



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KEILA HAYASHI NAKAMURA

O PAPEL DA OSTEOCALCINA NÃO CARBOXILADA NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE ADOLESCENTES

CAMPINAS

2018

KEILA HAYASHI NAKAMURA

O PAPEL DA OSTEOCALCINA NÃO CARBOXILADA NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE ADOLESCENTES

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. LILIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI
COORIENTADOR: PROF. DR. BRUNO GELONEZE NETO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA KEILA HAYASHI NAKAMURA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. LILIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/04454-6
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1600-2951>

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

H323p Hayashi Nakamura, Keila, 1982-
O papel da osteocalcina não carboxilada no metabolismo energético de adolescentes / Keila Hayashi Nakamura. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Lília Freire Rodrigues de Souza Li.
Coorientador: Bruno Geloneze Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Osteocalcina. 2. Diabetes Mellitus tipo 1. 3. Metabolismo energético. 4. Obesidade. 5. Pediatria. I. Li, Lília Freire Rodrigues de Souza, 1967-. II. Geloneze Neto, Bruno. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of undercarboxylated osteocalcin in adolescent energy metabolism

Palavras-chave em inglês:

Osteocalcin
Diabetes Mellitus, Type 1
Energy metabolism
Obesity
Pediatric

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Lília Freire Rodrigues de Souza Li
Sérgio Setsuo Maeda
Maria Angela Reis de Goes Monteiro Antonio

Data de defesa: 31-01-2018

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

KEILA HAYASHI NAKAMURA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LÍLIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI

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

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LÍLIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI

2. PROF(A). DR(A). SÉRGIO SETSUO MAEDA

3. PROF(A). DR(A). MARIA ANGELA REIS DE GOES MONTEIRO ANTONIO

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 31 de janeiro de 2018

DEDICATÓRIA

À minha família, meu apoio e porto seguro;

Ao meu *ditian*, Akihiro, meu maior exemplo de determinação;

Ao meu marido Victor, meu amor, incentivador e companheiro sempre;

À todas as crianças em especial minha filha, que aguarda sua hora de nascer.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li, por todo incentivo, compreensão e amizade e Prof. Dr. Bruno Geloneze Neto, pela dedicação e por todo aprendizado.

Às queridas amigas nutricionistas Daniella Fernandes Camillo e Mariana Ferrari pela amizade e companheirismo em todos os clamps realizados e na vida.

À enfermeira Daniela Regiani, excelente profissional que sempre esteve presente ajudando na assistência aos pacientes e querida amiga.

Ao biólogo Antonio Calixto pela amizade e paciência e especialmente pela ajuda na realização dos exames.

A todos os meus mestres das disciplinas de Pediatria, Genética Médica e Endocrinologia Pediátrica que me ensinaram e foram grandes exemplos.

Aos todos amigos do laboratório LIMED, CIPOL, trabalho, residência e pós-graduação pela ajuda e momentos compartilhados.

A todos os funcionários da pós-graduação, Gastrocentro, Ambulatório de Pediatria do HC-Unicamp, serviço de Fisiologia do Laboratório de Patologia Clínica.

Aos pacientes e suas famílias, motivação do estudo, pela confiança depositada em mim e no estudo.

RESUMO

Introdução: Apesar dos achados animadores em estudos animais da osteocalcina não-carboxilada (ucOC) em melhorar o metabolismo de glicose, estudos em humanos, especialmente na faixa etária pediátrica ainda são limitados e controversos.

Objetivo: O objetivo do nosso estudo foi investigar os níveis de osteocalcina não-carboxilada em adolescentes com obesidade, controles eutróficos magros e diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Além de correlacionar os níveis de ucOC com parâmetros de adiposidade, adiponectina e metabolismo de glicose.

Sujeitos: Foram incluídos nesse estudo transversal, uma população de 109 adolescentes, com idades entre 11 e 18 anos e puberdade completa.

Métodos: Um estudo de clamp hiperglicêmico em uma subamostra da população foi realizado. Parâmetros metabólicos como, índice de massa corporal (IMC), massa gorda, área de gordura visceral, glicemia de jejum, insulina de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), HOMA-IR, HOMA- β , adiponectina e osteocalcina não-carboxilada foram avaliados.

Resultados: Não houve diferenças nos níveis de ucOC entre os grupos. Não encontramos correlação entre os níveis de ucOC e IMC, massa gorda, área de gordura visceral, insulina de jejum, glicemia de jejum, HbA1c, adiponectina, HOMA-IR e HOMA- β . Também não houve correlação entre níveis de ucOC e parâmetros de sensibilidade a insulina e função de célula beta avaliados pelo clamp hiperglicêmico.

Conclusão: Não conseguimos encontrar diferenças nos níveis de ucOC entre adolescentes com obesidade, DM1 e controles magros. Mesmo usando um método

direto para avaliar a função da célula beta, nós também não encontramos nenhuma correlação entre ucOC e parâmetros metabólicos. Ainda é incerto o papel da ucOC no metabolismo energético de crianças e adolescentes, particularmente no estado euglicêmico.

Palavras chaves: osteocalcina, diabetes mellitus tipo 1, metabolismo energético, obesidade, pediatria

ABSTRACT

Background: Despite encouraging findings in animal studies of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) in improving glucose metabolism, studies in human, especially in the pediatric range are scarce and controversial.

Objective: The aim of our study was to investigate levels of undercarboxylated osteocalcin in adolescents with obesity, lean control and type 1 diabetes (T1D) and also correlations between ucOC levels and adiposity measures, adiponectin and parameters of glucose metabolism.

Subjects: A population of 109 adolescents, aged 11-18 years with complete puberty was enrolled in this cross-sectional study.

Methods: A hyperglycemic clamp in a subsample population was performed and metabolic parameters, such as, body mass index (BMI), body fat mass, visceral fat area, fasting glycemia, fasting insulin, glycated hemoglobin (HbA1c), HOMA-IR and HOMA- β , adiponectin and undercarboxylated osteocalcin were measured.

Results: There were no differences on ucOC levels between the groups. There were no correlation between ucOC and BMI, fat mass, visceral fat area, fasting insulin, HbA1c, adiponectin, HOMA-IR and HOMA- β . There was also no correlation between ucOC and clamp parameters of insulin sensitivity and beta cell function.

Conclusions: We were unable to find difference in ucOC levels in adolescents with obesity, T1D and lean control. Using a direct method to evaluate beta cell function, we also did not find any correlation of ucOC and metabolic parameters. It is uncertain the role of ucOC in children and adolescent energy metabolism, particularly under euglycemic state.

Key words: osteocalcin, type 1 diabetes, energy metabolism, obesity, pediatric.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma dos participantes submetidos ao clamp hiperglicêmico.....	40
Figura 2: Distribuição da osteocalcina não carboxilada entre os grupos de adolescentes eutrófico, obesidade e DM1	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos relacionados a ucOC em pacientes com DM1	20
Tabela 2: Estudos relacionados a ucOC em adultos	21
Tabela 3: Estudos relacionados a ucOC em crianças e adolescentes	22
Tabela 4: Estudos de ucOC com clamp euglicêmico hiperinsulinêmico	23
Tabela 5: Características dos participantes de acordo com os grupos de adolescentes eutrófico, obesidade e diabetes mellitus tipo 1	44
Tabela 6: Correlação de Spearman entre ucOC e parâmetros metabólicos	46
Tabela 7: Parâmetros do clamp hiperglicêmico de acordo com os grupos eutrófico e obesidade	47
Tabela 8: Correlação de Spearman entre ucOC e parâmetros do clamp de sensibilidade a insulina e função de célula β	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

BIA - Bioimpedância Elétrica Tetrapolar

cOC - Osteocalcina carboxilada

CV - Coeficiente de variação

DI - Índice de disposição

DM1 - Diabetes mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

DP - Desvio padrão

DXA - Densitometria por emissão de raios x de dupla energia

ERICA - Estudos de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes

F - Feminino

FSIVGTT - *Frequent Sample IV Glucose Tolerant Test*

GLA - ácido γ -carboxiglutâmico

HbA1c - Hemoglobina glicada

HOMA - *Homeostasis Model Assessment*

HOMA- β - *Homeostatic model assessment* para função de célula beta

HOMA-IR - *Homeostatic model assessment* para resistência insulínica

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISI - Índice de sensibilidade à insulina

IMC - Índice de Massa Corporal

ITT - Teste de tolerância a insulina

LIMED - Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes

Log - Logaritmo

M - Masculino

OST-PTP - Proteína tirosina fosfatase

PeNSE - Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar

QUICKI - *Quantitative insulin sensitivity check index*

SPSS - *Statistical Package for Social Science*

SSPG - *steady-state plasma glucose*

SSPI - *steady-state plasma insulin*

OMS - Organização Mundial da Saúde

TIG - Taxa média de infusão de glicose

TOTG - Teste Oral de Tolerância a Glicose

ucOC - Osteocalcina não carboxilada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O osso como órgão endócrino	17
1.2 Osteocalcina não carboxilada e metabolismo energético em humanos...	19
1.3 A epidemia da obesidade em crianças e adolescentes	24
1.4 Obesidade e metabolismo de glicose	26
1.5 Métodos de avaliação da sensibilidade a insulina e função de célula beta.....	27
1.5.1 Métodos indiretos	27
1.5.1.1 Insulinemia de jejum	27
1.5.1.2 HOMA (<i>Homeostasis Model Assessment</i>).....	28
1.5.1.3 Teste Oral de Tolerância a Glicose (TTGO)	29
1.5.1.4 Teste de tolerância endovenoso a glicose com amostras frequentes.....	29
1.5.1.5 QUICKI – <i>Quantitative insulin sensitivity index</i>	30
1.5.2 Métodos diretos	30
1.5.2.1 Teste de tolerância a insulina (ITT).....	30
1.5.2.2 Teste de supressão de insulina	31
1.5.2.3 Técnica do clamp	31
1.5.2.3.1 Clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico	31
1.5.2.3.2 Clamp hiperglicêmico.....	32
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35

3.1 Caracterização da população	35
3.2 Avaliação antropométrica	35
3.2.1 Peso	35
3.2.2 Altura	36
3.3 Avaliação de composição corporal	36
3.3.1 Índice de massa corporal	36
3.3.2 Porcentagem de gordura corporal	36
3.3.3 Quantificação da gordura visceral	38
3.4 Avaliação bioquímica	38
3.5 Avaliação da função das células beta e sensibilidade a insulina	38
3.5.1 Índices HOMA	39
3.5.2 Clamp Hiperglicêmico	39
3.6 Análise estatística	43
3.7 Aspectos éticos	43
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS	56
8. APÊNDICES	64
APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	64
9. ANEXOS	68
ANEXO 1 – Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 O osso como órgão endócrino

Nos últimos anos, estudos demonstraram uma nova via onde o esqueleto atuaria como órgão endócrino, através da osteocalcina não carboxilada (ucOC), regulando o metabolismo energético (1,2).

A osteocalcina é uma proteína derivada dos osteoblastos, constituída de 49 aminoácidos, traduzida a partir de um gene localizado no cromossomo 1. A osteocalcina é sintetizada como um pré-pro-peptídeo. Durante sua transição através do retículo endoplasmático, a pró-osteocalcina é processada em osteocalcina madura através de um mecanismo ainda desconhecido. Uma modificação pós-traducional leva à carboxilação da osteocalcina pela enzima γ -glutamil carboxilase, em um processo dependente de vitamina K, em três resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (Gla), nas posições 13,17 e 20 da sequência proteica. Essa modificação confere à proteína a capacidade de ligar fortemente os íons cálcio à hidroxiapatita na matriz óssea extracelular, atuando portanto, na efetiva mineralização do tecido ósseo. O pH ácido gerado durante a reabsorção óssea é suficiente para descarboxilar a osteocalcina, o que diminui sua afinidade pela matriz extracelular óssea e promove sua liberação na corrente sanguínea e esta porção descarboxilada (ucOC) seria a forma que atuaria como um hormônio estimulando células beta pancreáticas e de tecido adiposo (3,4).

A osteocalcina carboxilada (cOC) compreende a forma totalmente carboxilada com os 3 resíduos de glutamato carboxilados. A ucOC compreende

todas as formas de osteocalcina com carboxilação menor que três resíduos, desde zero a dois resíduos carboxilados (5).

Com o objetivo de testar a hipótese da função endócrina do esqueleto, *Lee et al* começaram a procurar por genes expressos nos osteoblastos que poderiam afetar o metabolismo energético. Observaram que ratos geneticamente modificados com falta da proteína tirosina fosfatase (OST-PTP), apresentavam hipoglicemia e eram protegidos do desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) devido um aumento da proliferação das células beta, e consequente melhor secreção e sensibilidade a insulina, demonstrando assim, um ganho de função da osteocalcina nestes animais (6). Em contraste, ratos com deficiência de osteocalcina apresentavam diminuição da proliferação de células beta, com o desenvolvimento de obesidade, intolerância a glicose e resistência insulínica. Em co-culturas de osteoblastos com células beta pancreáticas de ratos, a osteocalcina *in vitro* estimulava a expressão de genes envolvidos na produção de insulina e a adiponectina, uma adipocina que regula a sensibilidade a insulina nos adipócitos, levando a uma melhora na tolerância a glicose *in vivo*, evidenciando que o efeito da osteocalcina, pelo menos em parte, estaria vinculado ao aumento da secreção de adiponectina pelos adipócitos (6).

Após esta descoberta, vários estudos testaram a relevância terapêutica da ucOC em ratos. Em 2008, *Ferron et al* trataram ratos com ucOC em diferentes doses através de uma bomba de infusão contínua e demonstraram diminuição da glicemia e concomitante aumento da proliferação das células beta, levando a um aumento da secreção de insulina e tolerância a glicose (7). Houve ainda aumento da expressão do gene da adiponectina e de genes

associados a gasto energético, com consequente diminuição da massa gorda e diminuição do ganho de peso, concluindo que o tratamento com ucOC em ratos protegia contra o desenvolvimento de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (7).

Estudos testando a administração de ucOC através de injeções intermitentes diárias, demonstraram aumento na massa de células beta e na secreção insulínica, melhorando significativamente a tolerância a glicose e a sensibilidade a insulina em ratos tanto alimentados com uma dieta normal, quanto com uma dieta rica em gordura (8–10). Ocorreu também menor ganho de peso e menor ganho de gordura comparado com ratos que receberam placebo (9,10).

Dois estudos sobre o tratamento com ucOC através de administração oral também se provou efetiva em modelos animais, diminuindo a glicemia, aumentando células beta e produção de insulina, levando a uma melhor tolerância a glicose (11,12).

Assim, a ucOC poderia ser um tratamento promissor para obesidade e diabetes, no entanto, até o momento não temos conhecimento de estudos em humanos em relação ao tratamento de osteocalcina não carboxilada. No único estudo *in vitro* com cultura de ilhotas pancreáticas humanas, a osteocalcina não carboxilada estimulou a proliferação das células beta e de sua função, aumentando a secreção de insulina e peptídeo C (13).

1.2 Osteocalcina não carboxilada e metabolismo energético em humanos

Apesar da desregulação metabólica no diabetes mellitus tipo 1 (DM1), os níveis de ucOC não aparentam ser diferentes de indivíduos controles saudáveis (14–16) (Tabela 1). Thraikill et al estudaram 115 pacientes com

DM1, com idades entre 14 e 40 anos e encontraram que os níveis de cOC e ucOC não eram diferentes da população controle (14). Da mesma forma, Neumann et al avaliaram 128 pacientes adultos com DM1, de 20 a 70 anos de idade e também não mostraram diferenças dos níveis de ucOC em relação aos controles saudáveis. Nestes pacientes com DM1, a ucOC foi inversamente correlacionada com a hemoglobina glicada (HbA1c), mostrando estar associada com um bom controle glicêmico (15). Redondo et al também demonstraram que a ucOC era inversamente correlacionada com a HbA1c em crianças recentemente diagnosticadas com DM1 e DM2 (17). Em contrapartida, estudando 108 adultos com DM1, Yeap et al não encontraram associação da osteocalcina total e ucOC com nenhum marcador de homeostase da glicose, incluindo a HbA1c (16).

Tabela 1. Estudos relacionados a ucOC em pacientes com DM1

Autores	Ano	n	Idade	Resultado
Thraikill et al	2012	115	14-40 anos	Sem diferença com controles saudáveis
Neumann et al	2016	128	20-70 anos	Sem diferença com controles saudáveis

Estudos em adultos confirmaram o importante papel da ucOC no metabolismo de glicose (Tabela 2). Níveis aumentados de ucOC foram associado com melhora da tolerância a glicose e aumento da função da célula beta (18–20) e inversamente associados com os níveis de glicose, resistência insulínica (21) e risco aumentado de diabetes (22). Em um estudo longitudinal,

níveis aumentados de ucOC em homens adultos foram associados com melhora na ação da insulina (23). Em adultos com pré-diabetes (24) e DM2 (25–27), a ucOC estava diminuída e também inversamente correlacionada com massa de gordura, glicemia, HbA1c (25,27,28) e níveis de insulina (24,25).

Tabela 2. Estudos relacionados a ucOC em adultos

Autores	Ano	Método	Resultado
Hwang et al	2009	HOMA- β	ucOC inversamente correlacionado com resistência insulínica e função célula beta
Bulló et al	2012	HOMA-IR, HOMA- β	
Iki et al	2012	HOMA-IR	
Gower et al	2013	FSIVGTT	
Takashi et al	2017	Resposta peptideo C (Teste refeição/glucagon)	
Guo et al	2017	HOMA-IR	
Díaz-López et al	2013	Prospectivo – 5 anos HOMA-IR	Menor ucOC associado a maior risco desenvolver DM2
Razny et al	2015	Insulinemia	Diminuição ucOC em prediabéticos
Yano et al	2015	Insulinemia	Diminuição ucOC em DM2
Sanchez-Enriquez et al	2017	Insulinemia	
Kanazawa et al	2011		Correlação inversa da ucOC com massa gorda, glicemia, Hbglí
Yano et al	2015	Insulinemia	
Sanchez-Enriquez et al	2017	Insulinemia	

Estudos na faixa etária pediátrica ainda são limitados e o papel na ucOC na função da célula beta se mantém controverso (Tabela 3). *Pratz-Puig et al.* avaliaram 103 crianças pré-púberes saudáveis, e encontraram que elevados níveis da razão de ucOC e cOC, estavam associados com elevados níveis de adiponectina de alto peso molecular nas crianças com índice de massa corporal (IMC) acima da mediana ($r=0,46$, $p<0,001$), e com a secreção de insulina, demonstrada através de maiores valores de HOMA- β (*Homeostatic model assessment* para função de célula beta) nas crianças magras ($p<0,001$) (29). *Tubic et al* encontraram que os níveis de cOC eram menores nas crianças com sobrepeso comparadas com as de peso normal, mas não encontrou diferença nos níveis da ucOC entre os grupos (30). *Giudici et al* também não encontraram diferenças nos valores da ucOC entre crianças obesas e não obesas de 8 a 13 anos de idade, e nenhuma correlação da ucOC com parâmetros metabólicos (31). Quando crianças com pré-diabetes e DM2 foram avaliadas, menores níveis de ucOC foram descritos em associação com disfunção de célula beta e secreção insulínica (32–34).

Tabela 3. Estudos relacionados a ucOC em crianças e adolescentes

Autores	Ano	Método	Resultado
Tubic et al	2016	HOMA-IR Insulinemia	Sem diferença ucOC entre o grupo sobrepeso e eutrófico
Giudici et al	2017	HOMA-IR HOMA- β	Sem diferença ucOC grupo obeso e eutrófico
Pratz-Puig et al	2010	HOMA-IR HOMA- β	Relação uc/coc: Correlação positiva adiponectina nos com maior IMC e correlação positiva HOMA- β nos com menor IMC

Pollock et al	2011	TOTG	Diminuição ucOC nos prediabéticos Associado disfunção célula β
Takaya et al	2016		Diminuição ucOC nos DM2

Todos estes estudos utilizaram métodos indiretos de avaliação da homeostase de glicose. Estudos que relacionaram a ucOC com o metabolismo de glicose usando a técnica do *clamp*, um método direto e padrão ouro para avaliar sensibilidade a insulina, são escassos e nós encontramos apenas dois estudos na literatura (Tabela 4). Um deles envolvendo adultos com DM2 (35) e outro com uma população acima de 17 anos de adultos jovens com obesidade, sobrepeso e eutróficos (36). Os dois estudos não mostraram associação da ucOC com resistência insulínica medida através do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (35,36). Entretanto, é importante notar que neste tipo de *clamp*, apenas a sensibilidade à insulina é avaliada, não sendo avaliada a função da célula beta.

Tabela 4. Estudos de ucOC com clamp euglicêmico hiperinsulinêmico

Autores	Ano	População	Método	Resultado
Mori et al	2012	129 Adultos DM2 54.9±12.3anos	Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico	ucOC não correlacionado com resistência insulínica
Polgreen et al	2013	N=137 17-22 anos Obesidade Sobrepeso Eutróficos	Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico	ucOC não correlacionado com resistência insulínica

1.3 A epidemia de obesidade em crianças e adolescentes.

A obesidade em crianças e adolescentes vem aumentando ao redor do mundo e anormalidades metabólicas como a resistência insulínica e o DM2 tem se tornado mais frequente nessa população, mas as opções terapêuticas ainda são limitadas.

Uma análise sistemática avaliando a prevalência de sobrepeso e obesidade global em crianças e adultos, demonstrou um aumento de 47,1% de sobrepeso e obesidade nas crianças entre os anos de 1980 a 2013 (37). A prevalência de sobrepeso e obesidade nas crianças em países desenvolvidos no período aumentou de 16,9% para 23,8% nos meninos e de 16,2% para 22,6% nas meninas (37). Nos países em desenvolvimento, houve um aumento de 8,1% para 12,9% nos meninos e de 8,4% para 13,4% nas meninas (37). Um outro estudo analisando a tendência global do IMC, sobrepeso e obesidade de 1975 a 2016, com dados de todos países do mundo, totalizando 1947 estudos com avaliações de 31,5 milhões de crianças de adolescentes de 5 a 19 anos, demonstrou que a média de IMC e a prevalência de obesidade aumentou em todo o mundo em crianças e adolescentes (38). Durante os 42 anos de análise, a prevalência da obesidade nessa faixa etária aumentou de 0,7% para 5,6% nas meninas e de 0,9% para 7,8% nos meninos (38). Em números absolutos, o número de meninas com obesidade aumentou de 5 milhões em 1975 para 50 milhões em 2016 e nos meninos de 6 milhões para 74 milhões (38).

No Brasil, um estudo recente multicêntrico denominado Estudos de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes (ERICA) envolvendo 73.399

adolescentes, encontrou uma prevalência de obesidade de 8,4% (39). Na Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE) de 2015, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde, englobando um total de 118.909 adolescentes, frequentadores de 3411 escolas de todo país, em uma subamostra de 10.926 adolescentes de 13 a 17 anos, foi observada uma prevalência de 23,7% de excesso de peso (sobrepeso e obesidade) (40).

A obesidade na faixa etária pediátrica aumenta o risco de várias comorbidades, incluindo DM2, dislipidemia, hipertensão, apneia do sono, esteatose hepática e aterosclerose subclínica precoce levando a doença cardiovascular e mortalidade prematura do adulto (41–48).

Apesar da alta prevalência da obesidade na faixa etária pediátrica e do risco de comorbidades associadas, ainda temos poucas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento. As medidas de mudança de estilo de vida, baseada em dieta e atividade física apresentam resultados modestos, variando de 5 a 20% de perda de peso ou 1 a 3 U de IMC, o que muitas vezes não é suficiente para que o adolescente deixe de ser obeso (43). De acordo com o guideline de Obesidade em Pediatria da Sociedade de Endocrinologia Europeia, as drogas para emagrecimento atualmente disponíveis para adultos, somente devem ser utilizadas em adolescentes acima de 16 anos de idade com obesidade grave, IMC maior que 30kg/m^2 ou IMC maior que 27kg/m^2 na presença de comorbidades. Não sendo recomendado o uso em menores de 16 anos principalmente devido a falta de estudos de segurança e eficácia na faixa etária pediátrica (49).

1.4 Obesidade e metabolismo de glicose

A homeostase normal de glicose é o resultado da interação entre a sensibilidade dos tecidos à insulina (fígado, músculo e adipócitos) e a secreção de insulina pela célula beta.

A resistência insulínica é definida como uma diminuição da resposta dos tecidos às ações celulares mediadas pela insulina e refere-se a captação de glicose diminuída por todo corpo em resposta a níveis fisiológicos de insulina e suas consequências no metabolismo de glicose e insulina (50).

A obesidade é o estado patológico mais comum associado a resistência insulínica. Estudos em crianças e adolescentes, mostraram que a sensibilidade à insulina é inversamente associada ao IMC e a porcentagem de gordura corporal e os obesos, especialmente os que tinham maior quantidade de tecido adiposo visceral, apresentavam menor sensibilidade a insulina (51–53)

A resistência insulínica e a diminuição da função da célula beta são os principais componentes da patogênese do DM2 nas crianças e adolescentes (54–56). Um estudo longitudinal avaliando a história natural da progressão de tolerância normal à glicose para intolerância à glicose em adolescentes obesos, demonstrou uma falência primariamente na função da célula beta, agravado pela progressiva piora da sensibilidade a insulina (57).

A epidemia da obesidade trouxe o aumento da incidência de DM2 em crianças e adolescentes, uma doença relativamente rara nessa faixa etária (58,59). As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento do DM2 em crianças também são limitadas. Atualmente, mudanças no estilo de vida,

metformina e insulina são as únicas modalidades terapêuticas aprovadas e disponíveis (59).

Como a resistência insulínica é claramente reconhecida como um dos fatores de risco para o desenvolvimento do DM2, apesar de não ser indicada na prática clínica usual, a avaliação da sensibilidade à insulina e função de célula beta são importantes no âmbito da pesquisa (60). Essas medidas de forma acurada possibilitam um melhor entendimento da fisiopatologia e prognóstico de crianças e adolescentes com obesidade e DM2, podendo-se avaliar marcadores precoces e preditores de morbidade futura e possíveis estratégias de prevenção e intervenção (61).

1.5 Métodos de avaliação da sensibilidade a insulina e função de célula beta

Os métodos podem ser divididos em diretos e indiretos. Os métodos diretos analisam a resposta a uma quantidade estabelecida de insulina injetada no indivíduo, enquanto os métodos indiretos avaliam a ação insulínica através da insulina endógena (62).

1.5.1 Métodos Indiretos

1.5.1.1 Insulinemia de Jejum

A dosagem de insulina de jejum é um método simples e fornece uma avaliação da sensibilidade à insulina no organismo como um todo, estando aumentada em indivíduos com resistência a insulina. Contudo, apresenta fraca correlação com o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em um estudo com uma grande coorte ($r=0.42$) (63) e dependendo do ensaio utilizado pode ocorrer reação cruzada com a pró-insulina, distorcendo os resultados

(64). Ainda, em diabéticos, a insulinemia diminuída pode não indicar uma baixa resistência insulínica, mas uma falência da célula beta pancreática.

1.5.1.2 HOMA (*Homeostasis Model Assessment*)

Em 1985, *Matthews et al.* desenvolveram um modelo matemático, onde foi possível através das medidas de glicemia e insulina de jejum, extrair dois índices (HOMA-IR e HOMA- β) que expressam a sensibilidade à insulina e a função da célula beta respectivamente (65).

Os índices são definidos pelas seguintes equações:

$$\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{insulina de jejum}) / (\text{glicemia de jejum} - 3,5)$$

$$\text{HOMA-IR} = (\text{insulina de jejum} \times \text{glicemia de jejum}) / 22,5$$

Insulina de jejum em mU/L e glicemia de jejum em mmol/L

O índice de HOMA-IR apresenta correlação positiva e altamente significativa com a resistência insulínica estimada pelo *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico ($r=0,88$, $p<0,0001$) (65).

Estudos em crianças e adolescentes também confirmaram a correlação entre o HOMA-IR e avaliação pelo *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico (63,66–68) e pelo *clamp* hiperglicêmico (66).

Este índice constitui uma valiosa alternativa às técnicas mais sofisticadas e trabalhosas como o *clamp* na avaliação de resistência insulínica em humanos, sendo um método adequado principalmente para uso em estudos em larga escala. O método contudo, possui algumas ressalvas, visto que o índice é baseado em parâmetros avaliados em jejum onde a glicose está sendo captada principalmente nos tecidos insulino-independentes; a questão

da proporção entre insulinemia e grau de resistência insulínica e a falta de distinção entre resistência insulínica hepática e nos tecidos periféricos. Além disso, ainda não há um consenso na definição dos pontos de corte para classificação da resistência insulínica, dificultando sua utilização especialmente na prática clínica (62).

1.5.1.3 Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG)

O teste consiste na ingestão de 75g de glicose por via oral, com determinações de glicemia e insulinemia a cada 15 ou 30 minutos durante 2 a 3 horas. A razão entre a glicemia e a insulinemia em termos absolutos ou relativos ao basal é calculada para cada ponto da curva e também para toda a curva. Quanto menor o incremento da glicose por unidade de insulina, mais sensível é o indivíduo.

É um teste pouco reprodutível, com variações de 25 a 30%. Outras limitações incluem a variada absorção de glicose pelo trato digestivo, o efeito dos hormônios entero-insulares e a sobrecarga de glicose podendo levar a supressão na produção hepática de glicose e sua metabolização sendo assim, impossível estimar com precisão o consumo de glicose induzido pela insulina (62).

1.5.1.4 Teste de tolerância endovenoso a glicose com amostras frequentes (*Frequent Sample IV Glucose Tolerant Test – FSIVGTT*)

Em 1979, *Bergaman et al.* desenvolveram um modelo matemático para estimar a sensibilidade a insulina a partir do uso de glicose endovenosa (69). O índice de sensibilidade a insulina representa o clearance de glicose por unidade de insulinemia plasmática.

O exame é realizado após jejum noturno, sendo coletado amostras basais e após a injeção de glicose por via endovenosa, com duração de até 4 horas.

Trata-se de um modelo simples, com baixo de risco de efeitos colaterais, avalia primeira e segunda fase de secreção a insulina, além de ser eficiente para extrair um índice de sensibilidade a insulina preciso em indivíduos saudáveis, porém apresenta uma grande variabilidade de resposta em diabéticos (70). Como desvantagens apresenta a impossibilidade de utilização nos pacientes com DM1 ou DM2 com deficiência intensa da produção de insulina, além de interferência da glicose endogenamente produzida, podendo superestimar a sensibilidade a insulina em 30% (71). Estudos que comparam o método com o *clamp*, demonstram correlações variáveis (71–73).

1.5.1.5 QUICKI – *Quantitative insulin sensitivity check index*

Método também baseado na homeostasia da relação entre glicemia e insulina de jejum, de acordo com a fórmula (74):

$$\text{QUICKI} = 1 \div (\text{Log insulina} + \text{Log glicemia})$$

1.5.2 Métodos diretos

1.5.2.1 Teste de tolerância a insulina (ITT)

Primeira técnica desenvolvida para avaliar a sensibilidade a insulina de forma direta *in vivo*, consiste na injeção de insulina regular e avaliação da taxa de decaimento da glicose nos 15 minutos seguintes. Esta queda da glicose é determinada pela supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis. Quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, maior o índice e mais sensível o indivíduo. Este

método apresenta altas correlações tanto com *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, quanto hiperglicêmico (62).

1.5.2.2 Teste de supressão de insulina

Shen et al. desenvolveram a técnica de infusão quádrupla, a qual avalia o consumo de glicose injetada a partir de um nível fixo de hiperinsulinemia (75). Utiliza-se epinefrina ou somatostatina (76) para suprimir a secreção endógena de insulina, propranolol para bloquear a produção endógena de glicose e injeção de doses fixas de glicose e insulina. A hiperglicemia e hiperinsulinemia produzem uma inibição completa da produção hepática de glicose (77) e da secreção de insulina (78), produzindo um nível estável de insulina (*steady-state plasma insulin SSPI*) e de glicose (*steady-state plasma glucose SSPG*). O SSPG fornece uma medida da capacidade da insulina em estimular o consumo de glicose infundida. Assim, quanto maior o SSPG mais resistente à insulina é o indivíduo (77,78)

1.5.2.3 Técnica do *clamp*

Esta técnica possibilita examinar a sensibilidade tecidual à insulina e também a resposta da célula beta à glicose, em situações de constância de glicemia e insulinemia.

Em 1979, *DeFronzo et al* desenvolveram a técnica do *clamp* de glicose em suas duas principais variações (79).

1.5.2.3.1 *Clamp* Euglicêmico-hiperinsulinêmico

Esta variante é considerada o padrão ouro para avaliação da ação da insulina, pois permite a medida mais pura da sensibilidade à insulina dos tecidos. O objetivo do exame é aumentar agudamente e manter os níveis de

insulinemia nos níveis desejados, enquanto a glicemia é mantida constante no nível basal. Assim, tanto a glicose quanto a insulina estão “clampeadas” durante o procedimento (61).

Ele permite a medida da captação total de glicose em resposta a uma hiperinsulinemia fixa, baseado no conceito de que em condições constante de glicemia e hiperinsulinemia, a quantidade de glicose consumida pelos tecidos seria igual à quantidade de glicose infundida (62). Quando um indivíduo é sensível à insulina, uma maior quantidade de glicose é necessária para manter a euglicemia, ocorrendo o inverso em indivíduos com resistência insulínica (80).

Apresenta algumas desvantagens como necessidade de equipamentos e materiais de alto custo e pessoal altamente especializado e treinado, além da difícil aplicação em investigações de larga escala (61,62)

1.5.2.3.2 *Clamp* Hiperglicêmico

Este método é primariamente utilizado para medir a função da célula beta, mas uma medida indireta da sensibilidade à insulina pode ser calculada utilizando esta técnica (60). Possibilita avaliar a resposta secretória de insulina da célula beta à glicose e quantifica o consumo de glicose do organismo como um todo durante uma condição de hiperglicemia controlada (62). Durante o *clamp* hiperglicêmico, a concentração de glicose plasmática é agudamente elevada e mantida em uma dada hiperglicemia ($225\text{mg/dl} \pm 10\%$) por 2 horas. A hiperglicemia é conseguida através da infusão em bolo de uma solução de glicose a 25-50% durante 2 minutos, seguido por uma infusão variável de glicose a 20%. O *clamp* hiperglicêmico estimula ao máximo a secreção de

insulina endógena, sendo esta resposta da insulina a glicose bifásica, com uma rápida primeira fase de secreção nos primeiros 10 minutos após a infusão em bolo, seguido por um aumento gradual na segunda fase de secreção (61).

Quando comparados com a avaliação de sensibilidade à insulina do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, o *clamp* hiperglicêmico mostrou ter uma boa correlação, possibilitando seu uso também para avaliar a sensibilidade a insulina. *Sjaarda et al* realizaram as duas variações de *clamp* em 330 adolescentes: 73 eutrófico, 168 obesos com tolerância normal à glicose, 57 obesos com intolerância à glicose e 32 obesos com DM2 e encontraram que o índice de sensibilidade à insulina do *clamp* hiperglicêmico foi fortemente correlacionado com o índice de sensibilidade à insulina derivado do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico no grupo total ($r=0.90$, $p<0.001$) e nos quatro grupos separadamente ($r \geq 0.66$, $p<0.001$) (81).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as concentrações séricas da ucOC em adolescentes pós púberes eutróficos, em portadores de DM1 e nos com obesidade.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a correlação entre a concentração sérica de ucOC e parâmetros de medidas de adiposidade, como IMC, porcentagem de gordura corporal total e visceral e adiponectina.
- Avaliar a correlação entre as concentrações séricas de ucOC e parâmetros de metabolismo de glicose: glicemia de jejum, insulinemia de jejum e HbA1c.
- Avaliar a correlação entre as concentrações séricas de ucOC e função de célula beta e sensibilidade a insulina em adolescentes eutróficos e com obesidade.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Caracterização da população

Realizou-se um estudo transversal, onde foram avaliados 109 adolescentes de ambos os sexos com idades entre 11 e 18 anos.

Os critérios de inclusão foram adolescentes com obesidade, eutróficos ou com DM1. Como os níveis de ucOC podem variar de acordo com o desenvolvimento puberal, a autora principal, que é médica endocrinologista pediátrica, avaliou o estágio puberal dos adolescentes e foram incluídos apenas aqueles com puberdade completa avaliados por meio do método de Tanner.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com obesidade de causa genética, presença de doença crônica ou uso de medicações que pudessem influenciar o metabolismo ósseo e de glicose, especialmente o uso de corticosteroides.

3.2 Avaliação antropométrica

3.2.1 Peso

O peso foi avaliado por meio de uma balança digital com capacidade de 200 kg e sensibilidade de 100 gramas, da marca *Welmy®*. A pesagem foi realizada com o voluntário descalço, vestindo roupas leves, posicionado em pé no centro da plataforma da balança, com os braços ao longo do corpo e com olhar em um ponto fixo a sua frente (82).

3.2.2. Altura

A altura foi aferida com o auxílio de um estadiômetro fixado na parede com capacidade de 2.20 metros, da marca *Sanny®*. O voluntário foi medido em posição ortostática, com os pés unidos e com os calcanhares, a região occipital e as cinturas pélvica e escapular em contato com a escala do estadiômetro. A cabeça foi orientada no plano de Frankfurt (82).

3.3 Avaliação de composição corporal

3.3.1 Índice de massa corporal (IMC)

Para avaliação do IMC para a idade dos indivíduos foi utilizada a curva de crescimento da Organização Mundial de Saúde (OMS) para cada sexo, onde a classificação do estado nutricional é obtida por meio dos valores de percentis (83). O percentil menor ou igual a 3 corresponde ao adolescente com baixo IMC, o percentil entre 3 e 85 corresponde ao adolescente eutrófico (com IMC adequado para sua altura), o percentil entre 85 e 97 refere-se ao adolescente com sobrepeso e o percentil maior ou igual a 95 a adolescentes obesos.

3.3.2 Porcentagem de gordura corporal

A porcentagem de gordura corporal foi aferida por meio do Teste de Bioimpedância Elétrica Tetrapolar (BIA), que se baseia na condução de uma corrente elétrica de baixa intensidade pelo corpo do indivíduo, e por isso tem a capacidade de definir a massa magra (ossos, músculos e órgãos vitais), massa de gordura e água corporal total.

O equipamento utilizado para o teste foi da marca *Bioimpedance Analyzer - BIA 310[®]*, seguindo os critérios de *Lukaski et al* e *Biodynamics Corporation* (84).

Para a realização do exame foram retirados todos adornos de metal. O adolescente permaneceu deitado em decúbito dorsal sobre uma superfície não condutora, com os braços e pernas estendidos e separados, sem contato entre pernas e coxas e entre braços e tronco. Foram posicionados dois conjuntos de eletrodos, sendo um na mão direita (eletrodo distal na base do dedo médio e eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estiloide) e outro no pé direito (eletrodo distal na base do dedo médio e eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral). Conectou-se o cabo sensor no monitor e suas extremidades nos eletrodos. Os clips pretos do cabo sensor foram colocados nos eletrodos distais e os vermelhos nos proximais. O adolescente permaneceu em silêncio durante a avaliação.

Antes da realização do teste, os adolescentes receberam as seguintes orientações baseadas em protocolo já proposto: jejum de alimentos, bebidas e água por 4 horas para a realização do exame, não utilizar diuréticos 7 dias antes, não consumir bebidas alcoólicas nas 48 horas precedentes, não realizar atividades físicas extenuantes 24 horas antes, urinar pelo menos 30 minutos antes, não estar menstruada no dia do teste e permanecer deitado em decúbito dorsal por 5 minutos antes da execução do mesmo (84).

Foram excluídos do teste indivíduos portadores de marcapasso e gestantes, nos quais a BIA é totalmente contraindicada.

3.3.3 Quantificação da gordura visceral

A distribuição de gordura abdominal (visceral e subcutânea) foi medida com o aparelho de Densitometria por emissão de raios x de dupla energia (DXA) da marca *CORESCAN (GE)*, e utilizou-se um software específico para quantificação da gordura visceral.

3.4 Avaliação bioquímica

As amostras foram coletadas após jejum noturno de 12 horas. Glicemia de jejum, HbA1c, peptídeo C e insulinemia de jejum foram analisadas no mesmo dia, enquanto para avaliação de adiponectina e ucOC o soro foi separado em até uma hora após a coleta e armazenado a -20°.

A glicemia de jejum foi determinada pela técnica de oxidação da glicose. Insulinemia de jejum e peptídeo C foram determinados por ensaios de quimioluminescência. HbA1c foi mensurada pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Os níveis da ucOC foram dosados por método imunoenzimático (*GenWay hOST-EASIA Kit*), com coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaios menores que 5,5%.

A adiponectina sérica foi mensurada pelo método imunoenzimático (*ELISA – Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine Kit*), sendo o CV intra e inter-ensaios menores que 6,9%.

3.5 Avaliação da função das células beta e sensibilidade a insulina

A função da célula beta e a sensibilidade à insulina foram avaliadas pelos índices do modelo matemático HOMA e pela técnica de *clamp*

hiperglicêmico nos indivíduos obesos e controles. Não realizou-se esta avaliação funcional em indivíduos com DM 1.

Como a ucOC pode estar relacionada mais especificamente com a função da célula beta, optamos por incluir uma avaliação com o *clamp* hiperglicêmico, um método primariamente utilizado para medir diretamente a função da célula beta, mas com uma medida indireta da sensibilidade a insulina.

3.5.1 Índices HOMA

Os índices do HOMA foram calculados a partir das fórmulas descritas previamente (65). O HOMA- β avaliou função de célula beta e o HOMA-IR avaliou a resistência insulínica.

3.5.2 *Clamp* hiperglicêmico

Realizou-se o estudo de *clamp* hiperglicêmico de 2 horas em uma subamostra de 49 adolescentes (44,95% da amostra total), sendo 27 com obesidade (55,1%) e 22 controles magros e saudáveis (44,9%) com técnica previamente descrita (61) (Figura 1).

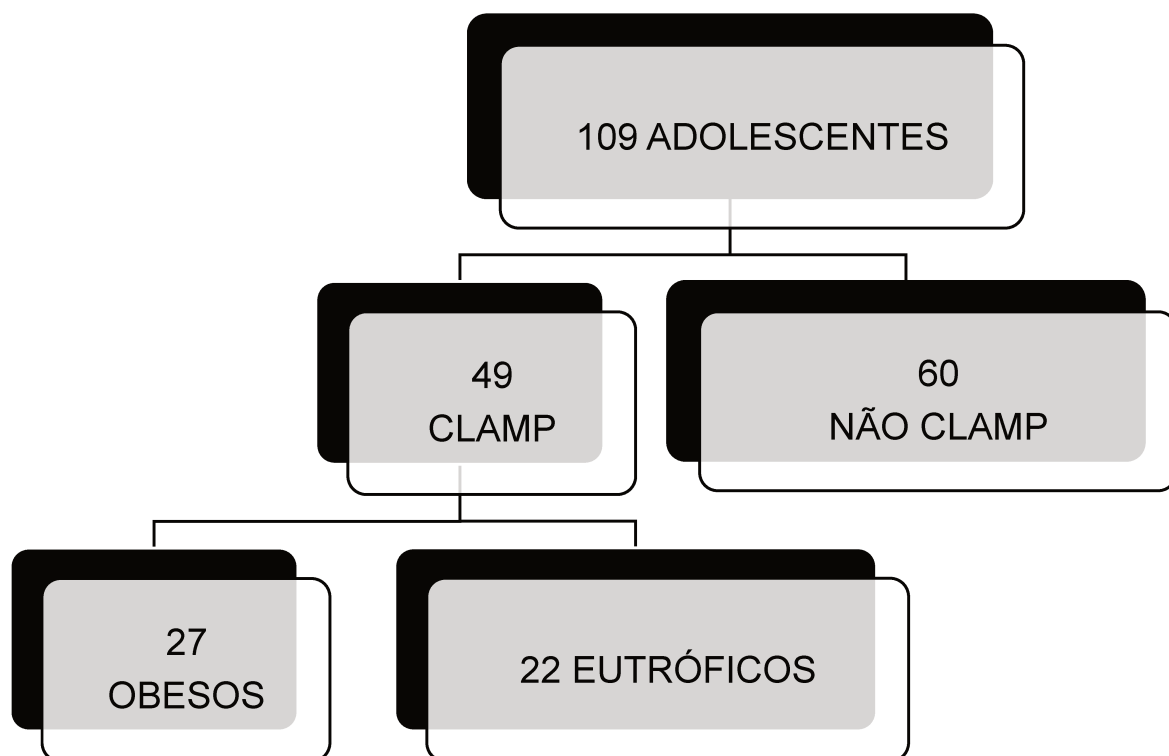


Figura 1. Fluxograma de pacientes submetidos ao clamp hiperglicêmico

A técnica consiste na infusão endovenosa de glicose com o objetivo de aumentar a glicemia agudamente a um platô hiperglicêmico fixo de 225mg/dL por 120 minutos.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes (LIMED), com início as 8 horas da manhã após jejum de 12 horas. Os pacientes permaneciam deitados em decúbito dorsal e com duas punções venosas com cateter tipo venocan. Uma punção retrógrada em veia superficial do braço para coleta de sangue, mantida aquecida por uma manta térmica (com temperatura aproximada de 50° a 55°) para arterialização do sangue venoso. No braço contralateral, um outro cateter venoso para infusão de solução glicosada a 20%.

Por 30 minutos, antes do início da infusão da solução glicosada, colheu-se três amostras basais, a cada 15 minutos, para dosagem de glicose, insulina e peptídeo C plasmáticos.

A infusão de glicose foi dividida em duas fases. A “primeira dose”, que compreende uma quantidade suficiente de glicose para elevar a glicemia agudamente ao *platô* desejado de 225mg/dL. Esta foi infundida em bolo, sendo a quantidade de glicose baseada no peso corporal e na glicemia inicial de cada adolescente, segundo a fórmula:

Bolo inicial de glicose = $(225 \text{ [mg/dl]} - \text{Glicemia de jejum [mg/dl]}) * \text{Peso corporal [kg]} * \text{Fator de distribuição de glicose [dl/kg]}$

- Glicemia de jejum = média da glicemia de jejum obtida nas três amostras basais.
- Fator de distribuição de glicose = 1,5 para adolescentes com peso normal e 1,1 para adolescentes com sobrepeso ou obesidade.

Imediatamente após a infusão por até 2 minutos da primeira dose, a segunda fase correspondeu a “dose de manutenção”, através de infusão variável de glicose, ajustada de acordo com os resultados das medidas de glicemia, dosadas a intervalos de 5 minutos ao longo das duas horas de duração do teste com objetivo de manter hiperglicemia em $225\text{mg/dL} \pm 10\%$.

Utilizou-se para o teste, uma bomba de infusão (*Optima MS Fresenius Kabi®*), uma mini centrífuga (*Star plus® - Labtrade do Brasil Ltda*) para o processamento do sangue e posterior dosagem da glicemia no bioanalizador (*Glucose Analyzer® YSI 2700 – YSI Life Sciences, Yellow Spring, OH, USA*).

Durante os primeiros 15 minutos do *clamp*, coletamos amostras de sangue a cada 2,5 minutos, para a determinação de glicose, insulina e peptídeo C. A partir do minuto 15 até os 120 minutos do *clamp*, as amostras foram coletadas a cada 5 minutos para a determinação da glicemia e a cada 15 minutos para a determinação da insulina e do peptídeo C.

Ao final do *clamp*, oferecemos uma refeição ao participante do estudo. O acompanhamento se estendeu por pelo menos 1 hora após o período do teste, quando então retirou-se as vias de acesso venoso.

Calculou-se a primeira fase de secreção de insulina como a média das cinco dosagens de insulina nos tempos 2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5 do *clamp*, e a segunda fase como a média das dosagens realizadas entre os tempos 15 e 120 minutos. A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo índice de sensibilidade à insulina (ISI), calculado dividindo-se a média da taxa de infusão de glicose durante a última hora do *clamp* menos a excreção urinária de glicose, pela média da insulinemia durante o mesmo período. Sob condições de equilíbrio hiperglicêmico, a taxa média de infusão de glicose (TIG) fornece uma estimativa da quantidade de glicose metabolizada pelos tecidos, uma vez que a produção endógena de glicose está suprimida. Esse valor, dividido pela resposta insulinêmica plasmática proporciona uma estimativa da sensibilidade tecidual à insulina endógena secretada pelo pâncreas.

Calculou-se o *Disposition Index* (DI) como o produto do índice de sensibilidade a insulina e a primeira fase de secreção de insulina.

3.6 Análise estatística

Os dados foram processados com o programa SPSS® (versão 21.0; SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Teste *t* de Student para amostras independentes e ANOVA foram usados para determinar as diferenças entre as médias. Teste do Qui-Quadrado foi utilizado para comparação de variáveis categóricas. Quando os parâmetros investigados não apresentavam distribuição normal, a comparação das variáveis foram realizadas usando os testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*. Como a ucOC não apresentava distribuição normal, utilizou-se o coeficiente de correlação de *Spearman* para determinar a relação entre a ucOC e outras variáveis.

3.7 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sob parecer número 14906).

Apresentou-se aos pais ou responsáveis o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice), no qual foi informado os objetivos e métodos da pesquisa, e os mesmos o assinaram antes do adolescente entrar no estudo.

4. RESULTADOS

As características gerais dos adolescentes participantes no estudo estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Características dos participantes de acordo com o grupo

	Eutrófico (n=42)	Obesidade (n=47)	DM1 (n=20)
Sexo, M/F	17/25	21/26	10/10
Idade, anos	15.62±1.78	14.26±1.8*	14.65±1.63
Peso, kg	56.3±10	93.7±21.6**	61.5±12.6
Altura, cm	163.9±9.3	165.8±7.1	162.6±8.2
IMC, kg/m²	20.9±2.4	33.9±6.8**	23.2±3.96
Gordura Corporal (BIA), %	22.7 ± 6.7	36.8±5.4**	25.8 ± 7.2
Gordura Corporal (DXA),%	25.6 ± 9.5	43.7 ± 7**	28.8 ± 9.6
Gordura visceral, cm³	164.66 ± 100.5	946.37 ± 650.3**	246.3 ± 285.9
HbA1c, % (mmol/mol)	5.2 ± 0.4 (33.1±4.5)	5.3 ± 0.4 (33.9±4.2)	9.6± 1.7 (81.5±18.4)***
Glicemia de jejum, mg/dl	76.7 ± 8.5	79.6 ± 6.7	223.7 ± 122.6***
Insulina de jejum, mUI/mL	6.9 ± 2.8	17.2 ±12.6*	-
HOMA-IR	1.3 ± 0.6	3.4 ± 2.5*	-
HOMA-β	216.98 ± 467.8	487.3 ±488.2*	-
Peptídeo C, ng/ml	0.91 ± 0.8	1.39 ±0.6*	-
Adiponectina, µg/mL	3.2 ± 1.8	2.9 ± 1.7	3.6 ± 3.1
ucOC, ng/mL	23.3 ± 26.7	33.8 ± 35.7	42 ± 34.9

Todos os valores estão expressos em média ± DP. M: masculino, F: feminino, IMC: índice de massa corporal, BIA: bioimpedância, DXA: Densitometria por emissão de raios x de dupla energia, HbA1c: hemoglobina glicada, HOMA-IR: homeostasis model assessment para resistência insulínica, HOMA-B: homeostasis model assessment para função de célula β, ucOC: osteocalcina não carboxilada. *P<0.05 grupo obesidade diferente do grupo eutrófico ** P<0,05 grupo obesidade diferente do grupo eutrófico e DM1. *** P<0,05 grupo DM1 diferente do grupo obesidade e eutrófico

Apesar da idade entre os adolescentes do grupo com obesidade ser significativamente menor que dos adolescentes eutróficos, os dois grupos apresentaram altura final semelhantes, mostrando uma maturação óssea semelhante. Os adolescentes com obesidade apresentaram maiores valores de peso, IMC, tecido adiposo visceral e massa gorda tanto pela avaliação da bioimpedância quanto pelo DXA em relação aos adolescentes eutróficos e com DM1. Como esperado, o grupo com DM1 apresentou valores de glicemia de jejum e HbA1c maiores que o grupo com obesidade e eutróficos. Em relação aos níveis de insulina de jejum e peptídeo C os obesos apresentaram valores significativamente maiores que o grupo eutrófico. Em relação à resistência insulínica e função de célula beta avaliados pelo método de HOMA-IR e HOMA- β respectivamente, os obesos apresentaram valores também significativamente maiores que os eutróficos.

Não houve diferenças entre os grupos nos níveis de adiponectina ($p=0,064$) e de ucOC ($p=0,120$) (Figura 2). Como a composição corporal e consequentemente a ucOC podem variar de acordo com o sexo, realizamos a análise de acordo com o sexo, e também não encontramos diferenças nos níveis de ucOC entre os grupos.

Ao avaliarmos os parâmetros metabólicos, os níveis de ucOC não foram correlacionados com marcadores de adiposidade como peso, IMC, massa gorda e tecido adiposo visceral. Para avaliação dos marcadores de homeostase de glicose, o grupo com DM1 foi excluído devido a valores muito discrepantes de glicemia e HbA1c. Também não encontramos correlação da ucOC com parâmetros de metabolismo de glicose como HbA1c, glicemia, insulina, HOMA-IR e HOMA- β (Tabela 6).

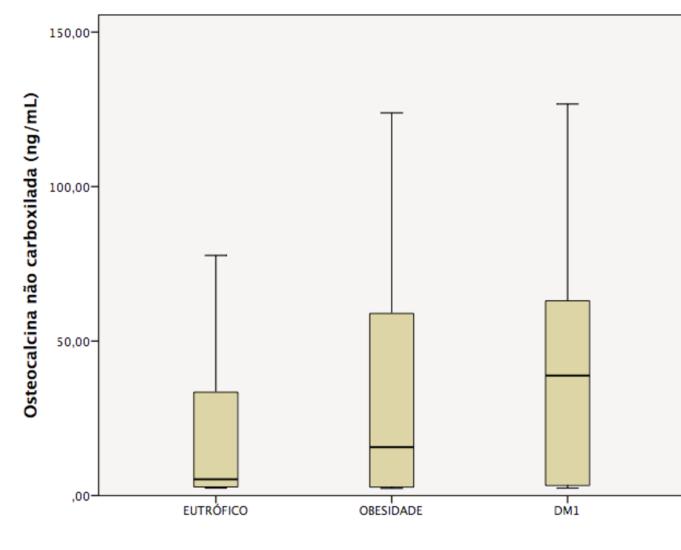


Figura 2. Distribuição da osteocalcina não carboxilada entre os grupos.

Tabela 6. Correlação de *Spearman* entre ucOC e parâmetros metabólicos

	ρ	P
Adiponectina	-0.18	.067
Peso	0.03	.735
IMC	0.15	.873
Gordura Corporal (%BIA)	0.02	.822
Gordura Corporal (%DXA)	-0.02	.842
Gordura visceral (cm³)	0.08	.454
HbA1c⁺	-0.003	.980
Insulina de jejum⁺	0.05	.666
HOMA-IR⁺	0.08	.489
HOMA-B⁺	-0.02	.835
Glicemia de jejum⁺	-0.11	.649

⁺ Análise excluindo o grupo DM1. ucOC: osteocalcina não carboxilada, IMC: índice de massa corporal, BIA: bioimpedância, DXA: densitometria por emissão de raios x de dupla energia, HOMA-IR: homeostasis model assessment para resistência insulínica, HOMA-B: homeostasis model assessment para função de célula β, HbA1c: hemoglobina glicada.

Como esperado, os parâmetros do clamp hiperglicêmico foram diferentes para o grupo com obesidade e eutrófico, com os pacientes com obesidade apresentando maiores primeira e segunda fases de secreção insulínica e menor índice de sensibilidade a insulina. Não houve diferença nos valores do *disposition index* (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros do clamp hiperglicêmico de acordo com o grupo

	Obesidade (n=27)	Eutrófico (n=22)	P
1ª fase de secreção insulina	122,55 ± 79,04	78,65 ± 52,93	0.018
2ª fase de secreção de insulina	171,24 ± 131,03	82,69 ± 45,96	0.004
ISI	0,05 ± 0,05	0,13 ± 0,1	0.000
DI	5,24 ± 3,56	7,13 ± 3,71	0.7

ISI: índice de sensibilidade a insulina, DI: índice de disposição

Os níveis de osteocalcina não carboxilada não se correlacionaram com o índice de sensibilidade à insulina ($p=0,394$) que avalia resistência insulínica pelo clamp hiperglicêmico e nem com parâmetros de avaliação de função de célula beta derivados do clamp, como primeira fase de secreção insulínica ($p=0,690$), segunda fase de secreção insulínica ($p=0,862$) ou o *disposition index* ($p=0,508$) (Tabela 8).

Tabela 8. Correlação de *Spearman* entre ucOC e parâmetros do clamp de sensibilidade a insulina e função de célula β

	ρ	P
Índice de sensibilidade a insulina (ISI)	0.13	.394
1^a fase de secreção insulina	-0.06	.690
2^a fase de secreção insulina	0.03	.862
<i>Disposition index</i> (DI)	0.1	.508

5. DISCUSSÃO

Confirmando os achados descritos em outros estudos, não encontramos nenhuma diferença nos níveis de ucOC em adolescentes pós púberes com obesidade, DM1 e controles eutróficos (14,15,30,31). Os níveis de ucOC também não foram correlacionados com marcadores de adiposidade e metabolismo de glicose. Achados estes, em concordância com os resultados publicados por *Tubic et al* (30) e *Giudici et al* (31) que também não encontraram diferenças nos níveis de ucOC entre crianças não obesas e crianças com sobrepeso ou obesidade, respectivamente. Os estudos citados também não encontraram nenhuma correlação da ucOC e parâmetros metabólicos, como glicemia de jejum, insulina, IMC e peso (30,31). No caso dos pacientes com DM1, os estudos não mostraram diferenças nos níveis de ucOC quando comparados a controles saudáveis (14,15). Enquanto *Yeap et al* demonstrou que a ucOC não estava associada com nenhum marcador de homeostase de glicose (16), *Neumann et al* encontrou a ucOC inversamente correlacionada com valores de HbA1c (15) e *Thraikill et al* uma correlação positiva com marcadores de exposição a insulina (14). Menores níveis de ucOC foram descritos na população pediátrica com pré-diabetes (32) e DM2 (34). Possivelmente, o papel da ucOC no metabolismo de glicose possa ser relevante apenas nos pacientes já com a regulação anormal da glicose. Assim, a falta de hiperglicemia nos nossos pacientes com obesidade pode ser uma das razões pelas quais nós não encontramos uma relação da ucOC com o metabolismo energético.

Em crianças com sobrepeso e pré-diabetes, *Pollock et al* encontrou menores níveis de ucOC e uma correlação positiva com os índices insulínogênico e de disposição derivados de um teste de tolerância oral à glicose, sugerindo que menores níveis da ucOC poderiam contribuir com a disfunção da célula beta (32). Maiores valores da razão ucOC:cOC foram correlacionados com maiores valores do HOMA- β em crianças saudáveis magras, demonstrando o papel da ucOC em regular a secreção de insulina (29). Em adultos com glicemia de jejum alterada, os níveis de ucOC refletiram a capacidade de reserva da função da célula beta e a habilidade da secreção de insulina (19). Entretanto, todos estes estudos utilizaram métodos indiretos de avaliação da homeostase glicêmica. O presente estudo teve como foco a relação da ucOC com a função da célula beta avaliada através de um *clamp* hiperglicêmico. Não encontramos correlação da ucOC com a função da célula beta, quando avaliamos através de um método indireto como o HOMA- β , nem através de medidas diretas de secreção insulínica derivadas de um *clamp* hiperglicêmico, como primeira e segunda fase de secreção insulínica e o *disposition index*.

Em relação à resistência insulínica, um estudo com uma grande coorte de 1597 homens japoneses mostrou que a ucOC estava inversamente associada com o HOMA-IR (21). Em outro estudo longitudinal com adultos com sobrepeso e obesidade, após 2 anos de seguimento, um aumento nos níveis de ucOC foi associado com uma diminuição no HOMA-IR, mostrando uma melhora na sensibilidade à insulina (23). Em crianças, esta associação da ucOC com resistência insulínica não foi demonstrada (29–32). Quando um método direto foi utilizado para determinar a sensibilidade à insulina, como o

método padrão ouro do *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico, a relação entre ucOC e resistência insulínica não foi encontrada (35,36). *Mori et al* não encontrou correlação entre níveis de ucOC e a média da taxa de infusão de glicose (M) e índice de resistência insulínica (valor de M/I) em uma população de 129 adultos com DM2 (35). Em um outro estudo com adultos jovens de 17 a 22 anos, *Polgreen et al* não encontrou associação significativa entre ucOC e a média da taxa de infusão de glicose (M) ajustada para a massa magra (36). Confirmando os achados desses estudos com *clamp* e outros estudos em crianças, nosso estudo também não encontrou nenhuma relação entre ucOC e marcadores de sensibilidade à insulina, tanto medidos por métodos indiretos como o HOMA-IR como por métodos diretos como um índice derivado do *clamp* hiperglicêmico, o índice de sensibilidade a insulina (ISI).

Não se sabe ainda se o papel da ucOC na regulação do metabolismo de glicose é mediado pela adiponectina nos humanos. Estudos em ratos modificados geneticamente demonstraram que a ucOC teria um efeito direto no tecido adiposo induzindo a produção de adiponectina (1,6) e o tratamento com a ucOC recombinante aumentou a expressão gênica da adiponectina no rato selvagem (7). Em crianças saudáveis com excesso de peso, ucOC foi positivamente correlacionada com a adiponectina de alto peso molecular (29). Nosso estudo, em concordância com outros (14–16,30), não pôde apoiar este achado, visto que não encontramos nenhuma correlação entre ucOC e adiponectina. Entretanto, é importante notar que em todos estes estudos incluindo o nosso, foi medida adiponectina total e não a de alto peso molecular.

Existem algumas potenciais limitações em nosso estudo. Primeiro, foi um estudo transversal, o qual não fornece informação de causalidade. Um

estudo longitudinal com homens idosos reportou um aumento nos níveis de ucOC após 2 anos de seguimento, o qual foi associado com uma melhora no metabolismo de glicose (23). Uma segunda potencial limitação foi a amostra pequena, particularmente daqueles que realizaram o *clamp* hiperglicêmico, o que pode ter limitado o poder de detectar uma correlação significativa da ucOC com os parâmetros de sensibilidade à insulina e função de célula beta. *Iki et al* avaliou um grande número de adultos (n=1597) e encontrou níveis de ucOC inversamente correlacionados com índices de metabolismo de glicose como hemoglobina glicada, glicemia e insulina de jejum e resistência insulínica avaliado pelo HOMA-IR (21). Finalmente, nós dosamos apenas a ucOC, não sendo medida osteocalcina total ou cOC. Apesar dos modelos animais demonstrarem que a forma não carboxilada foi a forma de osteocalcina metabolicamente ativa envolvida no metabolismo de glicose, novos dados mostrando o envolvimento de outras formas da osteocalcina no metabolismo energético tem surgido. *Tubic et al* encontrou que a forma carboxilada da osteocalcina e não a ucOC, era menor nas crianças com sobrepeso comparado com as de peso normal (30). *Pollock et al* demonstrou que a cOC era associada com a sensibilidade à insulina em crianças com glicemia normal e pré-diabetes (32). *Pratz-Puig et al* reportou que cOC era relacionada com adiponectina de alto peso molecular e IMC em crianças saudáveis (29). *Garanty-Bogacka et al* mediram osteocalcina total e esta foi associada com parâmetros de obesidade abdominal e resistência insulínica em crianças e adolescentes com obesidade (85). *Polgreen et al* demonstrou uma relação inversa significante entre osteocalcina total e resistência insulínica, usando um

método direto e padrão ouro para avaliar sensibilidade a insulina, como o *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico (36).

Algumas importantes considerações em relação a dosagem da ucOC devem ser levadas em conta ao avaliarmos e compararmos os diversos estudos. Primeiro, diferentes estudos utilizam diferentes métodos para dosagem de ucOC em humanos, sendo que a acurácia desses diferentes métodos ainda não são bem definidas e a falta de um método padrão para dosagem dificulta a comparação entre os estudos. Segundo, a vitamina K é um importante determinante dos níveis de ucOC, pois funciona como co-fator da enzima γ -glutamil carboxilase responsável pela sua formação. Assim, alteração de níveis de vitamina K poderiam interferir nos valores da ucOC. Ainda, os níveis de ucOC podem variar de acordo com o sexo, etnia, ritmo circadiano, coleta em jejum ou pós prandial, função renal e nível de atividade física (86). Em nosso estudo, os níveis de ucOC não variaram de acordo com o sexo e todos apresentavam função renal normal e foram avaliados em jejum no período da manhã, possibilitando minimizar algumas interferências. Porém, o grupo era composto por várias etnias e não foram avaliados os níveis de atividade física e vitamina K. Uma possível explicação para as diferenças de achados entre os estudos em ratos e humanos está na diferença estrutural da osteocalcina entre os dois. O tamanho e alguns aminoácidos da sequência da osteocalcina são diferentes entre ratos e humanos, além de ser codificada por apenas um gene nos humanos enquanto nos ratos existem três genes responsáveis (87).

A maior força de nosso estudo é que foi o primeiro estudo a avaliar a função da célula beta usando a técnica do *clamp* hiperglicêmico em uma

população pediátrica para avaliar o papel da ucOC no metabolismo de glicose. Nós também usamos uma população de adolescentes pós-púberes restrita, permitindo minimizar uma potencial confusão dos efeitos da puberdade no metabolismo de glicose.

Portanto, apesar da maioria dos estudos em adultos mostrarem um papel da ucOC no metabolismo energético, na população pediátrica este achado não pode ser confirmado, mantendo-se controverso. Possíveis explicações para a falta de correlação entre a ucOC e a função da célula beta nos adolescentes seria a falta de hiperglicemia na população de obesos estudada e que o papel da ucOC em regular o metabolismo de glicose poderia ser apenas importante em um estágio mais tardio da vida. Mais estudos com o *clamp* hiperglicêmico em adolescentes com DM2 poderiam fornecer mais informações sobre o papel da ucOC na disfunção precoce do metabolismo de glicose.

6. CONCLUSÃO

- Não encontramos diferenças nos níveis de ucOC em adolescentes com DM1, obesidade e controles eutróficos.
- Não encontramos correlação dos níveis de ucOC com nenhum parâmetro metabólico de adiposidade.
- Não encontramos correlação dos níveis de ucOC com nenhum parâmetro de metabolismo de glicose.
- Não encontramos correlação dos níveis de ucOC com parâmetros de sensibilidade à insulina e função de célula beta, mesmo quando avaliado por um *clamp* hiperglicêmico.

7. REFERÊNCIAS

1. Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(5):161–6.
2. Ng KW, Martin TJ. New functions for old hormones: Bone as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;310(1–2):1–2.
3. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys.* Elsevier Inc.; 2014;561:137–46.
4. Oldknow KJ, MacRae VE, Farquharson C. Endocrine role of bone: Recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *J Endocrinol.* 2015;225(1):R1–19.
5. Sullivan TR, Duque G, Keech AC, Herrmann M. An Old Friend in a New Light: The Role of Osteocalcin in Energy Metabolism. *Cardiovasc Ther.* 2013;31(2):65–75.
6. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. 2007;130(3):456–69.
7. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(13):5266–70.
8. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone.* 2012;50(2):568–75.
9. Zhou B, Li H, Xu L, Zang W, Wu S, Sun H. Osteocalcin reverses endoplasmic reticulum stress and improves impaired insulin sensitivity secondary to diet-induced obesity through nuclear factor-kb signaling pathway. *Endocrinology.* 2013;154(3):1055–68.
10. Zhou B, Li H, Liu J, Xu L, Guo Q, Zang W, et al. Autophagic dysfunction is improved by intermittent administration of osteocalcin in obese mice. *Int J Obes.* 2016;(November 2015):1–11.
11. Mizokami A, Yasutake Y, Higashi S, Kawakubo-Yasukochi T, Chishaki S, Takahashi I, et al. Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone.* Elsevier Inc.; 2014;69:68–79.
12. Mizokami A, Wang DG, Tanaka M, Gao J, Takeuchi H, Matsui T, et al. An extract from pork bones containing osteocalcin improves glucose metabolism in mice by oral administration. *Biosci Biotechnol Biochem.* Taylor & Francis; 2016;80(11):2176–83.
13. Sabek OM, Ken Nishimoto S, Fraga D, Tejpal N, Ricordi C, Gaber a. O. Osteocalcin effect on Human Beta Cells Mass and Function.

Endocrinology. 2015;156(July):EN.2015-1143.

14. Thrailkill KM, Jo CH, Cockrell GE, Moreau CS, Lumpkin CK, Fowlkes JL. Determinants of undercarboxylated and carboxylated osteocalcin concentrations in type 1 diabetes. *Osteoporos Int*. 2012;23(6):1799–806.
15. Neumann T, Lodes S, Kästner B, Franke S, Kiehntopf M, Lehmann T, et al. Osteocalcin, adipokines and their associations with glucose metabolism in type 1 diabetes. *Bone*. Elsevier Inc.; 2016;82:50–5.
16. Yeap BB, Davis WA, Peters K, Hamilton EJ, Rakic V, Paul Chubb SA, et al. Circulating osteocalcin is unrelated to glucose homeostasis in adults with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. Elsevier Inc.; 2017;31(6):948–51.
17. Redondo MJ, Shirkey BA, Fraga DW, Gaber AO, Sabek OM. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hemoglobin A1c in children with recently diagnosed pediatric diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2017;
18. Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced β -cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25(8):768–72.
19. Gower BA, Pollock NK, Casazza K, Clemens TL, Goree LL, Granger WM. Associations of Total and Undercarboxylated Osteocalcin with Peripheral and Hepatic Insulin Sensitivity and β -Cell Function in Overweight Adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):1–16.
20. Takashi Y, Koga M, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Nishikawa T. Undercarboxylated osteocalcin can predict insulin secretion ability in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2017;8(4):471–4.
21. Iki M, Tamaki J, Fujita Y, Kouda K, Yura A, Kadowaki E, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. *Osteoporos Int*. 2012;23(2):761–70.
22. Díaz-López A, Bulló M, Juanola-Falgarona M, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, et al. Reduced serum concentrations of carboxylated and undercarboxylated osteocalcin are associated with risk of developing type 2 diabetes mellitus in a high cardiovascular risk population: A nested case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):4524–31.
23. Bullo´ M, Moreno-Navarrete JM, Ferna´ndez-Real JM, Salas-Salvado´ J. Total and undercarboxylated osteocalcin predict changes in insulin sensitivity and beta cell function in elderly men at high cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:249–55.
24. Razny U, Fedak D, Kiec-Wilk B, Goralska J, Gruca A, Zdzienicka A, et al. Carboxylated and undercarboxylated osteocalcin in metabolic complications of human obesity and prediabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33(3):1–11.

25. Yano S, Nabika T, Nagai A, Hamano T, Yamasaki M, Isomura M, et al. Interrelationship between glucose metabolism and undercarboxylated osteocalcin: A cross-sectional study in a community-dwelling population. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2015;24(3):489–95.
26. Guo Q, Li H, Xu L, Wu S, Sun H, Zhou B. Undercarboxylated osteocalcin reverts insulin resistance induced by endoplasmic reticulum stress in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep.* Springer US; 2017;7(1):46.
27. Sanchez-Enriquez S, Ballesteros-Gonzalez IT, Villafán-Bernal JR, Pascoe-Gonzalez S, Rivera-Leon EA, Bastidas-Ramirez BE, et al. Serum levels of undercarboxylated osteocalcin are related to cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus and healthy subjects. *World J Diabetes.* 2017;8(1):11.
28. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):187–94.
29. Prats-Puig A, Mas-Parareda M, Riera-Pérez E, González-Forcadell D, Mier C, Mallol-Guisset M, et al. Carboxylation of osteocalcin affects its association with metabolic parameters in healthy children. *Diabetes Care.* 2010;33(3):661–3.
30. Tubic B, Magnusson P, Mårild S, Leu M, Schwetz V, Sioen I, et al. Different osteocalcin forms, markers of metabolic syndrome and anthropometric measures in children within the IDEFICS cohort. *Bone.* Elsevier Inc.; 2016;84:230–6.
31. Giudici KV, Kindler JM, Martin BR, Laing EM, McCabe GP, McCabe LD, et al. Associations among osteocalcin, leptin and metabolic health in children ages 9–13 years in the United States. *Nutr Metab (Lond). Nutrition & Metabolism;* 2017;14(1):25.
32. Pollock NK, Bernard PJ, Gower BA, Gundberg CM, Wenger K, Misra S, et al. Lower uncarboxylated osteocalcin concentrations in children with prediabetes is associated with β -cell function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7).
33. Poomthavorn P, Nantarakchaikul P, Mahachoklertwattana P, Chailurkit L, Khlairit P. Effects of correction of vitamin D insufficiency on serum osteocalcin and glucose metabolism in obese children. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80(4):516–23.
34. Takaya J, Tanabe Y, Kuroyanagi Y, Kaneko K. Decreased undercarboxylated osteocalcin in children with type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;29(8):879–84.
35. Mori K, Emoto M, Motoyama K, Lee E, Yamada S, Morioka T, et al. Undercarboxylated osteocalcin does not correlate with insulin resistance as assessed by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4(1):53.

36. Polgreen, Lynda; Jacobs, David; Nathan, Brandon; Steinberger, Julia; Moran, Antoinette; Sinaiko A, Moran A, Sinaiko AR. Association of OC with Obesity, I.R. and CV risk factors in young adults. 2013;20(11):2194–201.
37. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet*. 2014;384(9945):766–81.
38. Abarca-Gómez L, Abdeen Z, Hamid Z, Abu-Rmeileh N, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: A pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*. 2017; 390(10113):2627-2642.
39. Bloch KV, Klein CH, Szklo M, Kuschner MCC, De Azevedo Abreu G, Barufaldi LA, et al. ERICA: Prevalences of hypertension and obesity in Brazilian adolescents. *Rev Saude Publica*. 2016;50(supl 1):1s–12s.
40. Ministério da Saúde, IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016. 132 p.
41. Eriksson JG, Kajantie E, Lampl M, Osmond C. Trajectories of body mass index amongst children who develop type 2 diabetes as adults. *J Intern Med*. 2015;278(2):219–26.
42. Juonala M, Magnussen CG, Berenson GS, Venn A, Burns TL, Sabin MA, et al. Childhood Adiposity, Adult Adiposity, and Cardiovascular Risk Factors. *Obstet Gynecol Surv*. 2012;67(3):156–8.
43. Kelly AS, Barlow SE, Rao G, Inge TH, Hayman LL, Steinberger J, et al. Severe obesity in children and adolescents: Identification, associated health risks, and treatment approaches: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;128(15):1689–712.
44. Alonso-Álvarez ML, Cordero-Guevara JA. b c JA, Terán-Santos J b c, Gonzalez-Martinez MM. d, Jurado-Luque MJ. b e MJ, Corral-Peñafiel JJ. b f, et al. Obstructive sleep apnea in obese community-dwelling children: The NANOS study. *Sleep*. 2014;37(5):943–9.
45. Welsh JA, Karpen S, Vos MB. Increasing Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Among United States Adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. *J Pediatr*. 2013;162(3):496–500.e1.
46. Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent Overweight and Future Adult Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*. 2007;357(23):2371–9.
47. Tirosh A, Shai I, Afek A, Dubnov-Raz G, Ayalon N, Gordon B, et al. Adolescent BMI Trajectory and Risk of Diabetes Versus Coronary Disease. *Surv Anesthesiol*. 2011;55(6):296–7.
48. Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med*. 2010;362(6):485–93.

49. Styne DM, Arslanian SA, Connor EL, Farooqi IS, Murad MH, Silverstein JH, et al. Pediatric obesity-assessment, treatment, and prevention: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(3):709–57.
50. Levy-Marchal C, Arslanian S, Cutfield W, Sinaiko A, Druet C, Marcovecchio ML, et al. Insulin resistance in children: consensus, perspective, and future directions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(12):5189–98.
51. Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. Are obesity-related metabolic risk factors modulated by the degree of insulin resistance in adolescents? *Diabetes Care.* 2006;29(7):1599–604.
52. Arslanian S, Suprasongsin C. Insulin Sensitivity, Lipids, and Body Composition in Childhood: Is “Syndrome X” Present? *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):1058–62.
53. Bacha F, Saad R, Gungor N, Janosky J, Arslanian SA. Obesity, regional fat distribution, and syndrome X in obese black versus white adolescents: Race differential in diabetogenic and atherogenic risk factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2534–40.
54. Gungor N, Bacha F, Saad R, Janosky J, Arslanian S. Youth type 2 diabetes: insulin resistance, beta-cell failure, or both? *Diabetes Care.* 2005;28(3):638–44.
55. Cali’ AMG, Bonadonna RC, Trombetta M, Weiss R, Caprio S. Metabolic abnormalities underlying the different prediabetic phenotypes in obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1767–73.
56. Weiss R, Dufour S, Taksali SE, Tamborlane W V., Petersen KF, Bonadonna RC, et al. Prediabetes in obese youth: A syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet.* 2003;362(9388):951–7.
57. Cali AMG, Dalla C, Cobelli C, Dziura J, Seyal A, Shaw M, et al. Primary defects in β -cell function further exacerbated by worsening of insulin resistance mark the development of impaired glucose tolerance in obese adolescents. *Diabetes Care.* 2009;32(3):456–61.
58. Fazeli Farsani S, Van Der Aa MP, Van Der Vorst MMJ, Knibbe CAJ, De Boer A. Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: A systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia.* 2013;58:1471–88.
59. Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, et al. Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Children and Adolescents From 2001 to 2009. *JAMA.* 2014;311(17):1778.
60. Brown RJ, Yanovski JA. Estimation of insulin sensitivity in children: Methods, measures and controversies. *Pediatr Diabetes.* 2014;15(3):151–61.

61. Arslanian SA. Clamp techniques in paediatrics: What have we learned? *Horm Res.* 2005;64(SUPPL. 3):16–24.
62. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):208–15.
63. Schwartz B, Jacobs DR, Moran A, Steinberger J, Hong CP, Sinaiko AR. Measurement of insulin sensitivity in children comparison between the euglycemic-hyperinsulinemic clamp and surrogate measures. *Diabetes Care.* 2008;31(4):783–8.
64. W. K. Ward, LaCava EC, Paquette TL, Beard JC, Wallum BJ, and D. Porte J. Disproportionate elevation of immunoreactive proinsulin in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and in experimental insulin resistance. *Diabetologia.* 1987;30:698–702.
65. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
66. Uwaifo GI, Fallon EM, Chin J, Elberg J, Parikh SJ, Yanovski JA. Indices of insulin action, disposal, and secretion derived from fasting samples and clamps in normal glucose-tolerant black and white children. *Diabetes Care.* 2002;25(11):2081–7.
67. Gungor N, Saad R, Janosky J, Arslanian S. Validation of surrogate estimates of insulin sensitivity and insulin secretion in children and adolescents. *J Pediatr.* 2004;144(1):47–55.
68. Yeckel CW, Weiss R, Dziura J, Taksali SE, Dufour S, Burgert TS, et al. Validation of insulin sensitivity indices from oral glucose tolerance test parameters in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1096–101.
69. Bergman RN. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes.* 1989;38:1512–27.
70. Steil GM, Volund A, Kahn SE, Bergman RN. Reduced sample number for calculation of insulin sensitivity and glucose effectiveness from the minimal model: Suitability for use in population studies. *Diabetes.* 1993;42(2):250–6.
71. Foley JE, Chen YD, Lardinois CK, Hollenbeck CB, Liu GC, Reaven GM, et al. Estimates of in vivo insulin action in humans: comparison of the insulin clamp and the minimal model techniques. *Horm Metab Res.* 1985;17(6):406–9.
72. Saad MF, Anderson RL, Laws A, Watanabe RM, Kades WW, Chen YDI, et al. A comparison between the minimal model and the glucose clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance. *Diabetes.* 1994;43(9):1114–21.
73. Davis SN, Monti L, Piatti PM, Moller N, Ng L, Coppack S, et al. Estimates of insulin action in normal, obese and NIDDM man: comparison of insulin

and glucose infusion test, CIGMA, minimal model and glucose clamp techniques. *Diabetes Res.* 1993;23(1):1–18.

74. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2402–10.
75. Shen SW, Reaven GM, Farquhar JW. Comparison of impedance to insulin-mediated glucose uptake in normal subjects and in subjects with latent diabetes. *J Clin Invest.* 1970;49(12):2151–60.
76. Harano Y, Hidaka H, Takatsuki K, Ohgaku S, Haneda M, Motoi S, et al. Glucose, insulin, and somatostatin infusion for the determination of insulin sensitivity in vivo. *Metabolism.* 1978;27(9 SUPPL. 1):1449–52.
77. DeFronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Felig P, Wahren J. Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. *Diabetes.* 1983;32(1):35–45.
78. DeFronzo RA, Binder C, Wahren J, Felig P, Ferrannini E, Faber OK. Sensitivity of insulin secretion to feedback inhibition by hyperinsulinaemia. *Acta Endocrinol(Copenh).* 1981;98:81–6.
79. DeFronzo R a, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979;237(3):E214–23.
80. Trout KK, Homko C, Tkacs NC. Methods of measuring insulin sensitivity. *Biol Res Nurs.* 2007;8(4):305–18.
81. Sjaarda L, Lee S, Tfayli H, Bacha F, Bertolet M, Arslanian S. Measuring β -cell function relative to insulin sensitivity in youth: Does the hyperglycemic clamp suffice? *Diabetes Care.* 2013;36(6):1607–12.
82. Gordon C, Chumlea W, Roche A. Stature, recumbent length and weight. In: *Anthropometric Standardization Reference Manual.* 1988. p. 3–8.
83. World Health Organization. Growth reference data for 5-19 years. *Who Child Growth Stand.* 2013;2006(April).
84. Lukaski HC, Bolonchuk WW, Hall CB, Siders WA. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *J Appl Physiol.* 1986;60(4):1327–32.
85. Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Rać M, Krupa B, Czaja-Bulsa G, Walczak M, et al. Association between serum osteocalcin, adiposity and metabolic risk in obese children and adolescents. *Endokrynol Pol.* 2013;64(5):346–52.
86. Levinger I, Brennan-Speranza TC, Zulli A, Parker L, Lin X, Lewis JR, et al. Multifaceted interaction of bone, muscle, lifestyle interventions and metabolic and cardiovascular disease: role of osteocalcin. Vol. 28, *Osteoporosis International.* 2017. p. 2265–73.

87. Kanazawa I. Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism. World J Diabetes . 2015;6(18):1345.

8. APÊNDICES

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Investigação do papel da osteocalcina não carboxilada na função de células beta pancreáticas em adolescentes saudáveis, portadores de diabetes mellitus tipo 1 e de obesidade

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li – Depto. de Pediatria - CIPED – FCM – UNICAMP

ENDEREÇO:

Centro de investigação em Pediatria - CIPED

Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

Fone: (19) 3521-8966

Fax: (19) 3521-8972

e-mail: ldesouza@fcm.unicamp.br

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome:

Registro do Hospital:

Nome do pai:

Nome da mãe:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL:

Nome:

Grau de parentesco:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

OBJETIVOS DA PESQUISA

Eu, _____, R.G.: _____, entendo que o paciente _____ (_____), o qual se encontra sob minha responsabilidade, foi convidado a participar de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM –

UNICAMP. O objetivo da pesquisa é avaliar a concentração sérica de fatores reguladores do metabolismo de células beta pancreáticas em adolescentes portadores de diabetes mellitus tipo 1 e obesidade e compará-la à concentração dos mesmos em indivíduos saudáveis, a fim de estabelecer uma possível associação, mediada pelas concentrações de tais fatores, entre obesidade e diabetes e as alterações metabólicas que ambas acarretam.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Eu entendo que a importância dessa pesquisa consiste no fato de existirem, até o momento, poucos estudos relacionados a esse assunto, o que limita o conhecimento acerca da secreção, ação e influência de fatores reguladores do metabolismo de células beta pancreáticas tanto em adolescentes saudáveis quanto em portadores de diabetes e obesidade. Todavia, existem evidências de que alguns desses fatores possam ser utilizados no tratamento e prevenção de diabetes, especialmente a do tipo 2 e, também, da obesidade. Assim, ao trazer esclarecimentos sobre o assunto, esse estudo poderá trazer maiores conclusões quanto ao efeito dessas substâncias sobre o diabetes, agora do tipo 1, e da obesidade em adolescentes.

PROCEDIMENTOS

Eu entendo que este estudo inclui pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 e obesidade, além de um grupo controle contendo indivíduos saudáveis, podendo o paciente pelo qual sou responsável integrar qualquer e apenas um desses três grupos. Dessa forma, ao permitir que participe dessa pesquisa, o paciente sob minha responsabilidade participará de uma avaliação clínica, incluindo idade, peso, altura e IMC, além de coleta sanguínea após jejum noturno de 8 horas, não sendo necessária a hospitalização. Posteriormente, haverá uma avaliação bioquímica, por meio de exames laboratoriais que poderão ser realizados por tempo indeterminado após a coleta, sendo o material biológico destruído após a pesquisa.

Além disso, entendo que será realizado o teste de *clamp* hiperglicêmico com uma parcela dos participantes desse estudo: nesse teste, o paciente ficará em repouso em um leito durante uma manhã, com soro instalado em uma veia do braço por um período para infundir glicose (“açúcar”) no sangue. Durante o teste uma veia será usada para colher sangue algumas vezes, sem necessidade de perfurar outras veias, sendo este o melhor teste para medir a secreção de insulina (um dos principais problemas do diabetes).

RISCOS E DESCONFORTOS

Para a realização dos exames, serão feitas coletas de sangue venoso. Os riscos vinculados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta, além de sangramento no local, no caso do *clamp* hiperglicêmico. O mesmo pode se dizer sobre possíveis desconfortos, já que, em geral, essas coletas serão realizadas de veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la.

BENEFÍCIOS ESPERADOS

Eu entendo que, com a realização dessa pesquisa, que contará com a participação do paciente pelo qual sou responsável, poderão surgir novas perspectivas de tratamento para o diabetes tipo 1 e obesidade, que acometem parte significativa e crescente da população de crianças e adolescentes.

Entendo, também, que não haverá nenhum tipo de remuneração pela participação do paciente sob minha responsabilidade nesse estudo. Apenas serão integralmente ressarcidas eventuais despesas decorrentes exclusivamente de sua participação na pesquisa.

SIGILO

Eu entendo que todo o material e dados obtidos nessa pesquisa farão parte do prontuário médico do paciente e tornar-se-ão anônimos, de acordo com os regulamentos do Hospital referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Assim, entendo que é garantido o sigilo de dados confidenciais ou que possam causar constrangimento ou prejuízos.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais e esclarecimentos relativos ao estudo a qualquer momento – antes, durante e após a realização da pesquisa. A médica responsável, Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li, fone (019)3521-8966 ou (019)3521-8986, estará disponível para responder às minhas dúvidas e preocupações. No caso de dúvidas sobre questões éticas do estudo, poderei ligar para a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP: 13083-887, Campinas, SP, Tel.: (19) 3521-8936 ou (19) 3521- 7187. e-mail: cep@fcm.unicamp.br

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

Eu entendo que a participação do paciente pelo qual sou responsável nessa pesquisa é totalmente voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento, incluindo a retirada da amostra de sangue, sem que isso comprometa os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente ou receberá no futuro ou que acarrete penalidade, prejuízo e/ou represálias de qualquer natureza. Eu reconheço, também, que a Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li pode interromper a participação do paciente nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Nome do participante ou responsável: _____

Assinatura do participante ou responsável: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Local e data: _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Foi explicado ao responsável por _____ o objetivo e a justificativa do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos, desconfortos e vantagens que poderão advir do estudo. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao responsável pelo participante.

Nome do pesquisador:

Assinatura do pesquisador:

Local e data:

9. ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

PROJETO DE PESQUISA

Título: INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA OSTEOPOROSE NA FUNÇÃO DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS EM ADOLESCENTES SAUDÁVEIS, PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 E DE OBESIDADE

Pesquisador: Lilia Freire Rodrigues de Souza Li

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

CAAE: 01543712.7.0000.5404

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 14906

Data da Relatoria: 27/03/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de investigação da osteocalcina (BGP, uma proteína não colagênica mais abundante na matriz óssea, sintetizada por osteócitos e osteoblastos maduros. Estudos feitos com camundongos mostraram que essa proteína também atua como hormônio, influenciando positivamente a produção de insulina pelas células beta do pâncreas. Nos seres humanos essa proteína pode estar relacionada ao desenvolvimento do diabetes mellitus, especialmente a DM2 e com o metabolismo

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a concentração sérica de fatores reguladores do metabolismo de células beta pancreáticas em adolescentes portadores de diabetes mellitus tipo 1 e obesidade e compará-la à concentração dos mesmos em indivíduos saudáveis, a fim de estabelecer uma possível associação, mediada pelas concentrações de tais fatores, entre obesidade e diabetes e as alterações metabólicas que ambas acarretam.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios diretos aos sujeitos de pesquisa, podendo o estudo trazer benefícios sociais. Os maiores riscos se referem à coleta de amostras de sangue, incluindo e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta, além de sangramento no local, no caso do clamp hiperglicêmico. Para minimizar tais riscos, as coletas serão realizadas por profissionais treinados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Análise experimental com dosagem sérica de osteocalcina, glicemia, adiponectina, insulina basal. Em uma parte dos indivíduos será realizado clamp hiperglicêmico para avaliação da função de células beta. Os pacientes portadores de Diabetes mellitus tipo 1 não serão submetidos a clamp hiperglicêmico, uma vez que estes pacientes não apresentam secreção de insulina. Apenas uma parcela dos pacientes obesos (20) e de controles saudáveis (20) serão submetidos ao clamp. Participarão do estudo adolescentes púberes em acompanhamento nos ambulatórios de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Estas serão divididas em três grupos: 20 pacientes contendo diabetes mellitus tipo 1; 40 pacientes portadores de obesidade; e um grupo controle de 40 indivíduos saudáveis. Serão incluídos no estudo apenas aqueles indivíduos cujos responsáveis assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido, por meio do qual tomam conhecimento e concordam em participar da pesquisa. Excluídos do estudo pacientes com outras co-morbidades, em uso de outras medicações, pacientes com doença osteometabólica. Será feita uma avaliação clínica do paciente incluindo estadiamento puberal, peso, estatura e avaliação de IMC, enquadrado nos parâmetros por idade. Serão mensuradas as concentrações plasmáticas de osteocalcina não carboxilada, adiponectina, insulina e glicose em amostras de sangue coletadas após jejum noturno de 8 horas. As concentrações de osteocalcina e de adiponectina serão avaliadas por meio do método ELISA. A função da célula-β e a sensibilidade à insulina serão avaliadas pelos índices do modelo matemático HOMA (Homeostasis Model Assessment) e o modelo para avaliação da homeostase β e pela técnica de clamp hiperglicêmico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa, foi anexada folha de rosto da CONEP assinada pela pesquisadora responsável e complementada por autorização do superintendente do HC/Unicamp. Também foi anexado modelo de TCLE, adequado.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 24 de Abril de 2012

Assinado por:

Carlos Eduardo Steiner