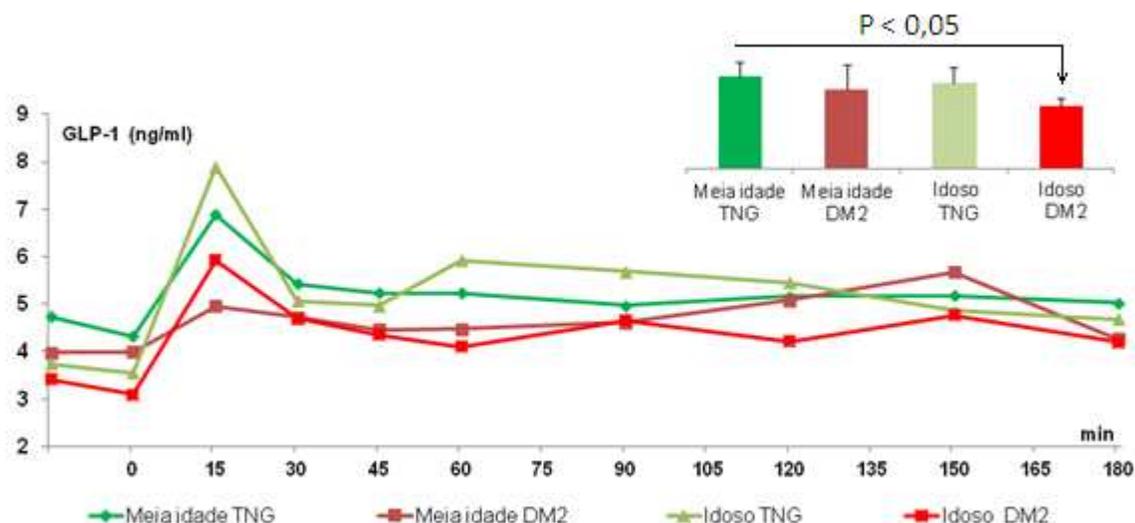


Figura 25: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos do GIP obtida durante o teste de refeição padrão dos quatro grupos estudados. Gráfico de barra construído com os valores da área sob a curva do GIP neste mesmo intervalo de tempo. Com um valor de p sem nenhuma diferença estatística significativa entre eles

4.6.4 Área sob a curva no tempo 0-180 min do GLP-1

Quanto a AUC no tempo 0-180 minutos do GLP-1, este foi apenas reduzido no grupo I-DM2 em comparação aos demais grupos, com significância estatística ($p < 0,05$). Ilustração na figura 26 a seguir :



Teste de kruskal Wallis e teste post hoc de Bonferroni

Figura 26: Área sob a curva (AUC) no tempo de 0-180 minutos do GLP-1 obtida durante o teste de refeição padrão nos quatro grupos estudados. Acima gráficos de barra construídos com os valores da área sob a curva do GLP-1 neste mesmo intervalo de tempo, $p < 0,05$ mostrando uma diferença estatística significativa entre eles

4.6.5 Relação inversa entre GLP-1 e glucagon (AUC 0 – 180 min)

Para um melhor destaque em relação a liberação de GLP-1 e função de célula- β , nós realizamos uma análise univariada mostrando uma correlação significativa entre AUC GLP-1 e do glucagon, ajustada pela TIG_{MM} ($r = -0.56$; $p < 0.001$) para toda a população. Adicionalmente, o GLP-1 foi inversamente relacionado à liberação de glucagon, após uma refeição. Ilustração na figura 27 abaixo:

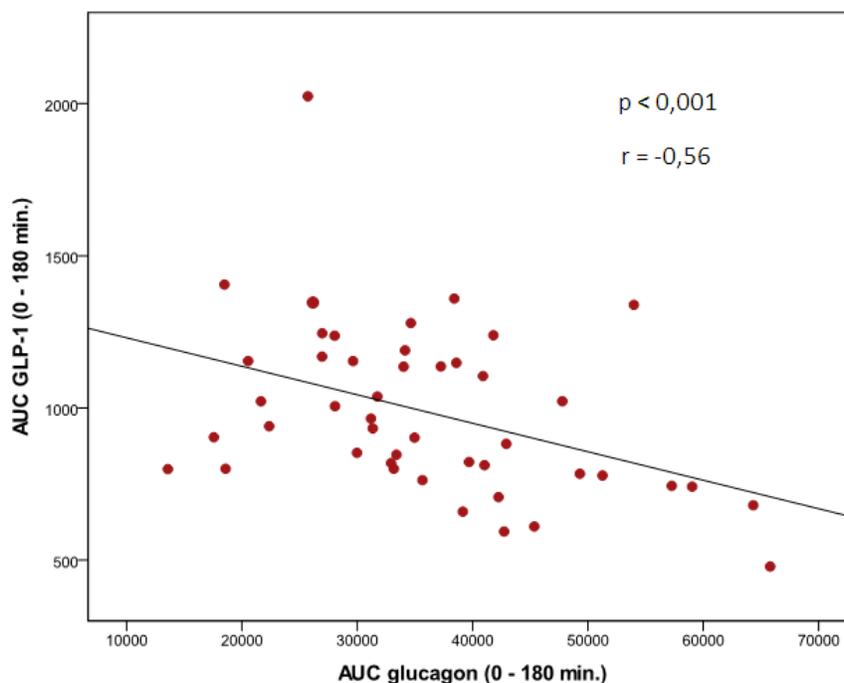


Figura 27: Correlação entre as áreas abaixo da curva do GLP-1 e glucagon no teste de refeição padrão, intervalo de tempo de 0 - 180 minutos. Teste de correlação de Pearson

4.7 Adipocitocinas e ácidos graxos livre

Os níveis séricos de ácidos graxos livres e adipocitocinas já foram comentados na descrição da tabela 5. Para um destaque no ganho dessa relação, (de adipocitocinas e SI), nós realizamos uma análise de regressão linear, mostrando que os níveis de FFA foram negativamente correlacionados com o índice de SI: OGIS ($r = -0,40$, $p < 0,001$), TIG_{MM} ($r = -0,49$, $p < 0,001$), ISI_{MM} ($r = -0,36$, $p < 0,001$) e também para a função de célula- β : DI 1ª fase ($r = -0,27$, $p < 0,006$) e DI 2ª fase ($r = -0,31$, $p < 0,001$). A adiponectina foi positivamente correlacionada ao OGIS ($r = 0,27$, $p < 0,001$), MCR ($r = 0,24$, $p < 0,001$), e TIG_{MM} ($r = 0,41$, $p < 0,001$).

5 Discussão

O principal achado do nosso estudo foi demonstrar que idosos com DM2 possuem mecanismos fisiopatológicos que se assemelham aos pacientes mais jovens em termos de redução de sensibilidade e secreção de insulina, hiperglucagonemia e alteração de adipocitocinas. No entanto, apenas os indivíduos idosos apresentaram redução na produção de GLP-1 após um estímulo alimentar. Uma potencial implicação clínica desses achados serão discutidos a seguir.

A fisiopatologia e tolerância à glicose na população de idosos foram investigados devido o aumento da incidência de DM2 e pelo desafio no manejo da hiperglicemia nesses pacientes (HUANG E COL., 2011). O estudo longitudinal de Baltimore sobre envelhecimento, documentou um declínio na tolerância à glicose após os 60 anos de idade com concentração de glicose de jejum e pós-prandial sendo mais alta em idosos, comparada aos indivíduos mais jovens (MEIGS E COL., 2003). A resistência à insulina na população de idosos é descrita usando várias técnicas (RODER e COL., 2000). A técnica do *clamp* hiperglicêmico pode ser usada para prover uma medida acurada da RI e da liberação de insulina em indivíduos idosos. Em 1998 Meneily e colaboradores encontraram uma excelente correlação entre ISI derivado do *clamp* hiperglicêmico e dos estudos do *clamp* euglicêmico numa população de idosos, em pacientes sem diabetes e com diabetes ($r = 0,76$ e $r = 0,71$ respectivamente), motivo que nos levou a usar essa primeira técnica para avaliação da RI em nosso estudo. Nós encontramos diferenças significativas entre os grupos, em relação a idade e pela presença de diabetes, pelo modelo de jejum (HOMA), e dos índices dinâmicos derivados do teste de refeição padrão (MCR e OGIS) e do *clamp* hiperglicêmico (TIG e ISI). A SI foi reduzida nos idosos e no grupo com diabetes, quando comparados ao grupo da mesma faixa etária. Um dos mecanismos que explicam a presença de RI no idoso é a alteração de sua composição muscular. Pelo fato do músculo esquelético ser um importante órgão e responsável pela captação da glicose insulino mediada, contribuindo por aproximadamente 25% do gasto energético basal e homeostase metabólica. Sendo esse percentual ainda maior durante atividade física (RADEGRAN e COL., 1999). Essa captação da glicose é reduzida nos indivíduos obesos e idosos em função de uma relativa diminuição da massa muscular que ocorre nesses grupos. Apesar de nossos grupo

de pacientes terem sido pareados por gênero, IMC e atividade física, algumas diferenças na composição corporal foram observadas. Tanto o envelhecimento quanto o DM2 possuíram uma reduzida massa magra, junto com uma reduzida SI.

No estudo EGIR (FERRANNINI E COL., 1996), a idade foi associada com uma diminuição da captação da glicose mediada pela insulina, mas esse efeito não persistiu após o ajuste pelo IMC. No nosso estudo, a SI (TIG) foi negativamente correlacionada com a idade ($r = -0.42$; $p < 0,001$), mas essa correlação não persistiu após o ajuste pela composição corporal.

Um estudo com jovens e homens mais velhos usando o *clamp* euglicêmico, a captação da glicose plasmática foi dependente da relação cintura quadril, e não da idade, implicando que a distribuição de gordura corporal é mais importante na SI do que o avançar da idade isoladamente (COON E COL., 1992). No nosso estudo a correlação negativa entre SI e o envelhecimento não foi mais observada após o ajuste pela distribuição da gordura corporal (diâmetro sargital abdominal ou a relação cintura quadril). Coletivamente esses dados confirmam uma relação entre obesidade abdominal e reduzida SI com o envelhecimento.

Uma vez por existir semelhanças no desequilíbrio metabólica do envelhecimento e da obesidade, é provável que essas condições compartilhem vias celulares parecidas. Na obesidade o tecido adiposo é exposto ao estresse oxidativo resultando num acúmulo de macrófagos, produção de citocinas inflamatórias e supressão de adiponectina (COON E COL., 1992). O envelhecimento do tecido adiposo reduz a SI no tecido periférico e contribui para a progressão do diabetes.

No presente estudo, houve um aumento dos ácidos graxos livres e uma redução nas concentrações de adipocinas, que podem afetar tanto a SI quanto a função da célula- β .

A redução na primeira fase de secreção de insulina ocorre precocemente no curso da disglucemia, sendo reduzida nos pacientes com intolerância a glicose e nos parentes de primeiro grau dos pacientes com DM2 (KAHN E COL., 2003). Quando a tolerância à glicose é normal no obeso, idoso, e na gestante, indica que a resistência à insulina é compensada por aumento de secreção. A inabilidade da célula- β em

aumentar a secreção de insulina frente a uma demanda aumentada, explica porquê a glicose é aumentada neste grupo de pacientes (JENSEN E COL., 2002).

O efeito do envelhecimento na secreção de insulina parece ser atribuída ao menos em parte, na falha da progressão de pró-insulina para insulina (FRISCHE E COL., 2002).

A relação hiperbólica entre sensibilidade e liberação de insulina, implica que existe uma interação entre a célula- β e os tecidos sensíveis à insulina (KAHN E COL., 2003). O produto da sensibilidade à insulina e da resposta à insulina é uma medida acurada de função de célula beta, chamado de Índice de disposição(DI). Os DIs de ambas, primeira e segunda fase de liberação de insulina, mostraram uma reduzida função de célula beta no idoso TNG em comparação ao grupo MI-TNG, porém os pacientes com DM2, tanto os idosos, quanto os de meia idade, apresentaram uma mais pronunciada redução em ambos os índices. Para assegurar o princípio da veracidade da relação entre sensibilidade e secreção de insulina, nós aplicamos índices que não foram intrinsecamente dependentes, ou seja; índices derivados de diferentes testes (*clamp* hiperglicêmico, estímulo com arginina e teste de refeição padrão). Essa conjunção de dados, sugere que embora o envelhecimento não afete a relação hiperbólica entre sensibilidade e liberação de insulina, a condição de envelhecimento e DM2 parecem mudar essa interação quantitativamente, com uma compensação de célula beta mais baixa.

O eixo êntero insular refere-se aos hormônios incretínicos em potencializar a liberação de insulina após uma alimentação. Dois estudos, um com pacientes insulino-resistentes não diabéticos, e outro com pacientes com diabetes (VISBOLL E COL., 2001), não demonstraram aumento do GLP-1 após o estímulo de uma refeição mista, sendo que a magnitude do defeito mostrou-se ligada ao grau de resistência à insulina. Outro trabalho demonstrou maior elevação das incretinas (GIP e GLP-1) em diabéticos tipo 1 e 2, e em magros e obesos não diabéticos, frente a um estímulo alimentar maior com 520 Kcal versus um estímulo menor com 260 Kcal (VILSBOLL E COL., 2002). Já a ação do GLP-1 estava preservada nos indivíduos diabéticos, pois havia normalização da hiperglicemia de jejum quando este peptídeo era infundido (NATTANN E COL., 1992).

Outros estudos sugerem que a secreção e a resposta do GLP-1 ao estímulo alimentar estão reduzidas em obesos e que a perda de peso normaliza esses níveis (NEARY E BATTERHAM, 2009).

Alguns estudos relatam defeitos na secreção de GLP-1 após um teste de refeição padrão (LUND E COL., 2011), além disso, as concentrações reduzidas do GLP-1 são provavelmente secundárias a outros hormônios e a alterações metabólicas, tais como hiperglucagonemia (VOLLMER E COL., 2008).

Um forte achado do nosso estudo foi que as reduzidas concentrações do GLP-1 ocorreram apenas na população idosa com DM2, e em função deste achado, houve uma relação inversa e significativa, após um estímulo alimentar, entre o glucagon e o GLP-1 na população idosa. No entanto se essa liberação alterada do GLP-1 contribui para o defeito na secreção de insulina nos nossos idosos com DM2, isto não é sabido, apesar de nós termos encontrado uma relação próxima entre a primeira fase de secreção de insulina ajustada pela sensibilidade a insulina ($IGI \times TIG_{MM}$), e pela produção de GLP-1.

Em contraste aos nossos achados, alguns autores mostram um aumento na liberação do GPL-1 glicose dependente num pequeno grupo de idoso, sugerindo que existe uma falha no sistema de retroalimentação negativa da glicose na produção de GLP-1 (RANGANATH E COL., 1998). Em outros estudos os autores não encontraram diferenças na resposta do GLP-1 após a alimentação, no entanto, a diferença entre os níveis de GLP-1 total e ativo foi significativamente maior no grupo controle de jovens (KOROSI E COL., 2001).

Em relação a resposta do GIP, os dados que avaliam a sua produção são controversos entre os idosos e os pacientes com DM2, alguns autores têm mostrado um aumento ou uma redução na sua produção (MENEILY E COL., 1998). Na nossa amostra de pacientes nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos, e também não foram contra ao senso mais comum e prevalente na literatura, que é a resistência ao GIP que ocorre no DM2.

Portanto os defeitos relacionados a idade nos hormônios incretínicos são de interesse como possíveis contribuidores na falha de secreção de insulina encontrados nas condições de DM2 e envelhecimento. Em sendo a secreção de

GLP-1 um importante regulador da liberação de insulina, e o idoso com DM2 sendo caracterizado por uma redução na secreção de insulina, então as alterações no GLP-1 podem ser relevantes nas alterações metabólicas da glicose dessa população de idosos com DM2. Apoio a essa teoria foram as correlações positivas que nós encontramos entre o GLP-1, o índice insulinogênico e a correlação negativa entre o GLP-1 e o glucagon, após um estímulo alimentar. De fato, a hiper glucagonemia e a reduzida primeira fase de secreção de insulina são os maiores marcadores na fisiologia do DM2.

Os idosos são um grupo muito heterogêneo de pacientes com manifestações clínicas diferentes do DM2 de meia idade, com um manejo no seu tratamento que continua sendo um desafio. Os princípios do tratamento são similares aos dos pacientes mais jovens, mas que necessitam ser individualizados em função dos riscos de hipoglicemia, demências e do aumento do risco de doenças cardiovasculares que afetam essa população (INOUYE E COL., 2007).

O hormônio incretínico GLP-1 tem o potencial de reverter a deterioração da tolerância à glicose relacionada no envelhecimento, através do aumento da secreção de insulina glicose dependente. Estudos em animais mostram que esta proteção seja devido ao aumento da função da célula- β , bem como da expressão do gene da pró-insulina e da expansão da massa de células- β (KNOWLER E COL., 2009).

Em nossos achados o idoso com DM2 possuem ambos: diminuição de secreção e de sensibilidade à insulina, junto a uma já relacionada diminuição da concentração de GLP-1 após a alimentação. Sendo muito relevantes as terapias disponíveis baseadas em incretina (análogos de GLP-1 ou inibidores de DPP-4), pois carregam baixo risco de hipoglicemia e são eficientes e bem toleradas na população idosa com diabetes. Além disso, a prevenção do acúmulo de gordura, em especial com a manutenção de uma atividade física saudável, poderiam preservar a massa magra que é afetada pelo o envelhecimento com deterioração da sensibilidade à insulina. Sendo assim, essa terapia farmacológica e não farmacológica, baseado em evidências fisiopatológica, parece ser bastante apropriada para o grupo de idosos com DM2.

Finalmente, as posições controversas na literatura sobre o grau de influência do envelhecimento em si na alteração da função da célula- β pode ser resultado da presença de diversos fatores confundidores que ocorrem com o avançar da idade tais como: obesidade, alteração da distribuição da gordura corporal e da composição corporal, inatividade física, o uso de múltiplas terapias medicamentosa e presença de outras comorbidades facilitadas pelo processo do envelhecimento. Todos esses fatores, interagem para aumento da resistência à insulina existente nessa população.

6 Conclusão

O principal achado deste trabalho foi a demonstração que o idoso com diabetes possui mecanismos fisiopatológicos parecidos com os pacientes mais jovens em termos de redução de sensibilidade e secreção de insulina, hiperglucagonemia e adiponectinas alteradas, porém apenas os idosos com DM2 apresentaram uma redução mais acentuada na produção do GLP-1, e níveis mais elevados de glucagon após um estímulo alimentar. Por outro lado, a secreção de insulina no teste de arginina foi preservada no idoso, esta resposta farmacológica da célula- β indica que tratamentos baseados em restaurar a sensibilidade da célula- β ao estímulo com glicose devem ser priorizados.

7 Referências bibliográficas

1. Abdul-Ghani Ma, DeFronzo RA. Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Endocr Pract.* 2008; 14:782-790.
2. 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 Endoc.* 2004; 150: 97-104.
3. Ashcroft Frances M, Rorsman Patrick. Diabetes Mellitus and the beta cell: The Last Ten Years. *Cell.* 2012; 148:1160-1169.
4. Bacha F, Gungor N, Arslanian SA. Measures of beta-cell function during the oral glucose tolerance test, liquid mixed-meal test, and hyperglycemic clamp test. *J Pediatr.* 2008; 152(5):618-21.
5. Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man. *J Clin Invest* 1981; 68(6):1456-67
6. Ben-Noun L, Laor A. Relationship of neck circumference to cardiovascular risk factors. *Obes Res.* 2003; 11(2):226-31.
7. Brasil – Ministério da Saúde. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do diabetes mellitus no Brasil: resultados. Brasília: MS;1991.
8. Callegari-Jacques SM. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre. Artmed, 2006.
9. Caumo A, Perseghin G, Brunani A, Luzi L. New Insights on the simultaneous assessment of insulin sensitivity and beta-cell function with the HOMA 2 method. *Diabetes Care* 2006; 12: 2733-4.
10. Cerasi E, Ferrannini E. Landmark papers in insulin secretion. London: Science Press, 2004.
11. Chen K- W, Boyko EJ, Bergstrons RW, Leonetti DL, Newell Morris L, Wahl Pw, at al . Earlier appearance of impaired insulin secretion than of visceral adiposity in the pathogenesis of NIDDM, *Diabetes care* 1995; 18: 747-53.
12. Cobelli C, Toffolo GM, Dalla Man C, Campioni M, Denti P, Caumo A, et al. Assessment of beta-cell function in humans, simultaneously with insulin sensitivity and hepatic extraction, from intravenous and oral glucose tests. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(1):E1-E15.

13. Coon PJ, Rogus EM, Drinkwater D, Muller DC, Goldberg AP. Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75:1125-32.
14. Dalla Man C, Campioni M, Polonsky KS, Basu R, Rizza RA, Toffolo G, et al. Two-hour seven-sample oral glucose tolerance test and meal protocol: minimal model assessment of beta-cell responsiveness and insulin sensitivity in nondiabetic individuals. *Diabetes.* 2005; 54(11):3265-73.
15. DeFronzo RA, From the Triumvirate to the Ominous octet: A New Paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009; 58:773-795.
16. DeFronzo RA, JA Davidson, S Del Prato. The role of the Kidneys in glucose homeostase: a new path towards normalizing glycemia. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2012; 14:5-14.
17. DeFronzo RA, Mandarino LJ. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In Goldfine ID, Rushakoff Rj eds. *Diabetes and carbohydrate metabolism.* Available from URL: <http://www.endotext.org/diabetes/diabetes6/diabetesframe6.htm>. Accessed 2 March 2003.
18. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979; 233: 21.
19. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 2004;88:787-835.
20. DeFronzo RA. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 667-687.
21. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini m, Bugliani M, Sbrana S, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:727-35.
22. Drucker Dj. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* 2002;122:531-44.
23. Elahi D, Andersen DK, Muller DC, Tobin JD, Brown JC, Andres R. The enteric enhancement of glucose-stimulated insulin release. The role of GIP in aging, obesity, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* 1984 Oct;(10):950-7.

24. Elahi D, McAloon-Dyke M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Habener JF, Andersen DK. The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. *Regul pept.* 1994 Apr 14;51(1):63-74.
25. European Group for the Study of Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:863-868.
26. Eaton Rp, Allen Rc, Schade Ds et al. Prehepatic insulin production in man: Kinetic analysis using peripheral connecting peptide *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51:520-528. 88. Field AP. *Discovering statistics using SPSS for Windows: advanced techniques for the beginner.* London; Thousand Oaks, Sage Publications, 2000.
27. Ferrannini E, Nannipieri M, Williams K, Gonzales C, Hoffner SM, Stern MP. Mode of onset of type 2 diabetes from normal or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2004; 53:160-5.
28. Ferrannini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U. Insulin action and age. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetes* 1996; 45:947-53.
29. Ferrannini E, Mari A. Beta cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal. *Diabetologia.* 2004;47(5):943-56.
30. Feskens EJM, Boer JMA, van Dam RM, Ritsema MJ, Kromhout D. Diabetes prevalence in offspring of elderly men with known and newly diagnosed diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22(11):1919-99. .
31. Field AP. *Discovering statistics using SPSS for Windows: advanced techniques for the beginner.* London; Thousand Oaks, Sage Publications, 2000.
32. Fritsche A, Madaus A, Stefan N, Tschritter O, Maerker E, Teigeler A, Häring H, Stumvoll M. Relationships among age, proinsulin conversion, and beta-cell function in nondiabetic humans. *Diabetes* 2002; 51 Suppl 1:S234-S239.
33. Gambert Steven R, Sally Pinkstaff. *Diabetes Spectrum* 2006; 19:212-227.
34. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico de resistência à insulina. *Arq Bras Endoc Metab.* 2006; 50:208-15.

35. Gerich JE. Contributions of insulin- resistance and insulin- secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin proc.* 2003; 78:447-56.
36. Graydon S, Meneilly GS, Tessier D. Diabetes in Elderly Adults. *J Geront.* 2001; 56:5-13.
37. Harris MI. Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care* 1993; 16:642-52.
38. Holst J. J. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): an intestinal hormone, signaling nutritional abundance, with an unusual therapeutic potential. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10:229-35.
39. Huang ES, Liu Jy, Moffet HH, John PM, Karter AJ. Glicemic Control, Complications, and death in older diabetes patients: the diabetes and aging study. *Diabetes Care* 2011; 36:1329-36.
40. Huda MS; Wilding J.P.; Pinkney J.H. Gut peptides and the regulation of appetite. *Obes Rev.* 2006; 7(2):163-82.
41. Iozzo P, Beck-Nielsen H, Laakso M, Smith U, Yki-Jarvinen H and Ferrannini E. Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European Group for the Study of insulin Resistance. *J Endocrinol Metab* 1999;84:863-8.
42. IDF-Internacional Diabetes Federation. Acessado em: 07/08/08: http://www.eatlas.idf.org/Obesity_and_type_2_diabetes/Prevalence_of_obesity.
43. Inouye SK, Studenski S, Tinetti ME, Kuchel GA. Geriatric syndromes: clinical, research, and policy implications of a core geriatric concept. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55:780–791.
44. Irwin N, Flatt PR. Evidence for beneficial effects of compromised gastric inhibitory polypeptide action in obesity –related diabetes and possible therapeutic implications. *Diabetologia* 2009; 52: 1724-31.
45. Irwin N, McClean PL, Harriot P, Flatt PR, Beneficial effects of sub-chronic activation of glucagon-like peptide (GLP-1) receptors on deterioration of glucose homeostasis and insulin secretion in aging mice. *Exp Gerontol.* 2007; 42(4):296-300.

46. Jarney NW, Isaacson VI. A blood sugar tolerance test. *J Am Med Assoc* 1918; 70:1131-4.
47. Jensen CC, Cnop M, Hull RL, Fujimoto WY, Kahn SE; American Diabetes Association GENNID Study Group. Beta-cell function is a major contributor to oral glucose tolerance in high-risk relatives of four ethnic groups in the U.S. *Diabetes* 2002; 51:2170-78.
48. John B. Buse, Kenneth S. Polonsky, e Charles F. Buran. *Williams Tratado de Endocrinologia* 2011; 30:1-3.
49. 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; 42:1663-72.
50. Kahn SE. The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J med.* 2000; 108 (6A):25-85.
51. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003; 46:3-19.
52. Kaihoh T, Masuda T, Sasano N, Takahashi T. The size and number of Langerhans islets correlated with their endocrine function: a morphometry on immunostained serial sections of adult human pancreases. *Tohoku J Exp Med.* 1986;149(1):1-10.
53. Karhunen LJ, Juvonen KR, Huotari A, Purhonen AK, Herzig KH. Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regul Pept.* 2008; 149(1-3):70-8.
54. Kieffer Tj, Hussain MA, Habner JF. Glucagon and the glucagon-like peptide production and degradation. *The endocrine pancreas and regulation of metabolism*, 2001:197-265.
55. Kjems LL, Christiansen E, Vølund A, Bergman RN, Madsbad S. Validation of methods for measurement of insulin secretion in humans in vivo. *Diabetes* 2000; 49:580-8.
56. Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT, Brown-Friday JO, Goldberg R, Venditti E, Nathan DM. 10-year follow-up of

- diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet* 2009; 374:1677-1686.
57. Knowler Wc, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT, Brown-Friday JO, Goldberg R, Venditti E, Nathan DM. Diabetes Prevention Program Research Group/ 10-Year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009; 14;374(9702):1677-86.
 58. Korosi J, McIntosh CH, Pederson RA, Demuth HU, Habener JF, Gingerich R, Egan JM, Elahi D, Meneilly GS. Effect of aging and diabetes on the enteroinsular axis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56:M575-9.
 59. Le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Annals of Surgery*. 2006; 243(1):108-14.
 60. Leahy, J.L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*. 36:197-209.
 61. Lee Y, et al . Glucagon receptor knockout prevents insulin deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes* 2007;60(2):391-397.
 62. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Hall CB, Siders WA. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol* 1986; 60:1327-32.
 63. Lund A, Vilsbøll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. The separate and combined impact of the intestinal hormones, GIP, GLP-1, and GLP-2, on glucagon secretion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011; 300:E1038-46.
 64. Maedler K. Aging-Related changes in beta-cell turnover. *Diabetes* 2006; 55: 2455-2461.
 65. MacIntosh CG, Andrews JM, Jones KL, Wishart JM, Morris HA, Jansen JB, Morley JE, Horowitz M, Chapman IM. Effects of age on concentrations of plasma Cholecystokinin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and their relation to appetite and pyloric motility. *Am J Clin Nutr*. 1999 May;69(5):999-1006.

66. Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 2001;24:539-548.
67. Mari A, Pacini G. Methods for the assessment of B-cell function in vivo. In: Roden M. *Clinical Diabetes Research – Methods and Techniques*. John Wiley & Sons Ltda, 2007; 7-24.
68. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-9.
69. McConnel JG, Alam MJ, O'Hare MM, Buchanan KD, Stout RW. The effect of age and sex on the response of enteropancreatic polypeptides to oral glucose. *Age Ageing*. 1983 Feb;12(1):54-62.
70. McCulloch DK, Koerker DJ, Kahn SE, Bonner-Weir S, Palmer JP. Correlations of in vivo beta-cell function tests with beta-cell mass and pancreatic insulin content in streptozocin-administered baboons. *Diabetes*. 1991; 40(6):673.
71. McIntyre N , Holsworth DC, Tuner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964; 2:20-21.
72. Meigs JB, Muller DC, Nathan DM, Blake DR, Andres R. The natural history of progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Diabetes* 2003; 52:1475-84.
73. Meneilly GS, Elahi Dariush. Metabolic Alterations in Middle-Aged and Elderly Lean Patients with types 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2005; (06): 1498-99.
74. Meneilly GS, Elliott MB. Assessment of Insulin Sensitivity Hyperglycemic Clamp Technique. *Journal of the American Geriatric society*. 1998; 46:1361-67.
75. Meneilly GS, Elliott, T. Metabolic alterations in middle-aged and elderly obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 1999; 22(1):112.
76. Meneilly GS, Hards L, Tessier D, Elliott T, Tildesley H. NIDDM in the elderly. *Diabetes Care* 1996; 19:1320-75.
77. Meneilly GS, Ryan AS, Minaker KL, Elahi D. The effect of age and glycemic level on the response of the beta-cell to glucose-dependent insulinotropic polypeptide

- and peripheral tissue sensitivity to endogenously released insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2925-2932.
78. Meneilly GS, Tessier D. *Diabetes in the elderly.*, NJ: Humana Press. 2000; 181-203.
79. Muller R, Buttner P. A critical discussion of intraclass correlation coefficients. *Stat Med*. 1994;13(23-24):2465-76.
80. Mirian Cnop, Josep Vidal , Rebecca L. Hull, Steven E. Kahn. Progressive loss of B-cell function leads to worsening glucose tolerance in first-degree relatives of subjects with type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 2007; 30:677-682.
81. Mitrakou A, Kelley D, veneman et al. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 1990; 39: 1381-1390.
82. Mueller WH, Wear ML, Hanis CL, et al. Which measure of body fat distribution is best for epidemiologic research? *Am J Epidemiol*. 1991; 133(9):858-876.
83. Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF. Insulinotropic action of glucagons-like peptide 1 (7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 1992; 15:270-6.
84. Ning F, Qiao Q, Tuomilehto J, Hammar N, Ho Sy, Söderberg S, Zimmet PZ, Shaw JE, Nakagami T, Mohan V, Ramachandran A, Lam TH, Andersson SW, Janus ED, Boyko EJ, Fujimoto WY, Pang ZC, DECODA Study Group. Does abnormal insulin action or insulin secretion explain the increase in prevalence of impaired glucose metabolism with age in populations of different ethnicities *Diabetes Metab Res Rev*. 2010 May;26(4):245-53.
85. Neary MT, Batterhan RL. Gut hormones: implications for the treatment of obesity. *Pharmacol ther* 2009; 124:44-56.
86. Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, et al. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* 2008; 5:827-35.

87. Palmer JP, Ensink JW. Acute-phase insulin secretion and glucose tolerance in young and aged normal men and diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975 Sep; 41(3):498-503.
88. Pimenta W, Korytkowski M, Mitrakou A, Jensen T, Yki-Järvinen H, Evron W, et al. Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. *J Am Med Assoc.* 1995; 273(23):1855-6.
89. Prentky M, CJ Nolan. Islet B cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006; 16:1802-12.
90. Radegran G, Blomstrand E, Saltin B. Peak muscle perfusion and oxygen uptake in humans: importance of precise estimates of muscle mass. *J Appl Physiol.* 1999; 87:2375-80.
91. Ranganath L, Sedgwick I, Morgan L, Wright J, Marks V. The ageing entero-insular axis. *Diabetologia.* 1998;(41):1309-13.
92. Røder ME, Schwartz RS, Prigeon RL, Kahn SE. Reduced pancreatic B cell compensation to the insulin resistance of aging: impact on proinsulin and insulin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2275-80.
93. Ryan AS. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med.* 2000; 30:327-46.
94. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87(1):4-14.
95. Scheen Aj. Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion? *Diabetes metab.* 2005; 31:5S27-5S34.
96. Stumvoll M, Meyer C, Kreider M, Perriello G, Gerich J. Effects of glucagon on renal and hepatic glutamine gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Metabolism* 1998; 47:1227-32.
97. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haeften T, Renn W, Gerich J. Use of The oral tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2000. Mar; 23(3):295-301.
98. Snijder MB, Dekker JM, Visser M et al. Larger thigh and hip circumferences are associated with better glucose tolerance: the Hoorn study. *Obes Res.* 2003; 11(1):104-11.

99. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Nefrologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Arq Bras Cardiol 2007;89:24-79.
100. Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2007, 168p.
101. Sociedade Brasileira de Diabetes. 2012.
102. Steil Garry M, Hwu Chi-min, Janowski, Hariri Farzam, Saad Mohammed F. Evaluation of Insulin Sensitivity and beta-cell Function Indexes Obtained From Minimal model Analysis of a Meal Tolerance Test. Diabetes. 2004;53:1201-07.
103. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, et al. Determinantes of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(8):3717-23.
104. Vaag A, Henriksen JE, Madsbad S, Holm N, Beck-Nielsen H. Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest. 1995; 95:690-74
105. Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, Pigeon RL, D'Alessio DA. Effects of GLP-1(7-36) NH₂, GLP-1(7-37), and GLP-1(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(4):1772-79.
106. Van Cauter E, Sturis J, Polonsky KS. Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels. Comparison of individual and standard kinetic parameters for C-peptide clearance. Diabetes 1992; 41:368-77.
107. Vasques AC, Rosado LE, Rosado Gp, Ribeiro Rde C, Franceschini Sdo C, Geloneze B, Priore SE, Oliveira DR. Different measurements of the sagittal abdominal diameter and waist perimeter in the prediction of HOMA-IR. Arq Bras Cardiol. 2009; 5:511-8.
108. Vasques ACJ, Rosado LHFP, Alfenas RCG, Geloneze B. Análise crítica do uso dos índices do HOMA (Homeostasis Model Assessment) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-beta pancreáticas. Arq Bras Endoc Metabol 2008; 52:32-9.

109. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ, et al. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagons-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50:609-13. 15.
110. Vilsboll T, krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, Juul AG, et al. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(6):2706.
111. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, Meier jj. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 2008; 57(3):678-87.
112. Yoshifumi Saisho, Alexandra E. Butler, Erika Manesso, David Elashoff, Robert A, Peter C. Butler. β -cell Mass and turnover in Humans. *Diabetes Care* 2013; (36)111-117.
113. Wajchenberg Bernardo L. Beta cell failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment. *Endocrine Reviews* 2007; 28(2):187-218.
114. Ward W. Kenneth, Douglas C. Bolgiano, Barbara Mcknight, Jeffrey B.Halter, and Daniel Porte Jr. Diminished B-Cell Secretory Capacity in Patients with Noninsulin-dependent Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical.* 1984; 74:1318-1328.
115. Weyer C, Bogards C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the development of type 2 diabetes mellitus: a longitudinal study in Pima Indians. *J. Clin invest.* 1999; 104: 787-794.
116. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030: *Diabetes Care* 2004; 27:1047-53.
117. Williamson DF, Kahn HS, Worthman CM, Burnette JC, Russell CM. Precision of recumbent anthropometry. *Am J Hum Biol* 1993; 5:159-67.

8 Anexos

8.1 Carta de aprovação do presente projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 14/05/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 223/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0164.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “O PÂNCREAS ENDÓCRINO NA SENECTUDE: CARACTERIZAÇÃO DA FISIOLOGIA DO EIXO ENTERO-INSULAR EM IDOSOS”.
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Bruno Geloneze Neto
INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/04/2009
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 14/05/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Caracterizar a fisiologia do eixo entero-insular em indivíduos normoglicêmicos após os 60 anos de idade em comparação com indivíduos normo-glicêmicos de meia idade. Determinar a produção de incretinas, a sensibilidade à insulina e a atividade da DPP-IV nestes dois grupos.

III - SUMÁRIO

Trabalho a se realizado no LIMED comparando dois grupos de pacientes, de acordo com a idade: 35-50 e 60-80, do ambulatório de síndrome metabólica, com tolerância normal à glicose. Serão avaliados dados clínicos, antropometria, sinais vitais e avaliações bioquímicas de rotina no HC e dosagens específicas em dois dias distintos no LIMED. Para o teste de incretina será oferecida refeição padrão antes da coleta dos exames e em seguida serão coletadas amostras de sangue no tempo: -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos. Em outro dia será realizado o teste de arginina para resposta aguda da insulina, com administração de glicose em bolus, seguida de infusão variável por no mínimo 30 minutos e após serão realizadas 6 coletas de sangue em tempos diferentes. As punções serão realizadas de uma mesma veia e a infusão de glicose em outra.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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 complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

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.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de abril de 2009.


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