



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas**

Valéria Bahdur Chueire

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO AGUDA DOS ÁCIDOS
GRAXOS NA SECREÇÃO DE INSULINA INDUZIDA PELAS
INCRETINAS EM VOLUNTÁRIOS COM E SEM DIABETES
TIPO 2**

Campinas

2018

Valéria Bahdur Chueire

**EFEITOS DA MANIPULAÇÃO AGUDA DOS ÁCIDOS GRAXOS NA
SECREÇÃO DE INSULINA INDUZIDA PELAS INCRETINAS EM
VOLUNTÁRIOS COM E SEM DIABETES TIPO 2**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de doutora em ciências na área de Clínica Médica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Olga Ana Muscelli Berardi

Este exemplar e o arquivo digital corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Valéria Bahdur Chueire e orientada pela professora doutora Elza Olga Ana Muscelli Berardi.

**Campinas
2018**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

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

C471e Chueire, Valéria Bahdur, 1963-
Efeitos da manipulação aguda dos ácidos graxos na secreção de insulina induzida pelas incretinas em voluntários com e sem diabetes tipo 2 / Valéria Bahdur Chueire. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Elza Olga Ana Muscelli Berardi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Incretinas. 2. Insulina - Secreção. 3. Ácidos graxos livres. I. Berardi, Elza Olga Muscelli, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of acute non-esterified fatty acids manipulations on incretin-induced insulin secretion in participants with or without type 2 diabetes

Palavras-chave em inglês:

Incretins

Insulin - Secretion

Fatty acids, Nonesterified

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Elza Olga Ana Muscelli Berardi [Orientador]

João Eduardo Nunes Salles

Maria Lúcia Cardillo Correa Gianella

Marcos Tambascia

Elizabeth João Pavin

Data de defesa: 07-12-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VALÉRIA BAHDUR CHUEIRE

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Elza Olga Ana Muscelli Berardi

MEMBROS:

- 1. Prof^a. Dr^a. Elza Olga Ana Muscelli Berardi**
 - 2. Prof. Dr. João Eduardo Nunes Salles**
 - 3. Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Cardillo Correa Gianella**
 - 4. Prof^a. Dr^a. Elizabeth João Pavin**
 - 5. Prof. Dr. Marcos Antonio Tambascia**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 07/12/2018

Dedicatória

Á Deus que me sustenta e fortalece, e me deu equilíbrio, disposição e inspiração para continuar enfrentando as batalhas de cada dia, e por causa Dele eu cheguei até aqui.

Á meu pai, que certamente gostaria de estar presente em mais essa etapa da minha formação acadêmica. Sei que, de algum modo, ele está conectado comigo nesse momento tão especial.

Agradecimentos

- ❖ À professora Elza, pela extrema paciência, pelo dom do ensino que soube tão bem me transmitir, com imensa generosidade. Também por ter acreditado que eu pudesse chegar ao fim de todo o trabalho, e por não medir esforços, sempre ao meu lado, solícita, a cada minha demanda.
- ❖ À toda minha família, especialmente ao Luca e à Rosanna, a quem peço desculpas pelas minhas ausências.
- ❖ Ao Davide, obrigada pela sua resiliência nesses três anos.
- ❖ Ao Aglécio Souza, essencial na execução do protocolo com os pacientes na Unidade Metabólica, sem o qual esse projeto não poderia ser colocado em prática.
- ❖ Ao Ricardo Pereira-Moreira, colega da pós-graduação e do grupo da profa. Elza, que também participou dos testes na Unidade Metabólica, e que esteve sempre me apoiando nessa caminhada.
- ❖ Ao Brenno D'Astiarraga, pela execução dos testes em Pisa.
- ❖ Ao professor Ele Ferrannini, pela orientação do trabalho em Pisa e pela participação na discussão da publicação do nosso artigo na revista Diabetologia.

RESUMO

Introdução: O Efeito Incretínico – o incremento da liberação da insulina estimulada pela glicose administrada por via oral vs. infusão EV – está diminuído nos estados disglucêmicos. Apesar de evidências de estudos com ilhotas humanas de que os ácidos graxos livres (FFA) interferem na função incretínica, há pouca informação sobre seus efeitos em humanos. Nós testamos o impacto da manipulação aguda bidirecional dos FFA (aumento ou redução) no Efeito Incretínico em humanos.

Métodos: Treze indivíduos com Diabetes tipo 2 (DM2) e 10 voluntários sem diabetes foram submetidos a um TOTG de 3h, e, uma semana mais tarde, a uma infusão EV de glicose reproduzindo o perfil da curva glicêmica, isoglicêmica (ISO; pareada ao TOTG). Ambos os estudos foram repetidos durante infusão de lipídeos exógena nos voluntários sem diabetes, e após administração de acipimox (para inibição de lipólise) naqueles com diabetes. Um modelo matemático da dinâmica da secreção de insulina foi utilizado para acessar a secreção total de insulina (TIS), a *beta cell glucose sensitivity* (β -GS), a potenciação induzida pela glicose e a potenciação induzida pelas incretinas. O índice de sensibilidade oral à glicose (OGIS) foi usado para estimar a sensibilidade à insulina.

Resultados: A infusão de lipídeos aumentou a concentração plasmática de FFA e triglicérides em 10 e 5 vezes respectivamente, e a TIS no TOTG e no ISO, induzindo à resistência à insulina. A potenciação pelas incretinas diminuiu. A potenciação pela glicose, a β -GS, o GLP-1, GIP e Glucagon não foram afetados. Acipimox, que diminuiu os níveis de FFA em ~55%, reduziu a glicose plasmática e TIS, e melhorou a sensibilidade à insulina, mas não mudou a β -GS, potenciação pela glicose, potenciação pelas incretinas, ou as respostas do Glucagon, GLP-1 ou GIP. O efeito incretínico, calculado como a diferença percentual, também diminuiu nos participantes não diabéticos e ficou inalterado naqueles com diabetes.

Conclusão: O aumento dos FFA seletivamente diminuiu o efeito incretínico e a sensibilidade à insulina em não diabéticos, enquanto que a redução aguda dos FFA diminuiu a glicemia e melhora a sensibilidade à insulina em DM2, mas não corrige a potenciação induzida pelas incretinas que é deficiente nesta condição.

ABSTRACT

Aims/hypothesis: *Incretin effect - the potentiation of glucose-stimulated insulin release induced by the oral vs. the i.v. route - is impaired in dysglycaemic states. Despite evidence from human islet studies that NEFA interfere with incretin function, little information is available about the effect in humans. We tested the impact of acute bidirectional NEFA manipulation on the incretin effect in humans.*

Methods: *Thirteen individuals with type 2 diabetes and ten non-diabetic volunteers had a 3 h OGTT, and, a week later, an i.v. isoglycaemic glucose infusion (ISO; OGTT matched). Both pairs of studies were repeated during an exogenous lipid infusion in the non-diabetic volunteers, and following acipimox administration (to inhibit lipolysis) in people with diabetes. Mathematical modelling of insulin secretion dynamics assessed total insulin secretion (TIS), beta cell glucose sensitivity (β -GS), glucose-induced potentiation (P_{GLU}) and incretin-induced potentiation (P_{INCR}); the oral glucose sensitivity index was used to estimate insulin sensitivity.*

Results: *Lipid infusion increased TIS (from 61 [interquartile range 26] to 78 [31] nmol/m² on OGTT and from 29 nmol/m² [26] to 57 nmol/m² [30] on ISO) and induced insulin resistance. P_{INCR} decreased from 1.6 [1.1] to 1.3 [0.1] ($p < 0.05$). β -GS, P_{GLU} and glucagon, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and gastric inhibitory polypeptide (GIP) responses were unaffected. Acipimox (lowering NEFA by ~55%) reduced plasma glucose and TIS and enhanced insulin sensitivity, but did not change β -GS, P_{INCR} , P_{GLU} or glucagon, GLP-1 or GIP responses. As the per cent difference, incretin effect was decreased in non-diabetic participants and unchanged in those with diabetes.*

Conclusions/interpretation: *Raising NEFA selectively impairs incretin effect and insulin sensitivity in non-diabetic individuals, while acute NEFA reduction lowers plasma glucose and enhances insulin sensitivity in people with diabetes but does not correct the impaired incretin-induced potentiation.*

Keywords: *Acipimox; Beta cell function; Incretin effect; Incretin hormones; Isoglycaemic protocol; NEFA, Potentiation.*

SIGLAS

ATP = trifosfato de adenosina

AMP = monofosfato de adenosina

AUC = área sob a curva

β -GS = sensibilidade da célula β à glicose

CEP = comitê de ética em pesquisa

Cx36 = connexin 36

Db/db = modelo de rato obeso e diabético que mimetiza o DM2 humano

DM2 = diabetes mellitus tipo 2

DPP-IV = dipeptidil peptidase-IV

DPP-IV i = inibidor da DPP-IV

DI = Disposition index

EI = efeito incretínico

EFSD = European Federation for the Study of Diabetes

eGFR = taxa de filtração glomerular estimada

EV = endovenosa

F = voluntário feminino

FFA = ácidos graxos livres

Fa/fa = modelo de rato Zucker com obesidade genética

GIP = polypeptide insulinotropic glucose-dependent

GLP-1 = glucagon-like polypeptide-1

GLP-1R = receptor do GLP-1

GLUT-2 = transportador 2 de glicose da membrana celular

GSIS = glucose stimulated insulin secretion

GRP = peptídeo liberador da gastrina

GTPase = guanossina trifosfatase

GPR40 = receptor 1 de FFA em células pancreáticas

HbA1c = hemoglobina glicada

IR = resistência à insulina

ITG = intolerância à glicose

IFG = impaired fasting glucose, diminuição da tolerância à glicose em jejum

ISR = insulin secretion rate; taxa de secreção de insulina

IMC = índice de massa corpórea

INS-1 = células de insulinoma em cultura
IL-6 = interleucina-6
NTG = normal tolerância à glicose
M = voluntário masculino
M value = metabolic value; medida da sensibilidade tissular à insulina
MM = massa magra
MG = massa gorda
MDRD = modification of diet in renal disease
NEFA = non esterified fatty acids
NTG = normal tolerância à glicose
OMS = organização mundial da saúde
OGIS = oral glucose insulin sensitivity index; índice de sensibilidade derivado do TOTG
PA = pressão arterial
PC = peptídeo-C
Pincr = potenciação dada pelas incretinas
Pglu = potenciação dada pela glicose
PPAR = peroxisome proliferator-activated receptor
RISC = Relationship of insulin sensitivity and cardiovascular risk study
TG = Triglicérides
TIS = total insulin secretion; secreção total de insulina durante experimento
TOTG = teste de tolerância à glicose oral
TEVTG = teste EV de tolerância à glicose endovenosa
TNF-alfa = fator de necrose tumoral-alfa
vs = versus
ZDF = Zucker Diabetic Fatty rats

SUMÁRIO

Introdução e Revisão da Literatura.....	12
Objetivos.....	24
Planos de Investigação e Métodos.....	25
Cálculos.....	28
Consentimento Informado.....	31
Acordo de Colaboração.....	32
Resultados.....	33
Discussão.....	61
Conclusão.....	71
Referências Bibliográficas.....	72
Apêndices.....	87

INTRODUÇÃO

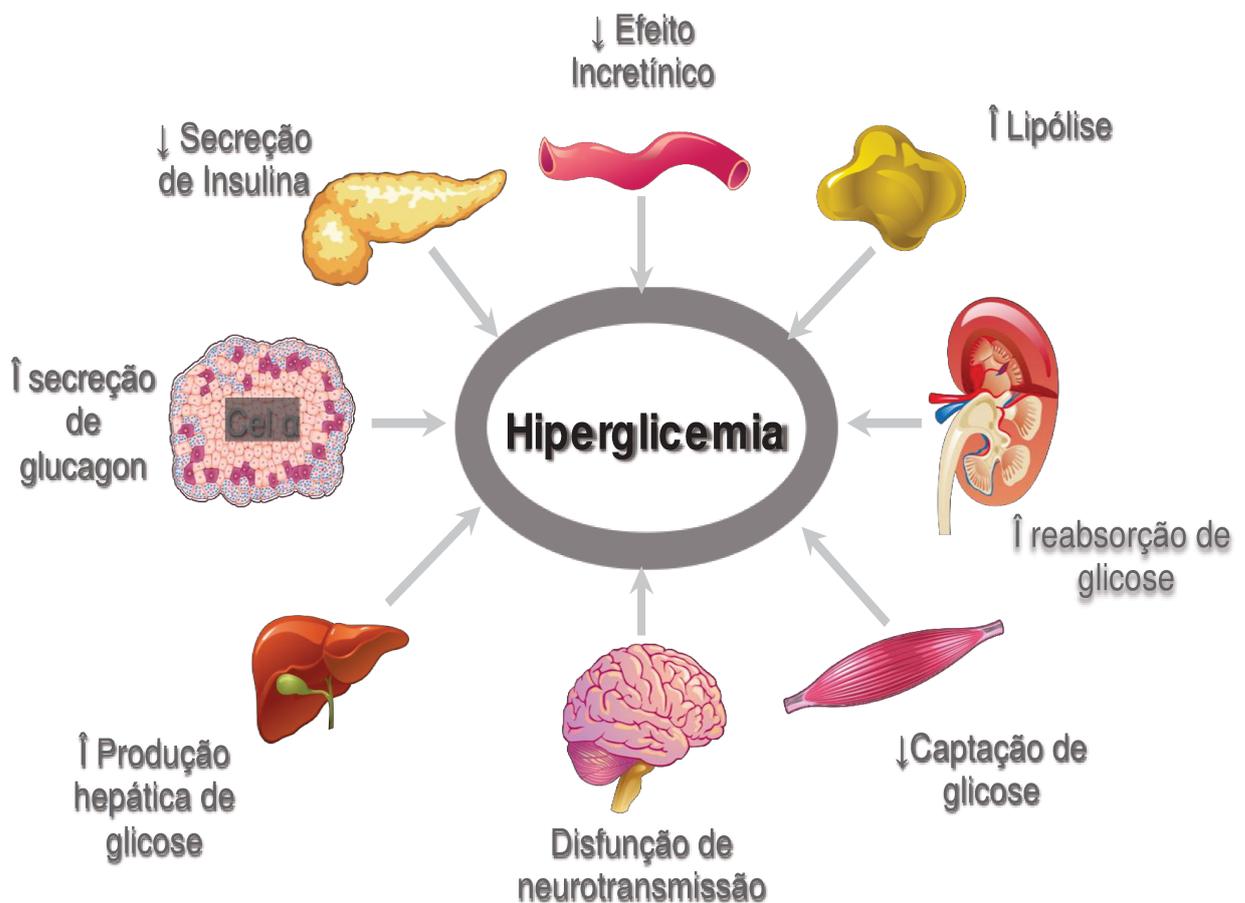
a – Diabetes Mellitus tipo 2 - prevalência e mecanismos

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é doença metabólica crônica, multifatorial, progressiva, com herança poligênica, caracterizada pelo aumento crônico da glicose sanguínea. A prevalência no Brasil era de 7,6% da população adulta, em 1988 (Datusus.gov.br/idb). Segundo o Sistema de Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, VIGITEL, a prevalência em 2016 atingia 8.9% da população sendo maior entre as mulheres - 9.9% (portalms.saude.gov.br). O VIGITEL em 2013 mostrou que a prevalência do DM2 está progredindo com a idade, sendo 17,1% entre 55 a 64 anos e 22,1% acima dos 65 anos (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima um aumento de 114% de 2000 a 2030, em números absolutos de 171 para 366 milhões, sendo que 2/3 desses estarão em países em desenvolvimento. Em 2012 o diabetes causou 1,5 milhão de mortes, sendo 43% prematuramente (antes dos 70 anos), segundo dados da OMS (2).

O DM2 é caracterizado por defeitos na ação da insulina e na função da célula β , promovendo hiperglicemia crônica que, por sua vez, levará às complicações, macro e microvasculares, causadoras da morbimortalidade da doença. Parece que a disfunção da célula β é o principal defeito na maioria dos casos, sendo menos provável que o déficit da massa de célula β sozinho seja a causa primária. Uma série de genes herdados fazem com que os tecidos se tornem resistentes à insulina. Claramente a resistência à insulina (IR) é fator importante, sendo encontrada no fígado, músculo e tecido adiposo de parentes de primeiro grau de pessoas com DM2, mesmo antes destes apresentarem obesidade e hiperglicemia (3,4). Um defeito genético na ação da insulina está presente no DM2, e a doença se manifesta quando a célula β se torna incapaz de se adaptar a um *stress* metabólico crônico. Embora a origem da IR seja genética, a alta incidência de DM2 que se abateu nos países ocidentalizados vem sendo atribuída à epidemia de obesidade e da inatividade física. Segundo DeFronzo, um “octeto sinistro” compõe a fisiopatologia do DM2, quais sejam:

1. diminuição da secreção de insulina;
2. diminuição do efeito incretínico;
3. aumento da secreção de glucagon;

4. aumento da produção hepática de glicose;
5. aumento da lipólise;
6. diminuição da captação muscular de glicose;
7. aumento da reabsorção renal de glicose e
8. disfunção de neurotransmissão cerebral resultando em resistência local à insulina.



Esquema extraído de DeFronzo, Banting Lecture, Diabetes 2009.

Todos estes fatores levam à hiperglicemia e associados fazem com que haja uma maior demanda na produção de insulina para contrabalançar o defeito na sua ação. Enquanto as células β forem capazes de aumentar a secreção de modo suficiente, a tolerância normal à glicose é mantida. Porém a IR no músculo e fígado e a falência da célula β , levando à hiperglicemia crônica, causam um declínio ainda maior da sensibilidade à insulina (5). O conceito da célula β “atordoada”, nos remete àquela célula que fica inabilitada temporariamente, para exercer suas funções, pela hiperglicemia crônica mantida, mas pode recuperar sua competência mesmo que em parte (6). O estudo DIRECT avaliou pacientes com diagnóstico de DM2 há menos de

seis anos, e submeteu um grupo a uma dieta bastante hipocalórica por um período de três a cinco meses. Os resultados foram comparados a um grupo controle sob tratamento conservador. Os pacientes que mantiveram emagrecimento substancial durante um ano tiveram remissão da doença (quase 50% dos participantes). Este resultado pode ser secundário à diminuição da IR ou melhora da função β celular, ou a ambos os fatores, dados estes não disponíveis até o momento (7). Estudos menores, entretanto, relataram recuperação da célula β , especificamente da primeira fase de secreção insulínica nos pacientes que responderam a dieta hipocalórica com remissão do diabetes (8,9).

Para um dado grau de IR, é necessário um defeito adicional na secreção de insulina para produzir a diminuição da tolerância à glicose. Além da glicose, hormônios gastrointestinais potentes estimulam a secreção pancreática de insulina, tais como as incretinas GIP (polipeptídeo insulínico glicose-dependente) e o GLP-1 (glucagon like polypeptide-1), através das interações com seus receptores nas membranas da célula β (10). Defeitos da célula β , nas vias de sinalização da insulina ou das incretinas estão envolvidos no déficit de secreção de insulina, na intolerância à glicose (ITG) e no DM2 (11).

b - Efeito Incretínico e incretinas

O Efeito Incretínico (EI) é caracterizado pela liberação de substâncias da mucosa intestinal, que se segue à ingestão de nutrientes (12,13) capazes de induzir secreção de insulina, além daquela causada pela absorção e metabolismo da glicose, por si só. Este efeito é responsável por aproximadamente 50-70% da resposta insulínica à glicose via oral (14). O EI desempenha importante papel no metabolismo da glicose em pessoas normais e sua deficiência está ligada à fisiopatologia do DM2. Os principais hormônios incretínicos são o GIP e o GLP-1. Além da glicose, proteínas e lipídeos estimulam a liberação destes hormônios gastrointestinais. Em soluções isocalóricas, a resposta do GIP é maior às proteínas que aos lipídeos (15). Da mesma forma que a glicose, a ingestão de lipídeos e proteínas desencadeia resposta secretória de insulina maior do que a administração endovenosa destes nutrientes (16,17). Portanto, pode-se generalizar o conceito de EI para lipídeos e proteínas.

O GIP, peptídeo de 42 aminoácidos, tem seus receptores expressos nos intestinos, ilhotas pancreáticas, tecido adiposo, coração, córtex adrenal, hipófise e

várias regiões cerebrais (18). É secretado pelas células K, específicas da mucosa intestinal, presentes em toda a extensão do intestino delgado, mas sobretudo no duodeno (19).

O GLP-1, produto do gene do glucagon, se expressa nas células α pancreáticas e também nas células L da mucosa intestinal, uma das mais abundantes células endócrinas do intestino (20,21). Este hormônio é uma das substâncias mais potentes para a liberação da insulina. Muitas células endócrinas intestinais produzem ambos, GLP-1 e GIP (22), mas o GIP é predominantemente secretado pelo duodeno, enquanto o GLP-1 é mais presente no intestino delgado distal, onde existem mais células L.

A secreção do GLP-1 se inicia minutos após a ingestão de nutrientes, e a concentração plasmática varia de acordo com o tipo de alimento (23,24). Alguns mecanismos indiretos têm sido propostos. Um deles seria a transmissão dos sinais do intestino proximal ao distal, via Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Nervoso Entérico das paredes gastrointestinais (25-28). Outro seria a transmissão endócrina através de hormônios gastrointestinais e neuropeptídeos, tais como substância P e peptídeo liberador da gastrina - GRP (26, 29-31). A liberação de GLP-1 no delgado proximal se daria por um subgrupo de células que co-expressa o GIP e o gene do proglucagon a esse nível do trato digestivo (19, 32). De fato, células L já foram identificadas no duodeno (33) e no jejuno (34), porém elas se encontram em maior número no íleo, cólon e também no reto (19, 32). Supõe-se que o GIP possa interferir de dois modos na liberação de GLP-1 pelas células L, conforme sua concentração: em níveis fisiológicos, após a sensibilização das células K duodenais pela gordura, proteínas e glicose, atuaria via aferente vagal, estimulando as células L indiretamente. A via eferente envolvida seria o ramo celíaco do nervo vago, sob influência do GRP. Em níveis muito altos, o GIP estimularia diretamente essas células L (27). O GLP-1 é liberado de maneira pulsátil tanto em jejum como após estímulo oral de glicose. A administração de atropina diminui a secreção de GLP-1 após estímulo glicídico e também a amplitude da pulsatilidade (35), confirmando a participação do sistema nervoso autônomo.

A concentração sérica pós-prandial das incretinas intactas é muito maior quando se fala do GIP – maior que 100pmol/L – que do GLP-1 – 5 a 15pmol/L (14). Elas são metabolizadas rapidamente por uma enzima denominada dipeptidil-

peptidase IV (DPP-IV) encontrada difusamente no organismo, tal como na borda em escova intestinal, no endotélio e no plasma. A sensibilidade à DPP-IV é diferente para o GIP e GLP-1. O GIP é menos sensível, sendo degradado em 50% pela enzima enquanto que o GLP-1 é degradado em torno de 80-90%. Da mesma maneira, a meia vida do GIP intacto é de aproximadamente sete minutos, enquanto o GLP-1 intacto é clareado do plasma em um tempo ainda menor – um a dois minutos (36-40). Deste modo, no período pós-prandial há uma concentração plasmática maior de GIP biologicamente ativo que do GLP-1.

Os metabolitos dos dois hormônios são eliminados pelos rins, resultando em meia vida de 17 minutos para aqueles do GIP e de quatro a cinco minutos para os do GLP-1 (36, 37). O fígado é menos importante na eliminação dos metabolitos (38,40). Por esta razão, a taxa de secreção dos hormônios é melhor estimada usando-se ensaios que reagem tanto com o hormônio intacto quanto com o metabolito produzido após a degradação pela DPP-IV. O ensaio não discriminatório dosa ambas as formas, refletindo, por consequência, a taxa total de secreção.

Há certa divergência sobre qual das incretinas é a mais potente: vários estudos relatam ser o GLP-1 três a cinco vezes mais potente que o GIP no DM2, pois nesses pacientes há uma menor resposta ao GIP (41-43). Os análogos do GLP-1 e os inibidores da DPP-IV são inclusive utilizados para a terapia medicamentosa do diabetes e obesidade. Entretanto, Jia e colaboradores referem que são equipotentes (44). Nos indivíduos NTG, o GIP parece ser mais importante que o GLP-1 para mediar o efeito incretínico (45). Em relação às concentrações das incretinas tanto em DM2 quanto em normais, conforme metanálise, vários fatores podem determinar sua secreção e explicar algumas das variações encontradas em publicações, com diferentes respostas do GLP-1 à ingestão de nutrientes (29).

O GLP-1 tem outros efeitos além de estimular a secreção de insulina, tais como inibição da motilidade gastrointestinal, afetando positivamente a sua homeostase nas porções proximal e distal, suprimindo a inflamação e promovendo a integridade da mucosa; inibição da secreção de glucagon, do apetite e da ingestão de alimentos; vasodilatação; natriurese e aumento da somatostatina (14,39,46-50). Nas células β , ele potencializa a secreção de insulina induzida pela glicose através de aumento de sua sensibilidade à glicose (51), melhora a biossíntese da insulina, aumenta a expressão do gene da pró-insulina e de outros genes essenciais para a

função da célula β tais como a glucocinase e a GLUT-2 (52,53). Promove a diferenciação das células progenitoras ductais em células β (54), inibe a apoptose das células β , como demonstrado em estudos com ratos, *in vitro* e *in vivo* (55-57). Promove também mitose de célula β em ilhotas isoladas de camundongos (58). O GIP também tem efeitos extra incretínicos: aumento da somatostatina, da atividade da lipase lipoprotéica no tecido adiposo, ganho de peso corporal e aumento de formação óssea (39).

c - Efeito incretínico no DM2

O EI está diminuído em pessoas com DM2, assim como em outros estados de resistência à insulina, tais como obesidade e intolerância à glicose (59-64). Os mecanismos subjacentes não foram completamente elucidados, mas múltiplas hipóteses ainda estão sendo estudadas. O defeito incretínico, segundo alguns estudos, acontece como consequência do “estado diabético”, não sendo uma causa primária da doença (65-68), pois melhora após compensação do diabetes. Holz e colaboradores em 1993, relataram a capacidade do GLP-1 restaurar a resposta secretora de células β isoladas de ratos experimentalmente insensíveis à glicose (69). Alternativamente esses defeitos (incretínicos) podem ter base genética (14, 70).

No DM2, a secreção do GIP geralmente está normal, mas seu efeito se encontra muito diminuído, enquanto a secreção do GLP-1 está diminuída e seu efeito preservado (63,71). Toft-Nielsen e colaboradores realizaram um estudo *cross-sectional* para comparar o GLP-1 de pacientes DM2 com controles saudáveis e com intolerantes à glicose (ITG), mostrando uma diminuição discreta da liberação do GLP-1 após uma refeição mista nos voluntários ITG, e uma redução mais grave nos pacientes portadores de DM2 (62). Essas observações podem significar uma perda progressiva da capacidade de secretar GLP-1 com a evolução do diabetes. Além disso, observou-se uma diminuição da resposta às incretinas no estado diabético supostamente devido à *down-regulation* dos receptores de GLP-1 e GIP decorrentes da hiperglicemia (72), em ilhotas de camundongos (expostas cronicamente à hiperglicemia) e também em ilhotas de pacientes com DM2 (73). Adicionalmente, esse defeito pode ser devido a redução do número de células β ou à disfunção das mesmas, sendo mais provável a combinação de ambas as possibilidades (74-79). Já está bem demonstrado que a exposição prolongada da célula β a níveis elevados de

glicose, leva à chamada glicotoxicidade, ou seja, a uma deficiência de secreção em resposta à glicose ou a outros secretagogos (79-84). Essa situação pode ser reversível dependendo da capacidade residual das células β (6).

Como mencionado anteriormente, a resistência à insulina (IR) diminui a liberação do GLP-1. O GLP-1 é um hormônio glucagonostático, isto é, inibe a secreção do glucagon (42,49). No DM2 o glucagon está paradoxalmente elevado. Parece que a hiperglucagonemia de jejum e também em resposta à glicose oral, se desenvolve antes da intolerância à glicose e do diabetes manifesto, como consequência da IR (64,80). O glucagon, por sua vez, suprime o GLP-1 (81), porém não se conhece o mecanismo exato. Uma hipótese seria um efeito direto do glucagon em receptores nas células L. Pacientes diabéticos frequentemente apresentam hiperglucagonemia (82) e lentidão do trânsito de nutrientes antro-duodenal, bem como neuropatia autonômica gastrointestinal aferida por método adequado (81,83,84). Todos estes fatores podem estar implicados na diminuição do GLP-1 observada (63,71).

Comparando-se a resposta da secreção de insulina entre GIP e GLP-1 no DM2, observa-se que este último é fortemente insulínico, enquanto que com o GIP há uma perda de efetividade, sem se detectar uma estrutura defeituosa desses hormônios (41,42). Portanto, o efeito insulínico do GIP é muito menos eficaz nos pacientes diabéticos e, alguns autores valorizam mais este fato do que a diminuição das concentrações do GLP-1 para explicar a redução do efeito incretínico (41,42, 45, 51). Por outro lado, a resposta do GIP à carga de glicose oral associada ao aumento de ácidos graxos livres (FFA) circulantes, desencadeada pelo uso de heparina endovenosa, foi maior em mulheres obesas não diabéticas comparadas com as magras, sugerindo que o GIP possa assumir uma maior importância, para manter a secreção de insulina em indivíduos obesos que tenham diminuição da secreção de GLP-1, prevenindo a hiperglicemia (85). Particularmente a secreção do GIP está aumentada no DM2 (63,86). Após numerosos estudos, Holst e colaboradores concluíram que a célula β diabética expressa um receptor de GIP defeituoso, ou mesmo pode não expressar tal receptor (87). Outra possibilidade é de que haja mesmo uma *down-regulation* dos seus receptores no DM2 (73) ou uma resistência ao GIP (42).

O EI tem sido quantificado desde 1967 por Perley e Kipnis (12), comparando a resposta da insulina após a glicose oral e durante a infusão de glicose endovenosa (EV), imitando o perfil de glicemia após a carga oral, ou seja, produzindo uma curva isoglicêmica à do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG). Esta abordagem elimina a necessidade de um completo conhecimento dos fatores envolvidos e pode ser usada para avaliar a importância relativa das incretinas sob várias situações fisiopatológicas. Em indivíduos normais é responsável por 40-80% mais secreção de insulina após glicose oral ou refeições mistas, em relação à glicose EV (13,63). Mas uma considerável parte da (diferente) resposta insulínica nos testes orais comparada à EV se refere à menor extração hepática da insulina no teste oral comparativamente ao EV (88). Os hormônios incretínicos, endógenos ou administrados não influenciam o *clearance* de insulina, como se havia pensado previamente (88). Ao contrário, em indivíduos saudáveis, o *clearance* hepático de insulina, medido através de canulação esplâncnica, aumenta em proporção à quantidade de glicose ingerida e à insulina secretada (89). Possivelmente a via de administração de glicose influencie estes resultados. Parece que o que determina o *clearance* hepático de insulina é a própria secreção de insulina, provavelmente pela saturação dos receptores de insulina nos hepatócitos e pelo grau de IR havendo uma correlação inversa entre as concentrações e o *clearance* de insulina (88). De fato, em mulheres não obesas com ITG, uma menor degradação hepática da insulina se correlacionou com a resistência à insulina. Isto não foi observado nas mulheres com NTG pareadas para idade e IMC (90). A insulina sofre extração hepática enquanto isto não ocorre com o peptídeo-C (91). O fato de haver extração hepática faz da concentração de insulina periférica uma base não confiável para calcular a secreção insulínica e o EI. Mudanças no EI sob condições fisiológicas ou patológicas, tais como o DM2 e a obesidade, devem então ser estimadas por comparação da resposta do peptídeo-C (ou da taxa de secreção dele derivada) a uma carga de glicose oral e a um estudo isoglicêmico EV (13).

Outra alteração presente em diabéticos e em pacientes resistentes à insulina é um aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, FFA, tanto em jejum como após ingestão de glicose ou de refeições mistas (92,93). O aumento das concentrações plasmáticas de FFA poderia inibir a secreção de GLP-1 e ou a sua ação insulínica.

d - FFA , diabetes e incretinas

Durante o jejum, FFA constituem o mais importante substrato energético para os tecidos. No estado pós alimentar há um declínio, graças à ação antilipolítica da insulina.

Diabetes e obesidade centrípeta são associadas a alterações dos lipídeos e nesses indivíduos, resistentes à insulina, é alta a taxa de lipólise (93,94). A resistência do tecido adiposo à insulina é comum no DM2, no ITG, e na obesidade centrípeta, havendo marcante resistência do adipócito ao efeito antilipolítico da insulina, contribuindo para o elevado *turnover* de lipídeos no próprio tecido adiposo, aumentando assim a disponibilidade de FFA no plasma (93). Esse aumento de FFA plasmáticos produz uma alteração da sinalização da insulina no músculo, diminuindo a captação de glicose, síntese de glicogênio (*i.e.* prejudica o metabolismo da glicose e síntese de ATP muscular) e, também estimula a gliconeogênese hepática (93, 95, 96). Já foi demonstrado que FFA e alta taxa de lipólise prejudicam a sensibilidade à insulina tanto na normoglicemia quanto na hiperglicemia (96). E a diminuição *overnight* dos FFA melhorou a IR - avaliada por *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico - e a hiperinsulinemia característica de pessoas obesas, ITG e com DM2 (97).

A resistência à insulina associada ao aumento de FFA decorre de vários fatores, tais como sinalização deficitária da insulina (98,99) e de diminuição da oxidação mitocondrial (100). Os efeitos deletérios dos FFA sobre a ação insulínica incluem também stress oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial (101-103), mas os efeitos na secreção de insulina são menos conhecidos (103,104). Esse é o conceito de "lipotoxicidade". Confirmando estes resultados, uma diminuição da concentração plasmática dos FFA com acipimox (um potente inibidor da lipólise) melhora a sensibilidade à insulina e também a taxa de síntese de ATP mitocondrial muscular esquelético, tanto em obesos tolerantes à glicose, mas resistentes à insulina, como em pacientes com DM2, indicando que o defeito mitocondrial pode ser reversível (105). Assim, o aumento dos FFA causa IR. Este efeito também foi observado em pacientes com DM2 submetidos a infusão de lípidos por 20 horas (106).

A ação deletéria dos FFA foi também observada em células pancreáticas contribuindo para a disfunção da célula β , um efeito tóxico inibitório que, em última análise, induz à sua apoptose (104,107,108). Vários estudos demonstraram que em humanos, assim como em roedores, ácidos graxos e glicose agem na célula β sendo

importantes para o controle da secreção de insulina (109,110). Um aumento fisiológico dos FFA plasmáticos, agudamente melhora a secreção de insulina, *in vivo* e *in vitro* (107,111) porém, estimula a glicogenólise e a gliconeogênese causando uma moderada hiperglicemia de jejum. Entretanto esses efeitos são atenuados na presença de hiperglicemia como demonstrado em pacientes portadores de diabetes tipo 1, nos quais a insulinemia não se modificou durante os experimentos (112). Nestes pacientes ocorreu aumento da glicemia, provavelmente desencadeada por fatores intra-hepáticos, não relacionados a função da célula β .

A influência dos FFA no aumento agudo da insulinemia, ocorreria por efeito direto no pâncreas, visto que a infusão de ácidos graxos de cadeia longa diretamente na artéria pancreática de cães aumentou a secreção de insulina (111). A longo prazo, o excesso de FFA causa diminuição da biossíntese e secreção de insulina estimulada pela glicose e da sensibilidade à insulina (113). A infusão de lipídeos em ratos provocou um estímulo inicial (de três horas) seguido por marcada inibição da secreção de insulina induzida pela glicose, que persistiu por até 48 horas após sua administração (114). Resultados contraditórios foram relatados após a infusão de lipídeos em pessoas normais, pois agudamente ocorreu aumento da secreção de insulina estimulada pela glicose (115,116), mas uma infusão *overnight* durante 10h não modificou a secreção basal nem a estimulada por glicose em outro estudo (117). Ao contrário, a infusão de Intralipid (emulsão de Triglicérides a 10%) por 24h, inibiu a primeira fase de secreção de insulina durante um teste de tolerância à glicose endovenosa (TEVTG) em indivíduos saudáveis (118). Entretanto, a infusão por 48 horas, também em não diabéticos, potencializou fortemente a secreção induzida pela glicose (119). Quando infusões por períodos mais longos (quatro dias) foram testadas, os efeitos inibitórios foram observados somente no grupo com história familiar de DM2 e não em controles. Em um estudo *in vitro*, de ilhotas de ratos Zucker (obesos, resistentes à insulina e não responsivos à leptina), o aumento sustentado dos FFA por 24-48h prejudicou a secreção de insulina estimulada pela glicose, alterou a expressão de genes e promoveu apoptose (120). Em humanos, aumento experimental de FFA por quatro dias partindo de valores em torno de 450 para 700 $\mu\text{mol/l}$, resultaram em piora da função da célula β em voluntários com história familiar de diabetes, mas não nos controles (121). Houve aumento da secreção de insulina em resposta às refeições mistas e à glicose endovenosa em indivíduos sem história

familiar de DM2, enquanto naqueles com história familiar positiva, a primeira e segunda fases da secreção insulínica diminuíram em 25 e 42% respectivamente, durante *clamp* hiperglicêmico, demonstrando assim o papel da lipotoxicidade em pessoas com alto risco para diabetes (121). Em indivíduos jovens normais sem história familiar de diabetes, um aumento fisiológico nos FFA induzido pelo jejum prolongado, para níveis semelhantes ao estudo acima citado, levou a moderada deterioração na função da célula β . A deterioração foi mais evidente quando a secreção de insulina em resposta ao TEVTG foi examinada em relação à resistência à insulina predominante, calculando-se o *disposition index*, DI (122). Este índice é o produto da secreção pela sensibilidade à insulina. Diminuição de secreção de insulina após 48 horas de infusão de lipídeos foi verificada em obesos não diabéticos, associada a diminuição do *clearance* de insulina. Neste mesmo estudo observou-se um aumento da secreção de insulina sem modificações do *clearance* nos pacientes com diabetes (123).

Outra forma de avaliar o papel dos FFA na resposta insulínica é reduzir seus níveis plasmáticos farmacologicamente. Assim, em pessoas NTG com e sem história familiar de DM2 a diminuição dos FFA pelo acipimox, foi associada a uma melhor resposta aguda da insulina à glicose EV (122,124).

Aumentos experimentais dos FFA plasmáticos para níveis semelhantes aos observados na obesidade e no diabetes tem indicado que o efeito do GLP-1 na secreção de insulina pela célula β pode ser prejudicado pelas altas concentrações dos FFA (125,126). Kang e colaboradores investigaram o papel dos FFA na diminuição da resposta incretínica *in vitro* e *in vivo* em ratos db/db (modelo de rato diabético e obeso). Verificaram que a diminuição nos níveis de lipídeos plasmáticos melhora seletivamente a eficácia do exendin-4, agonista do receptor de GLP-1, (mas não do receptor do GIP), e a homeostase da glicose, possivelmente através da proliferação da célula β pancreática (125). Estes estudos mostraram que além da hiperglicemia, a hiperlipidemia também é capaz de fazer *down-regulation* da expressão dos receptores do GLP-1 no diabetes. A discrepância dos achados com o GIP reflete provavelmente a complexidade dos efeitos da hiperlipidemia na função da célula β . Uma diminuição da sinalização do receptor incretínico parece contribuir para a glicolipotoxicidade em combinação com outras vias envolvendo o retículo endoplasmático e *stress* oxidativo (127). Não encontramos na literatura dados sobre o papel das

concentrações dos FFA nas incretinas em humanos, com excessão de Ranganath e colaboradores. Os FFA talvez interfiram na secreção de GLP-1 não só na luz intestinal, mas também através de seus níveis séricos, uma vez que o acipimox via oral aumentou as concentrações do GLP-1 em mulheres obesas, havendo correlação inversa entre o aumento crônico de FFA e GLP-1 – a diminuição aguda dos FFA em humanos obesos mostrou correlação inversa com os níveis de GLP-1 (83,85). É muito importante que se realizem estudos em humanos para verificar as consequências da manipulação dos FFA na resposta do GLP-1 e da sua capacidade de potencializar a secreção de insulina pela célula β . Uma compreensão mais abrangente da secreção de insulina e os fatores que a modificam, *in vivo* e em humanos, talvez auxilie na prevenção e tratamento do diabetes.

e - Acipimox e FFA

Acipimox (ACP) é um derivado do ácido nicotínico, potente inibidor da lipólise por se ligar ao receptor GPR109A (128, 129). A inibição da lipólise no tecido adiposo tem sido uma estratégia para diminuir os níveis dos lipídeos no organismo. Envolve a regulação/supressão da lipase-hormônio-sensível. O adipócito não é simples lugar de depósito de FFA, mas sim um órgão endócrino, liberando hormônios e proteínas (leptina, TNF-alfa, IL-6, adiponectina, resistina) em resposta aos estímulos metabólicos. O ácido nicotínico e seus análogos diminuem o AMP cíclico intracelular pela inibição da adenilciclase do adipócito e estimula uma GTPase de alta afinidade, em receptor acoplado à uma proteína G funcional na membrana celular dos adipócitos (130). A ligação do ácido nicotínico foi detectada em tecido adiposo e baço de ratos, mas não em outros tecidos (130). Portanto, o acipimox pode ser usado para reduzir experimentalmente os FFA. Além disto, parece não ter ação direta na secreção de insulina e seu efeito é de curta duração (aproximadamente seis horas), adequado a experimentos agudos.

A melhora dos níveis lipídicos em modelos de obesidade e diabetes de ratos aumenta a eficácia da terapia baseada em incretinas (125), mas em humanos não há informações sobre os efeitos da hiperlipidemia na secreção de insulina induzida pelas incretinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se a potenciação da secreção de insulina induzida pelas incretinas é reduzida por uma elevação aguda dos FFA plasmáticos em voluntários com tolerância normal á glicose. E determinar se a redução aguda dos lipídeos plasmáticos melhora o EI em portadores de DM2.

Objetivos Secundários

Verificar se a hiperlipidemia em voluntários saudáveis e a redução lipídica em pacientes com diabetes modificam a sensibilidade à insulina e os componentes dinâmicos da função β -celular: *β -cell glucose sensitivity* (sensibilidade da célula β à glicose, *β -GS*), "*rate sensitivity*" e *glucose potentiation* (potenciação induzida pela glicose).

Observação: o termo potenciação, do inglês *potentiation*, foi usado em todo o texto, com o sentido de potencializar, intensificar, reforçar.

PLANO DE INVESTIGAÇÃO E MÉTODOS

População de estudo: Foram incluídos 10 voluntários sem diabetes (NTG) em Pisa, Itália e 13 pacientes com DM2 dos hospitais das Universidades Estadual de Campinas - UNICAMP e Pontifícia Universidade Católica - PUC em Campinas, Brasil.

Crítérios de Inclusão: idade ≥ 18 e ≤ 60 anos; índice de massa corporal, IMC ≥ 20 e ≤ 39.9 Kg/m², estável nos últimos 6 meses; glicemia em jejum <100 mg/dl e HbA_{1c} $< 6\%$ para voluntários NTG, e glicemia em jejum < 230 mg/dl e HbA_{1c} entre 6,5-10% para os pacientes com diabetes. Foram incluídos tanto pacientes DM2 sem terapia medicamentosa (*drug naïve*) como pacientes em monoterapia com metformina.

Crítérios de Exclusão: infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, AVC e/ou ataque isquêmico transitório nos seis meses precedentes ao consentimento informado; níveis séricos de TGP, TGO, ou fosfatase alcalina três vezes acima do limite superior da normalidade durante o recrutamento e seleção, e/ou durante o período do estudo (*run-in* fase); função renal reduzida, definida por eGFR < 60 ml/minuto (taxa de filtração glomerular estimada) - fórmula MDRD - na consulta inicial; cirurgia bariátrica nos dois anos precedentes ou outras cirurgias gastrointestinais que induzam má-absorção crônica nos últimos cinco anos; câncer (exceto carcinoma basocelular) nos últimos cinco anos; gravidez ou expectativa de gravidez nos próximos seis meses; tratamento com esteróides sistêmicos (mas não aqueles inalados); mudança na dosagem de hormônios tireoidianos nas seis semanas precedentes ao consentimento informado e, qualquer outra doença endócrina excluindo DM2 e hipotireoidismo compensado, alcoolismo ou drogadição, ou outra condição que prejudique a adesão aos procedimentos do estudo.

Protocolo: A metformina foi suspensa dois dias antes do primeiro estudo nos voluntários com DM2. Cada voluntário foi submetido a quatro estudos experimentais com intervalo de quatro a sete dias entre eles:

1. Teste oral de tolerância à glicose, TOTG, com 180 minutos de duração (75 gramas de glicose). A duração de três horas foi escolhida para se avaliar a secreção de insulina por um período maior, em função dos diabéticos frequentemente apresentarem curva glicêmica e insulinêmica desviadas para a direita, ou seja, mais prolongada que nos indivíduos normais. Além disto, estudos com glicose marcada demonstram que a

absorção de glicose não é completa aos 120 minutos após ingestão. Nas tabelas e figuras tal teste foi denominado "OGTT".

2. Teste Isoglicêmico, escolhido como o melhor para avaliar o EI, uma vez que as glicemias são superponíveis às do TOTG, portanto supõe-se que seu efeito sobre a secreção de insulina é igual após ingestão de glicose ou durante glicose EV. Deste modo, a variável glicemia deixa de ser importante no cálculo do efeito incretínico. Portanto qualquer diferença de secreção entre TOTG e Isoglicêmico é secundária aos efeitos da passagem da glicose pelo tubo gastrointestinal, ou seja, ao efeito incretínico, independentemente das concentrações dos hormônios incretínicos conhecidos até o momento. A glicose foi infundida por via endovenosa, durante 180 minutos, reproduzindo a curva glicêmica do TOTG ("ISO"). Para reproduzir a glicemia medida durante o TOTG, no ISO usamos um algoritmo desenvolvido *ad hoc* para determinar a velocidade variável de infusão de glicose a 10%, auxiliando assim a reconstrução da curva glicêmica. O algoritmo foi desenvolvido em Pisa pelo Professor Andrea Natali e utilizado em vários protocolos anteriores conseguindo-se reproduzir a glicemia com precisão (59,60). Este algoritmo é um cálculo da glicose a ser infundida nos próximos 10 minutos, quando nova medida da glicemia é realizada. Trata-se de cálculo aproximado que considera a diferença entre a glicemia medida naquele momento e a próxima que deve ser semelhante à do TOTG no tempo sucessivo, o espaço corporal de distribuição da glicose (0,200 ml/Kg de peso), e as supostas sensibilidade à insulina e supressão da produção endógena de glicose. Devido ao fato de serem suposições baseadas na presença de obesidade, diabetes e antecedentes familiares para diabetes, e não medidas exatas destes parâmetros, a infusão é reajustada pelo experimentador a cada 10 minutos.
3. TOTG associado a uma infusão endovenosa de lipídeos a 20% (Intralipid Fresenius Kabi, composto por óleo de soja purificado a 20%, fosfolípide de ovo, glicerol, hidróxido de sódio e água para injetáveis), uma mistura de ácidos graxos essenciais e não essenciais de cadeia longa composta pelos ácidos linoléico (44-62%), oléico (19-30%), palmítico (7-14%), linolênico (4-11%) e esteárico (1,4-5,5%) em velocidade de 1,0 ml/minuto, nos voluntários NTG em Pisa, que denominamos "L-OGTT". Nos DM2 repetimos os estudos concomitantemente à ingestão de acipimox, "ACP-OGTT". A infusão de lipídeos se iniciou 120 minutos antes da ingestão de glicose juntamente com Heparina (Ely Lilly - 5000UI), para estimular a lipase lipoprotéica, que por sua vez estimula a lipólise, administrada em *bolus* de 200U seguida de infusão endovenosa

constante de 0,4U por kg/minuto. Acipimox foi administrado via oral, duas vezes na dose de 250 mg, 120 minutos antes e 60 minutos após a ingestão de glicose (para evitar um rebote das concentrações de FFA).

4. Teste Isoglicêmico semelhante ao anterior, porém associado à mesma infusão de lipídeos nos voluntários saudáveis ("L-ISO") e às mesmas doses de acipimox nos pacientes diabéticos ("ACP-ISO").

Amostras de plasma para dosar as concentrações de peptídeo-C, insulina, FFA e glucagon foram obtidas nos tempos -120 -30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos nos DM2 e nos tempos -120, -60, -20, 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 minutos nos NTG; GLP-1 e GIP nos tempos -120, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos nos DM2 e nos tempos -120, 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 180 minutos nos NTG, nos TOTG. Em função de não se esperar mudanças no GLP-1 e GIP durante os estudos isoglicêmicos, aqui eles foram dosados apenas nos tempos -120, 0, 30, 60, 120 e 180 minutos. Triglicérides foram coletados nos mesmos tempos da insulina nos NTG e nos tempos -120, 0 e 180 minutos no grupo DM2. O início da ingestão e da infusão de glicose foi considerado como tempo zero minuto. A glicose foi ingerida em cinco minutos.

A massa magra (MM), foi medida por bio-impedância elétrica usando um *Body Composition Analyser* modelo 310, *Biodynamics-Washington-USA* em Campinas e um modelo TB-300 (TANITA, Japão) em Pisa; massa adiposa (MG), foi calculada como a diferença entre o peso corporal e a MM. Concentrações plasmáticas de glicose foram medidas de 10 em 10 minutos pela técnica de glicose oxidase (YSI 2300 *Stat Plus Glucose Analyzer*, Ohio-USA na Unicamp e *Beckman Glucose Analyzer*, Fullerton-CA em Pisa).

A insulina e peptídeo-C foram dosados por eletroquimioluminescência (Liaison, kits Diasorin Spa; Saluggia-TO-Itália na Unicamp e Cobas e411 instrument, Roche, Indianapolis-USA em Pisa); GLP-1 e GIP por ELISA em ambos os centros (Merck Millipore Corporation, Billerica, MA, USA; GLP-1: sensibilidade de 0.14 pmol/L; coeficiente variação inter-ensaio 14% e intra-ensaio 2.8%. GIP: sensibilidade de 0.9 pmol/L; coeficiente variação inter-ensaio 7% e intra-ensaio 3.4 %); FFA por método colorimétrico (WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Alemanha) e glucagon por Elisa (R&D Systems, Minneapolis-MN-USA; sensibilidade de 4.2 pmol/L; faixa de detecção de 8.9 - 574 pmol/L) em Campinas e Mercodia Glucagon ELISA (Mercodia ab,

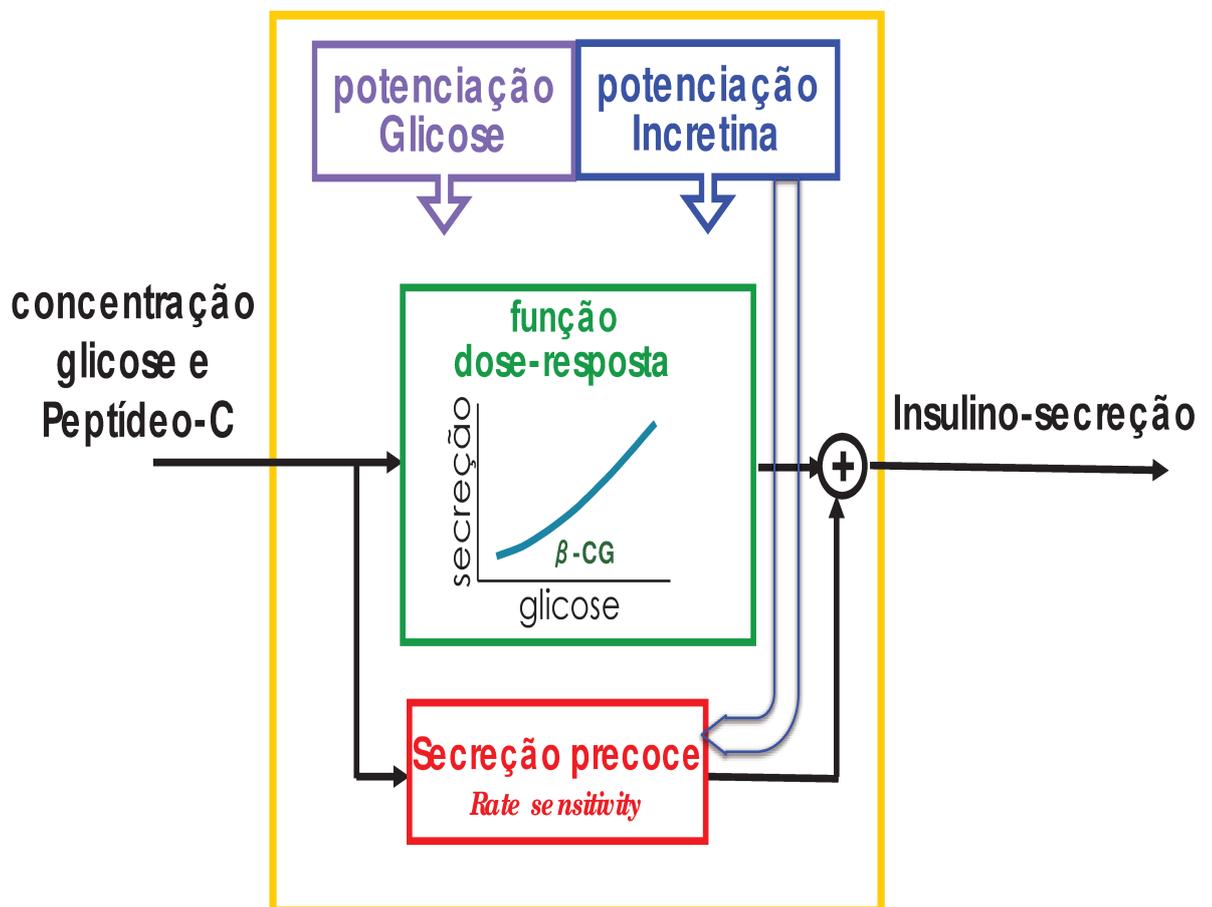
Sylveniusgatan 8A, Uppsala Sweden; sensibilidade 1pmol/L; faixa de detecção de 1,5 – 130 pmol/L) em Pisa. Todos os ensaios laboratoriais dos voluntários NTG foram realizados em Pisa, enquanto os dos pacientes diabéticos executados na UNICAMP.

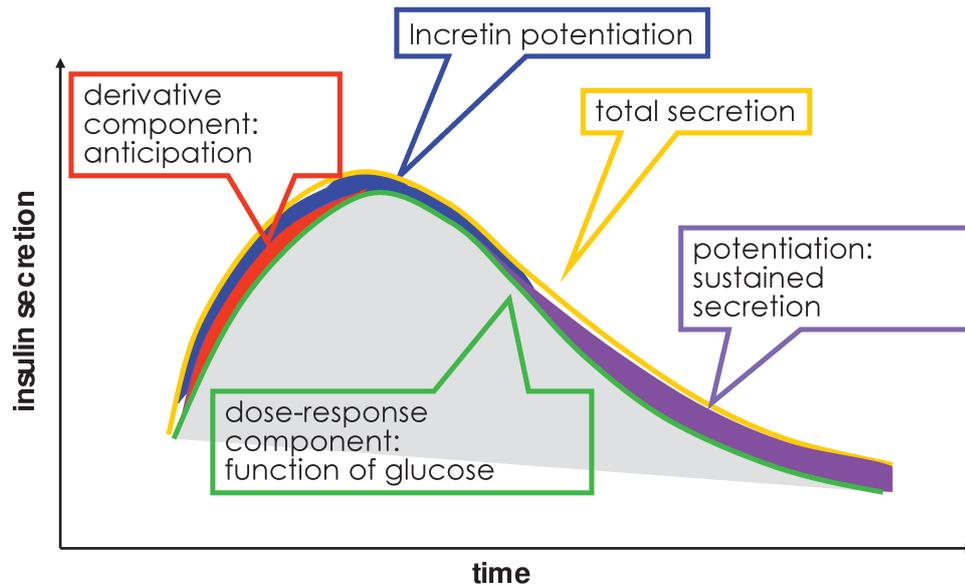
Cálculos

1. **A sensibilidade à insulina** foi estimada através do cálculo do *oral glucose insulin sensitivity index* (OGIS), usando as glicemias e insulinemias em resposta à ingestão de glicose. Este índice correlaciona-se bem com a sensibilidade à insulina medida durante *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, ou *M value* (131). As áreas sob as curvas tempo/concentração (AUCs) foram calculadas pela regra da área trapezoidal.
2. **Função da célula β** foi avaliada usando um modelo matemático descrito por Mari e cols. (132) e modificado recentemente (133). Este modelo, em resumo, consiste em três blocos:
 - um bloco que faz um "*fitting*" (ajuste) da concentração de glicose, através de "*smoothing*" (técnica matemática utilizada para atenuar os artefatos, abrandando os picos e depressões demais, neste caso da glicose) e interpolação das concentrações;
 - um bloco que descreve a dependência da insulina ou do peptídeo-C em relação à concentração de glicose;
 - um bloco de cinética do peptídeo-C, isto é, o modelo bi-exponencial proposto por Van Cauter e cols., que estudaram cinética do peptídeo-C e a relacionaram aos parâmetros individuais como idade, gênero, superfície corporal, e tolerância à glicose em uma grande população (134).

O parâmetro mais importante é a relação dose-resposta entre a liberação de insulina e as concentrações de glicose no plasma: a inclinação média da função dose-resposta representa a sensibilidade das células β à glicose (β -GS). A função dose-resposta à ingestão de glicose é modulada por um fator variável no tempo, que expressa a potenciação sobre a secreção de insulina, e que foi calculado como a razão entre os valores da potenciação aos 180 minutos e tempo zero (P_{GLU}) e calculado a cada cinco minutos. Outro componente da secreção de insulina, a *rate sensitivity*, representa a modificação dinâmica da secreção de insulina na dependência das concentrações de glicose. Caracteriza a antecipação da secreção de insulina à medida que os níveis de glicose sobem. A deconvolução do peptídeo-C foi usada para calcular a taxa de

secreção de insulina, ISR, a cada cinco minutos durante todo o período de três horas e o total desta secreção (área sob a curva), representado por TIS (*total insulin secretion*). O modelo atualizado inclui a avaliação do efeito incretínico sobre a secreção de insulina, portanto, utilizando os dados de secreção durante os estudos orais comparados aos EV (P_{INCR} , ou potenciação dada pelas incretinas). O modelo matemático foi desenvolvido e aplicado usando os dados originais de insulina, glicose e peptídeo-C por Andrea Mari, Instituto de Neurociências de Padova, Itália. O modelo matemático está representado nas figuras que se seguem:





3. **Efeito Incretínico (EI)** - A infusão endovenosa de glicose fornece uma medida da resposta secretória da célula β , ao estímulo glicêmico sem a superposição da ação das incretinas. Portanto, o P_{INCR} foi calculado como a razão oral/endovenosa para o ISR ao longo dos 180 minutos experimentais. Este cálculo cancela o impacto dos níveis de glicose por si mesmos, pois os níveis do estudo ISO foram pareados aos do TOTG pelo protocolo. Classicamente o EI é calculado como uma porcentagem da diferença oral-EV sobre a secreção oral usando as concentrações plasmáticas do peptideo-C ((oral-EV)/oral x 100) ou como a sua razão (oral/EV) como descrito por Nauck (13, 58). Todos estes calculos foram incluídos neste estudo.

Parâmetros laboratoriais de segurança: foram colhidos pela manhã, após 12 horas em jejum, na consulta de triagem e no início do último estudo: hemograma completo; glicose, creatinina, sódio, potássio, ácido úrico, TGP, TGO, fosfatase alcalina, gama-GT, bilirrubina total e frações, LDH, proteínas totais, CK, albumina. Testes de gravidez (urina) foram realizados em voluntários do sexo feminino em idade fértil. Exame físico realizado na triagem e no início de cada estudo. O peso corporal foi medido utilizando-se sempre a mesma balança, e a circunferência da cintura medida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, durante expiração com o paciente em pé, sem sapatos.

Análise estatística: os resultados são apresentados como média \pm Desvio Padrão para as variáveis com distribuição normal ou mediana e intervalo interquartil (entre os quartis 25% e 75%) para as variáveis com distribuição não-normal. Os

valores nos gráficos representam média \pm erro padrão, e em alguns gráficos (em colunas) são demonstrados os valores individuais. As respostas intra-grupo aos medicamentos experimentais foram comparadas pelo teste *t* pareado ou *Wilcoxon signed rank*, dependendo da distribuição dos dados. As respostas dos parâmetros no tempo (curvas) foram analisadas por ANOVA para medidas repetidas após transformação dos dados em postos (135). Um valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo; todas as análises foram realizadas utilizando o programa The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA. As comparações entre os resultados de DM2 e indivíduos saudáveis não foram programadas, pois tratam-se de experimentos diferentes e complementares. Além disto, os grupos diferem quanto à idade e composição corporal.

Cálculo do tamanho da amostra e *power analysis*: anteriormente foram observados efeitos incretínicos, sobre a secreção de insulina e sobre outros parâmetros da função das células β , com $p < 0,0002$, usando o mesmo desenho de estudo, em grupos de 11 indivíduos com tolerância normal à glicose (NTG) e 10 intolerantes (ITG) (59) e, em outro estudo com grupos de 24 NTG, 17 ITG e 10 DM2 (60). Além disso, anteriormente, Nauck e cols. avaliaram apenas seis voluntários saudáveis com procedimento comparável e descreveram resultados semelhantes (13). No que diz respeito à infusão aguda de lipídeos e à ingestão de acipimox, foram detectadas em pequenos grupos de oito a 20 participantes, grandes excursões de FFA no plasma e mudanças significativas da insulinemia e/ou da secreção de insulina (121,136,137). Não há dados sobre a administração de acipimox e secreção de insulina estimulada pelas incretinas em seres humanos, assim, uma *power-analysis* adequada não pode ser realizada na programação do protocolo. No entanto, foi suposto que este número de participantes permitiria detectar diferenças significativas entre os dois experimentos (TOTG e ISO).

Consentimento Informado, e Proteção dos dados: o protocolo foi conduzido de acordo com a União Europeia e as normas internacionais de Boas Práticas Clínicas (*International Conference on Harmonization Guidelines*), regulamentos governamentais aplicáveis e procedimentos institucionais de investigação. O protocolo também foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP) da Unicamp em 25 de setembro de 2015, no parecer 1.244.957,

CAAE 48181215.2.0000.5404. Todos os participantes do estudo receberam um formulário de consentimento que descreveu o estudo, fornecendo as informações necessárias para tomar uma decisão sobre a sua participação. O formulário de consentimento foi submetido à aprovação pelo CEP juntamente com o protocolo do estudo. O consentimento formal, assinado pelo voluntário e o pesquisador, foi obtido antes do participante ser submetido a qualquer procedimento do estudo. O estudo pôde ser interrompido sempre que o voluntário quisesse retirar o consentimento informado, ou quando um evento adverso representasse uma condição de risco ao participante, de acordo com os experimentadores.

Acordos de colaboração: o projeto foi financiado pelo programa de colaboração da EFSD (*EFSD Sanofi- Collaborative Programme 2015*), para custeio dos kits para os ensaios, análises laboratoriais, gastos com insumos dos testes nos dois centros de pesquisa e ajuda de custos para os voluntários.

RESULTADOS

1. Características clínicas dos pacientes com diabetes e voluntários saudáveis

Foram triados 10 indivíduos com tolerância normal à glicose (4 mulheres - F e 6 homens - M) e 35 pacientes com diabetes tipo 2 (25F e 10M). Os voluntários NTG não relatavam nenhuma doença em sua maioria; a consulta clínica e os exames de triagem eram normais, exceto uma voluntária que relatava ser hipertensa, recebia terapia hipotensora e a pressão arterial (PA) era controlada. A HbA1c era inferior a 6%, valor que na época da triagem era considerado o limite da normalidade (**Tabela 1**).

Dos 35 pacientes com diabetes triados, 15 foram submetidos aos testes, porém dois foram excluídos por estarem compensados no momento do estudo, de maneira que não mais preenchiam os critérios de inclusão presentes no recrutamento. De fato, suas curvas se modificaram para intolerantes à glicose, não mais compatíveis com diabetes. Dos 13 pacientes incluídos no estudo (10F e 3M), quatro possuíam hipotireoidismo e 9, hipertensão arterial, todos compensados e em tratamento com doses estáveis de medicamentos e dosagens hormonais tireoidianas normais. Cinco eram dislipidêmicos, com níveis de triglicérides (TG) entre 200 e 250mg/dl, e quatro deles estavam em uso de estatinas. Onze recebiam metformina em dose estável nos últimos 6 meses.

Conforme se observa na Tabela 1, o IMC médio dos DM2 é mais alto do que o dos voluntários NTG, assim como a idade. Os pacientes com DM2 apresentavam maior adiposidade e menor sensibilidade à insulina, calculada através dos índices de sensibilidade derivados do OGTT, tais como o OGIS (125).

Tabela 1 – Características antropométricas e metabólicas dos voluntários NTG e dos pacientes com DM2[§]

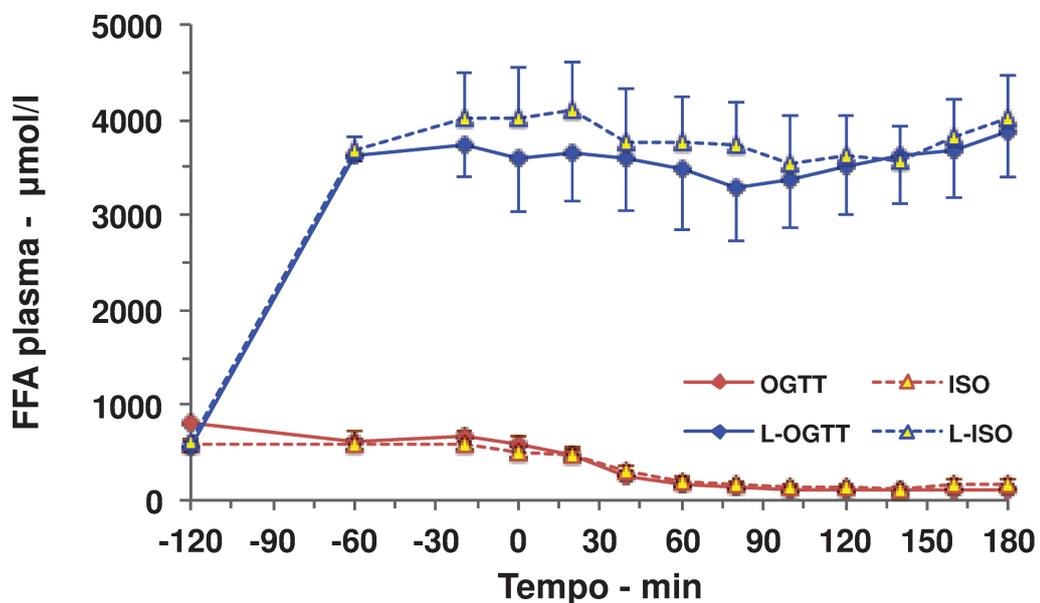
	NTG	DM2
n (F/M)	10 (4/6)	13 (10/3)
Idade (anos)	33.6 ± 10.9	54.8 ± 7.6
Branco/negro	8/2	6/7
Duração (<1/<5/<10 anos)	0	2/7/4
HbA1c (%)	5.7 ± 0.5	7.2 ± 0.5
Uso de metformina	0	11
Peso (kg)	68.1 ± 22.2	87.7 ± 15.8
IMC classe (NL, SP; OBI, OBII)	7/2/1/0	1/4/5/3
IMC (kg/m ²)	23.8 ± 5.9	32.8 ± 5.6
Massa magra (kg)	51.9 ± 15.0	51.1 ± 10.4
Massa adiposa (%)	23.2 ± 3.0	38.6 ± 5.9
Metabolismo basal (kcal/24h)	1576 ± 414	1619 ± 260
Triglicérides (mg/dl)	81 ± 23	157 ± 66
Triglicérides (mmol/l)	1.05 ± 0.27	1.77 ± 0.74
OGIS (ml.min ⁻¹ .m ⁻²)	402 ± 22	291 ± 60

[§] Resultados são médias±DP;NL=normal;SP=sobrepeso;OBI=obesidade grau I; OBII=obesidade grau II; OGIS = *oral glucose insulin sensitivity index*

2. Efeitos da infusão de lipídeos em voluntários NTG sobre os FFA.

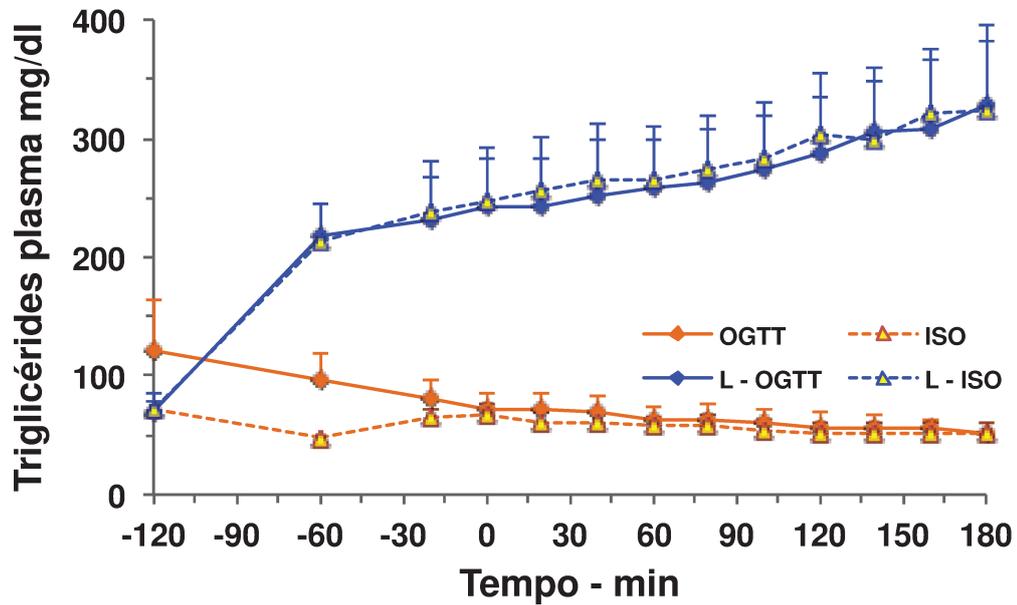
A infusão de lipídeos no grupo NTG aumentou a concentração de FFA no plasma de 0.20 ± 0.08 para 3.55 ± 1.29 mmol/L durante o OGTT, e de 0.23 ± 0.08 para 3.77 ± 1.10 mmol/L durante o estudo L-ISO ($p < 0.0001$ para ambos). As AUCs, áreas sob as curvas, dos FFA foram semelhantes no OGTT e ISO (35 ± 14 e 41 ± 15 mmol.L⁻¹.3h⁻¹), porém aumentaram mais de 10 vezes nos estudos L-OGTT e L-ISO (639 ± 232 e 679 ± 199 mmol.L⁻¹.3h⁻¹ respectivamente) (**Figura 1A**). Ocorreram amplos aumentos de TG plasmáticos nos estudos com infusão de lipídeos sem diferenças entre OGTT e correspondentes ISO (**Figura 1B**). As AUCs dos TG foram OGTT = 127 ± 55 ; ISO = 114 ± 43 vs. L-OGTT = 561 ± 237 e L-ISO = 577 ± 237 mmol.L⁻¹.3h⁻¹, ambos $p < 0.0001$). As concentrações plasmáticas de FFA e TG no jejum foram semelhantes nos 4 estudos.

Fig. 1 A - Concentrações plasmáticas de FFA nos voluntários NGT



$p < 0.0001$ (L-OGTT vs. OGTT e L-ISO vs. ISO)

Fig. 1 B - Concentrações plasmáticas de triglicérides nos voluntários NGT



$p < 0.0001$ (L-OGTT vs. OGTT e L-ISO vs. ISO)

3. Efeito da infusão de ácidos graxos na glicose, insulina e peptídeo-C plasmáticos nos voluntários NTG.

A glicemia e insulinemia em jejum foram similares nos quatro estudos. A infusão de lipídeos causou deterioração da tolerância à glicose, particularmente evidente na segunda metade do teste, ou seja, no intervalo 90-180 minutos, período em que o incremento da glicemia foi significativamente maior ($p < 0.0001$) (**Figuras 2 A e 2 B; Tabela 2**).

Fig. 2 A - Glicemias nos estudos dos voluntários NTG

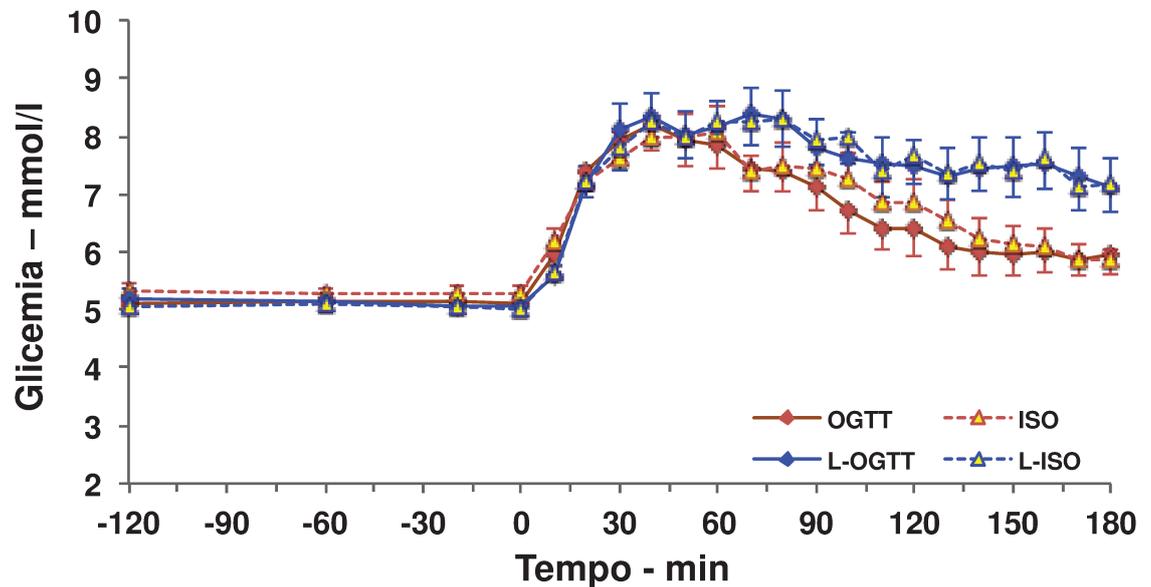
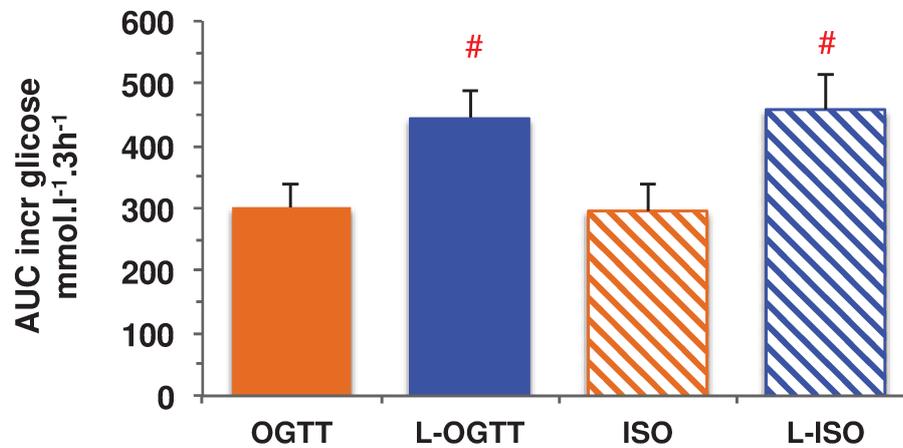


Fig. 2 B - Área incremental sob as curvas de glicose no grupo NTG



$p < 0.05$: L-OGTT vs. OGTT e L-ISO vs. ISO

Como se esperava, a secreção de insulina foi maior nos estudos orais vs. EV. Assim as concentrações plasmáticas de ambos, peptídeo-C e insulina foram maiores após a ingestão de glicose. Além disto, a insulinemia foi maior durante a infusão de lipídeos (tabela 2; **Figuras 3 A e 3 B**).

Tabela 2 - Glicemias e insulinemias no grupo NTG[§]

	OGTT	ISO	L-OGTT	L-ISO	p1
Glicemia _{jejum} (mmol/L)	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.4	5.3 ± 0.5	5.1 ± 0.4	0.08
Glicemia _{jejum} (mg/dL)	92 ± 5.4	94 ± 7.2	95 ± 9	92 ± 7.2	0.08
AUC G _{ogtt} (mmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	1221 ± 117	1247 ± 116	1357 ± 184	1358 ± 173	0.07
Incr.AUCG _{ogtt} (mmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	302 ± 110	296 ± 138	444 ± 140 [#]	458 ± 172 [#]	<0.0001
AUC G _{90-180'} (mmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	560 ± 96	584 ± 85	672 ± 125 [#]	676 ± 118 [#]	0.02
Glicemia média _{ogtt} (mmol/L)	6.7 ± 0.6	6.9 ± 0.6	7.5 ± 1.0 [#]	7.5 ± 0.9 [#]	0.008
Insulina _{jejum} (pmol/L)	52 ± 32	53 ± 42	46 ± 24	48 ± 26	0.68
AUC Ins _{jejum} (nmol.L ⁻¹ .2h ⁻¹)	6.11 ± 3.78	6.33 ± 5.02	7.19 ± 2.98	7.58 ± 4.56	0.08
AUC Ins _{ogtt} (nmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	61.1 ± 47.9	24.0 ± 14.4 [*]	90.1 ± 71.9 [#]	50.8 ± 44.8 ^{*#}	<0.0001
AUC PC _{ogtt} (nmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	405 ± 156	246 ± 93 [*]	530 ± 180 [#]	386 ± 144 ^{*#}	<0.0001

[§] Resultados: médias±DP; AUC = área sob a curva; AUC_{jejum} = de T -120 a 0 min; Incr = incremental; G = glicose; Ins = insulina; PC = peptideo-C.

p1 - ANOVA para medidas repetidas com distribuição por postos; [#] p <0.05 para os estudos durante infusão de lipídeos (L-OGTT ou L-ISO) vs. os correspondentes OGTT ou ISO; ^{*} p <0.05 para os estudos isoglicêmicos (ISO ou L-ISO) vs. os correspondentes OGTT e L-OGTT.

Fig. 3 A - Insulinemias nos estudos dos voluntários NTG

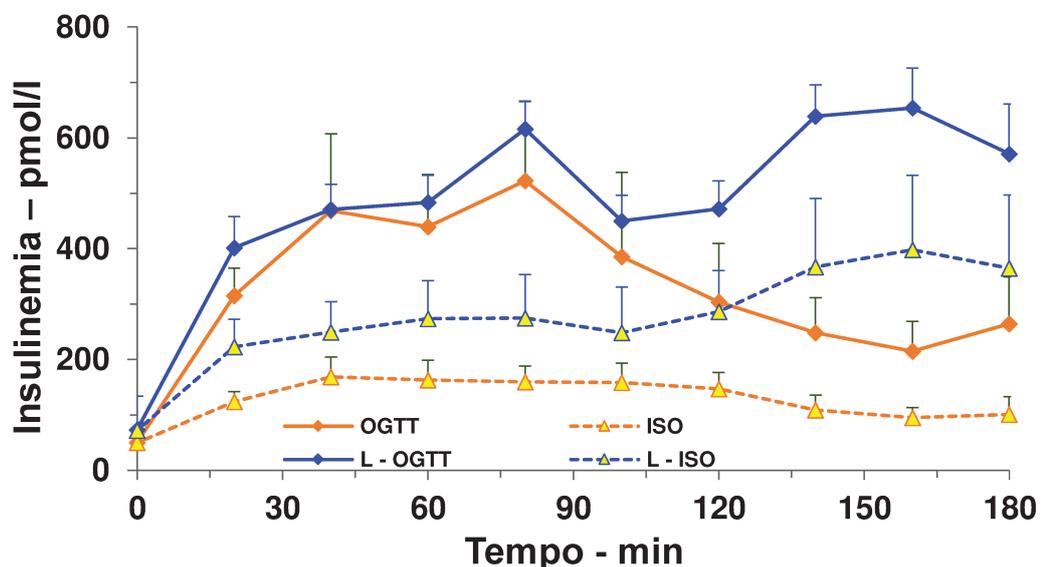
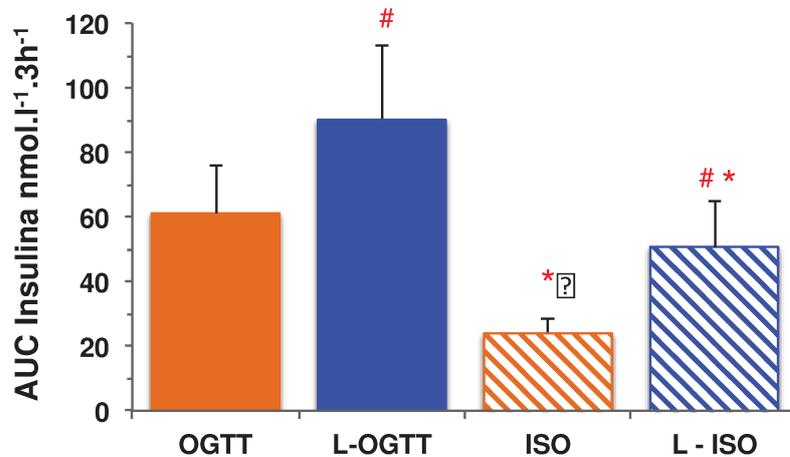


Fig. 3 B - AUCs das insulinemias nos estudos dos voluntários NTG



$p < 0.05$ L-OGTT ou L-ISO vs. correspondente OGTT ou ISO

* $p < 0.05$ ISO ou L-ISO vs. correspondente OGTT ou L-OGTT

1. Efeito dos ácidos graxos nos parâmetros da função da célula β .

Em concordância com os dados originais de insulinemia e peptídeo-C, a secreção total de insulina derivada do modelo matemático aumentou significativamente tanto no período em jejum como após ingestão ou infusão de glicose nos estudos com intralipid em relação aos estudos controle (**Tabela 3, Figuras 4**). O padrão das curvas de secreção pode ser observado na **Figura 5 A**.

A sensibilidade da célula β à glicose (β -GS), e a potenciação dada pela glicose, P_{GLU} , ambas calculadas para os estudos isoglicêmicos, não foram significativamente afetadas pela infusão de lipídeos. Ao contrário, a potenciação dada pelas incretinas, P_{INCR} , calculada nos TOTG, diminuiu de 1.6[1.1] para 1.3[0.1] unidades (mediana[interquartil]), $p < 0.0001$. Nas **figuras 5 B e C**, as áreas coloridas em laranja e azul correspondem à diferença entre TOTG e ISOs, ou seja, ao efeito incretínico.

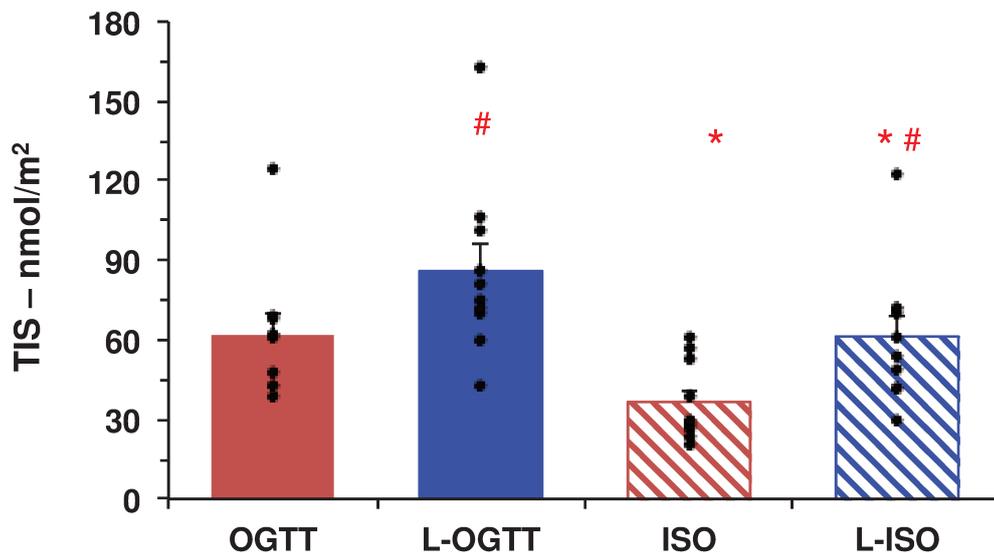
Tabela 3 – Parâmetros da função da célula-β em voluntários NTG[§]

	OGTT	ISO	L-OGTT	L-ISO	p1
ISR jejum (pmol·min ⁻¹ ·m ⁻²)	81[19]	73 [43]	103 [25] [#]	105 [24] [#]	0.0003
TIS (nmol/m ²)	61 [26]	29 [26] [*]	78 [31] [#]	57 [30] ^{#*}	<0.0001
β-GS (pmol·min ⁻¹ ·m ⁻² ·mM ⁻¹)	-	62 [34]	-	61 [50]	0.68
P _{GLU} (vezes)	-	1.04 [0.38]	-	1.19 [0.73]	0.46
P _{INCR} (vezes)	1.61 [1.10]		1.30 [0.10] [#]		0.04
Rate sensit. (nmol·m ⁻² ·mM ⁻¹)	0.85 [0.94]	0.28 [0.59]	2.02 [2.05] [#]	0.70 [0.92] ^{**}	0.01

[§] Resultados: mediana[inter quartil]; ISR - insulin secretion rate; TIS - secreção total de insulina; β-GS - sensibilidade da célula beta à glicose; P_{GLU} - potenciação pela glicose; P_{INCR} - potenciação pelas incretinas; Rate sensit - rate sensitivity. **p1** - ANOVA para medidas repetidas com distribuição por postos

[#] *p* <0.05 para os estudos durante infusão de lipídeos (L-OGTT ou L-ISO) vs. os correspondentes OGTT ou ISO;

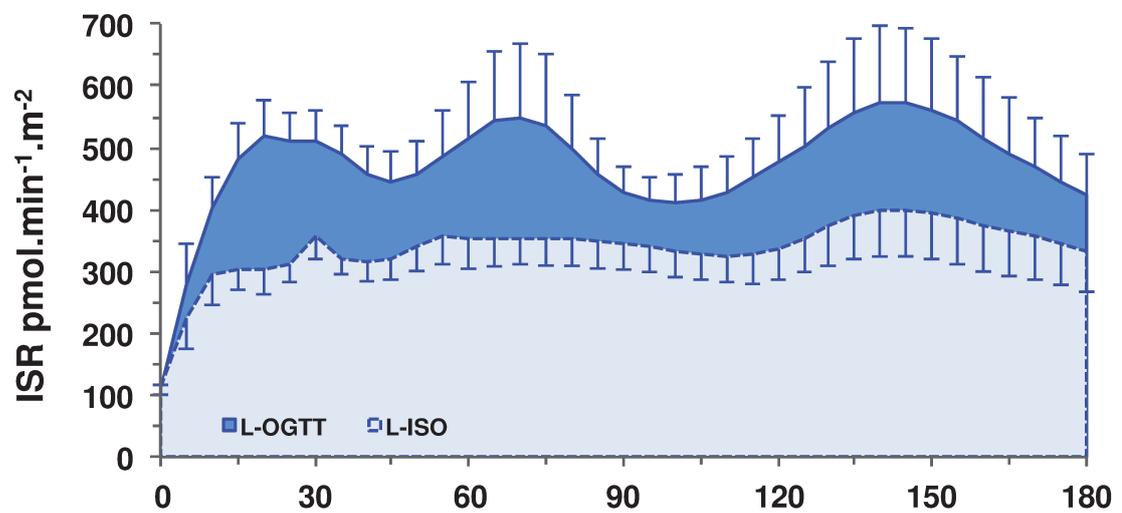
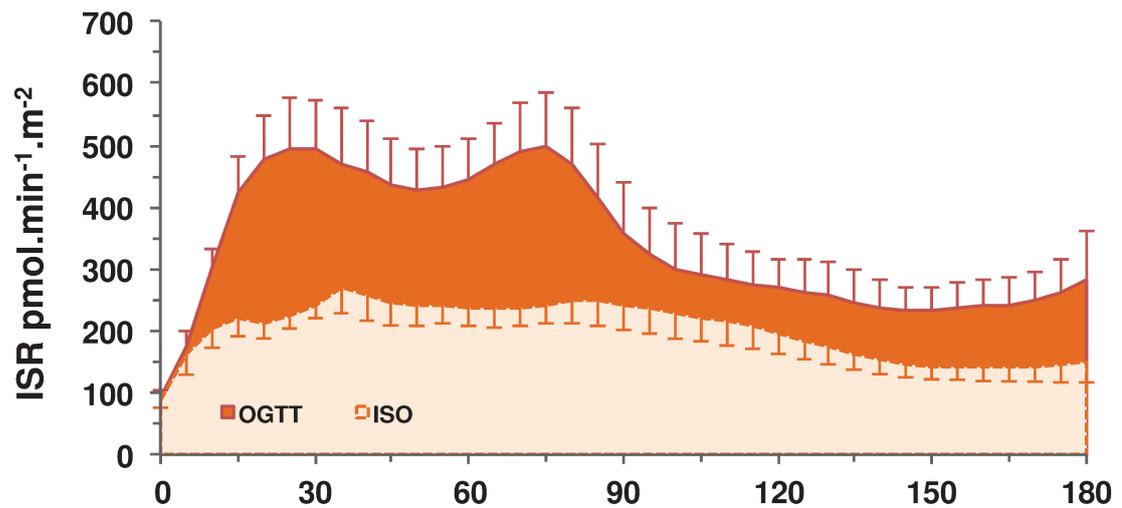
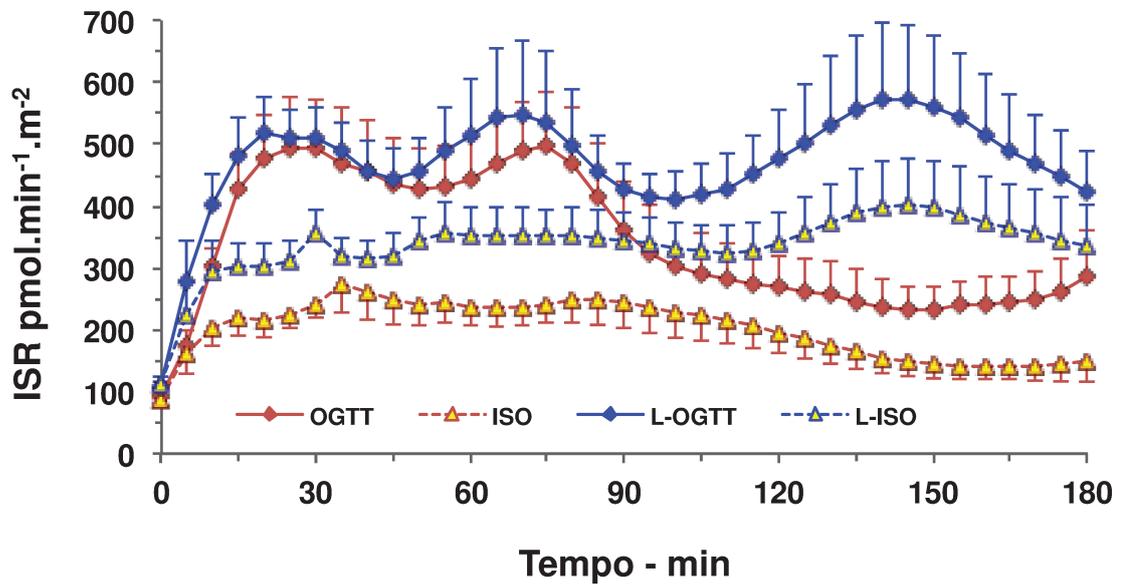
^{*} *p* <0.05 para os estudos isoglicêmicos (ISO ou L-ISO) vs. os correspondentes OGTT e L-OGTT.

Fig. 4 - TIS nos estudos dos voluntários NTG

^{*} *p* <0.01: ISO vs. OGTT e L-ISO vs. L-OGTT;

[#] *p* <0.05: L-OGTT vs. OGTT e L-ISO vs. ISO.

Figura 5 A, B e C - Curvas de secreção de insulina dos NTG



O padrão das curvas (*time-course*) da potenciação pelas incretinas e pela glicose pode ser observado nas **Figuras 6A e B** e **7A e B**. Não houve diferença significativa para a segunda em resposta aos lipídeos, enquanto a potenciação dada pelas incretinas foi reduzida significativamente pela infusão de lipídeos.

Figura 6A e B - Curvas de potenciação pelas incretinas e pela glicose no grupo NTG

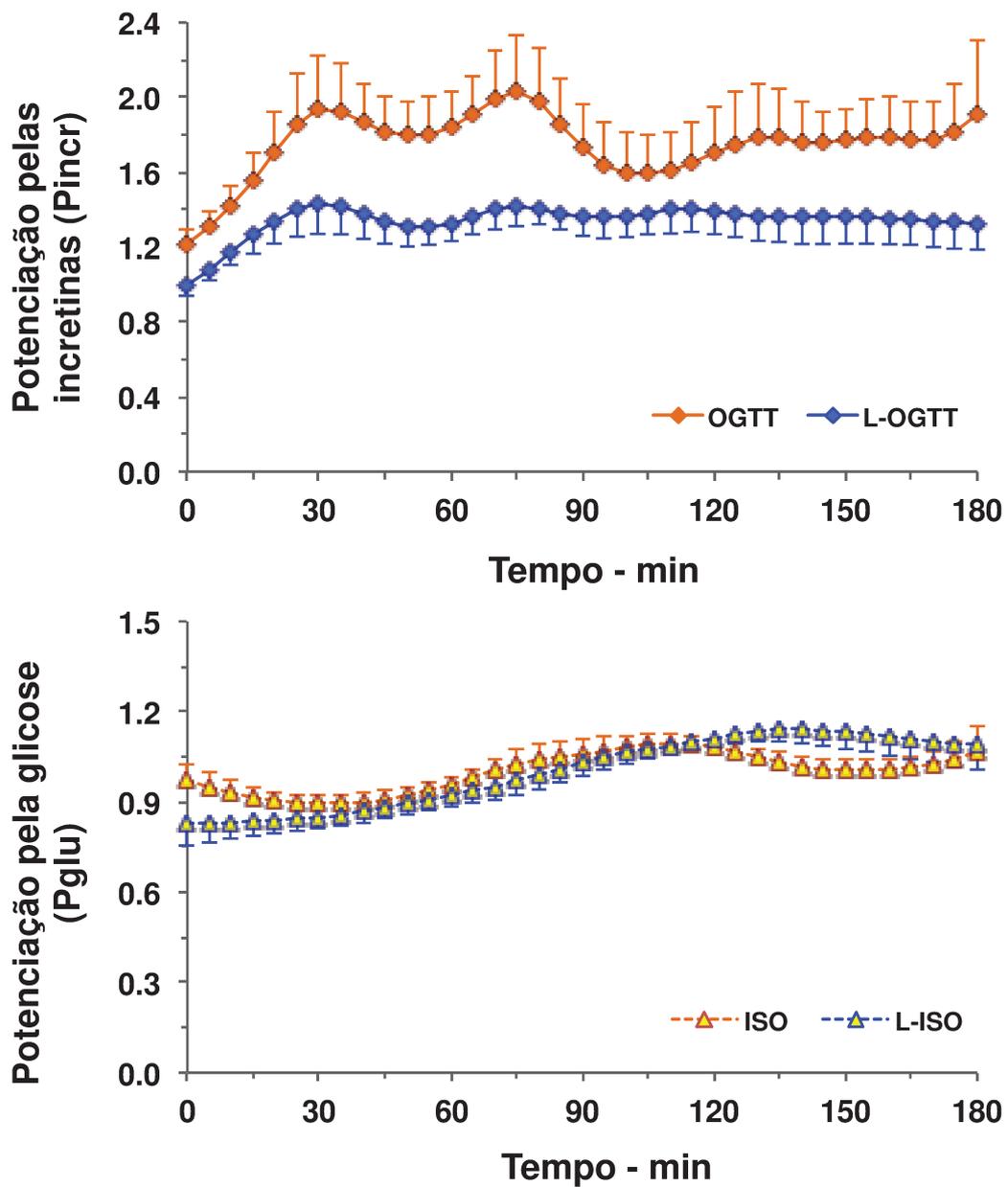
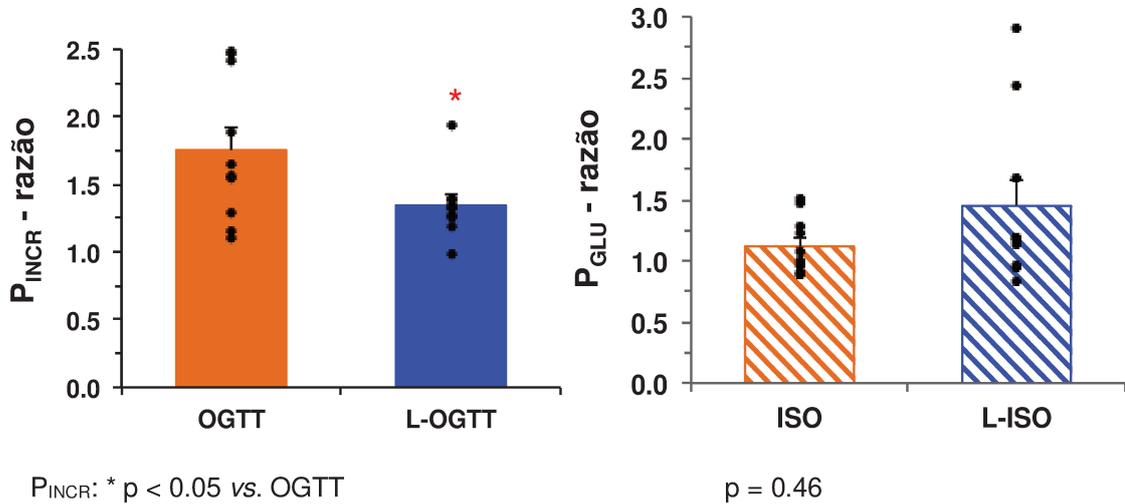


Figura 7 A e B - Média e distribuição das potenciações pelas incretinas e pela glicose dos voluntários NTG



Além dos cálculos da potenciação dada pelas incretinas através do modelo matemático (P_{INCR}), o efeito incretínico foi calculado também como a razão entre as AUCs do peptídeo-C plasmático, ou como a diferença percentual entre OGTT e ISO (Tabela 4)

Tabela 4 - Efeito incretínico no grupo NTG[§]

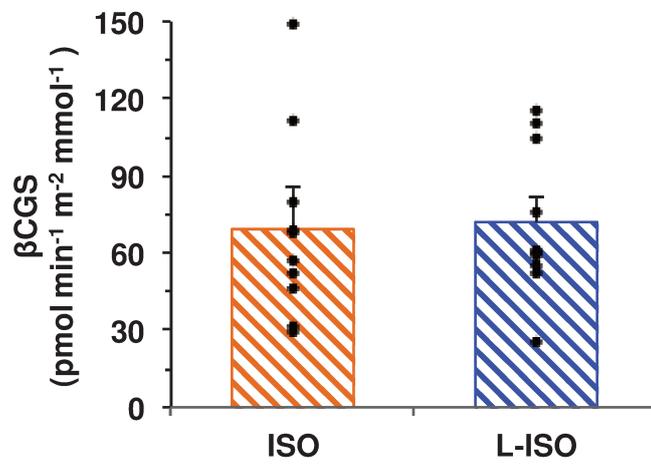
	OGTT	L-OGTT	p
AUCs peptídeo-C (razão)	1.79 [0.69]	1.41 [0.21]	0.047
TIS - EI %	44 [19]	29 [12]	0.074

[§]Resultados são mediana [Inter Quartil]

Nas **figuras 8 A e B** estão representadas as médias e os erros padrão da β -GS, que não foram alterados, e da *rate sensitivity* que aumentou após a infusão de lipídeos, e diminuiu no L-ISO em relação ao L-OGTT.

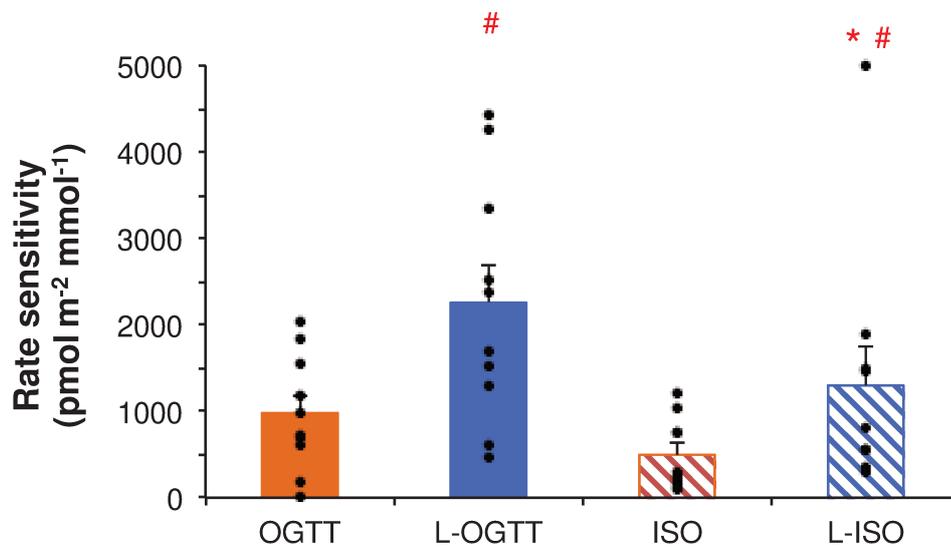
Figura 8 - Sensibilidade da célula β à glicose (A) e rate sensitivity (B) nos voluntários NTG

A



p = 0.68

B

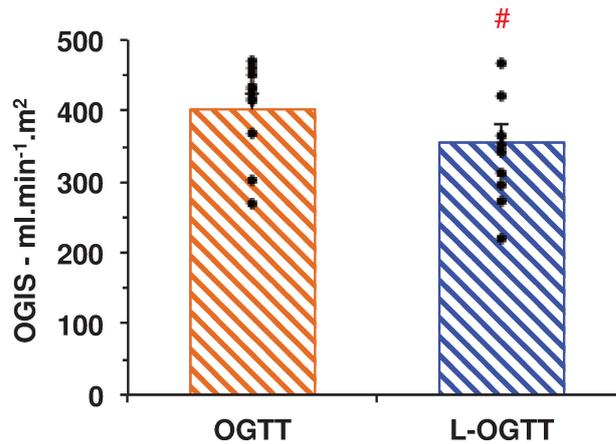


p<0.05: L-OGTT vs. OGTT e L-ISO vs. ISO; * p<0.01: L-ISO vs. L-OGTT

5. Efeito na sensibilidade à insulina

A infusão de lipídeos também induziu moderada IR durante o L-OGTT, pois o OGIS diminuiu de 402 ± 22 para 355 ± 28 $\text{ml}/\text{min}^{-1}\text{m}^{-2}$; $p=0.01$ (**Figura 9**).

Figura 9 - Sensibilidade à insulina (OGIS) dos voluntários NTG



$p = 0.01$ L-OGTT vs. OGTT

6. Respostas hormonais

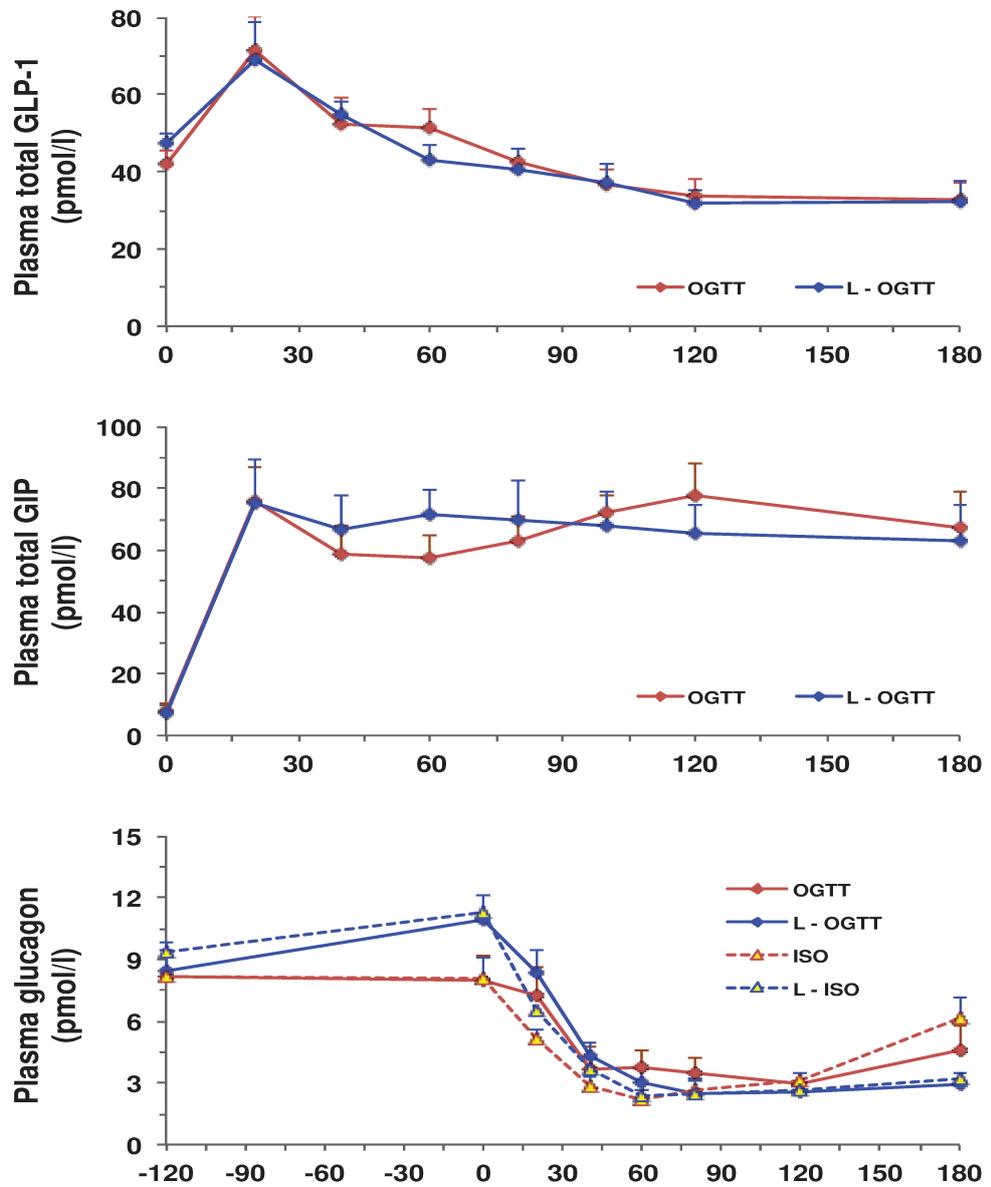
As concentrações plasmáticas do GLP-1 total, do GIP total e do glucagon, e o padrão das correspondentes curvas (*time-course*) não mudaram significativamente (**Tabela 5 e Figuras 10 A, B, C**).

Tabela 5 – AUCs dos hormônios gastrointestinais nos voluntários NTG

NTG	OGTT	ISO	L-OGTT	L-ISO	<i>p</i>
AUC-GLP-1 (pmol.L ⁻¹)	7832 ± 2159		7620 ± 2155		0.89
AUC-GIP (nmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	11.77 ± 3.09		11.59 ± 4.03		0.29
AUC-glucagon (pmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	765 ± 344	701 ± 158	685 ± 253	646 ± 170	0.82

p - ANOVA para medidas repetidas

Figura 10 - Respostas hormonais



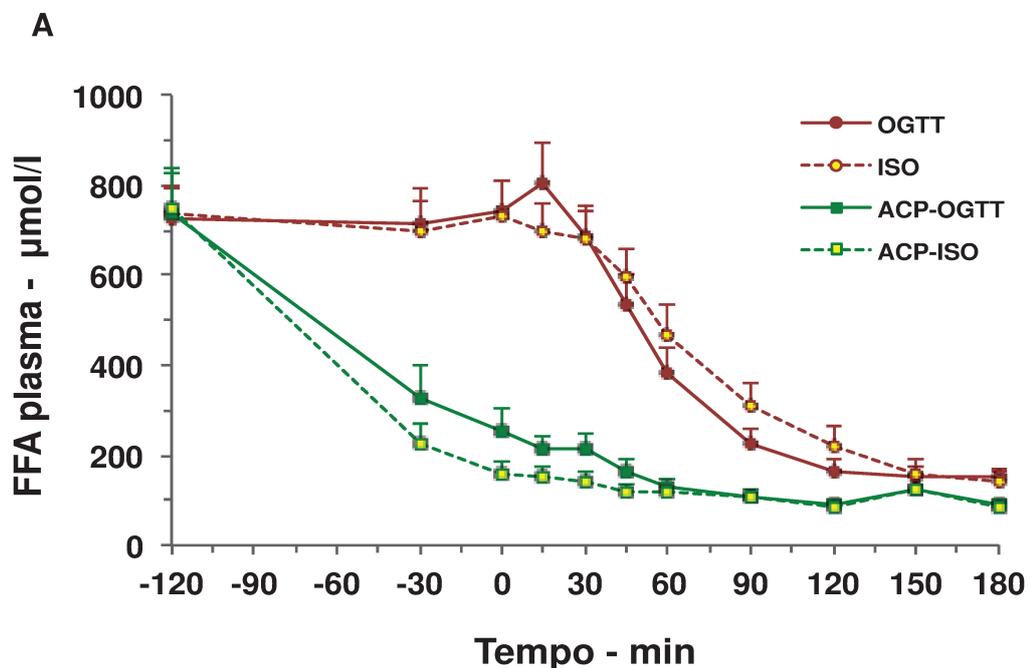
7. Correlação entre variáveis

Não houve correlação entre as variáveis nos voluntários NTG.

8. Efeitos do acipimox sobre os ácidos graxos livres (FFA) em pacientes com DM2.

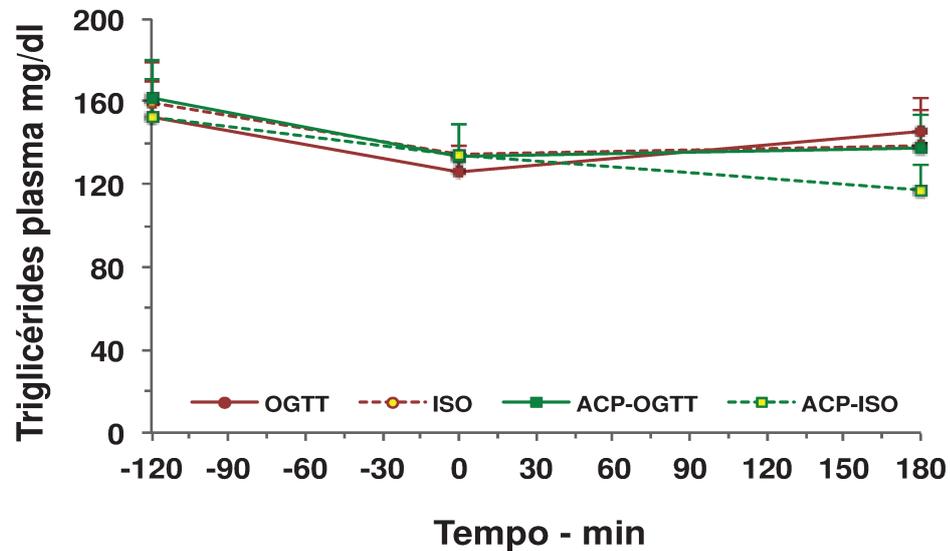
Nos pacientes com diabetes, o objetivo de diminuir os FFA plasmáticos através da administração de acipimox foi alcançado, havendo redução de $55 \pm 14\%$ na AUC após ingestão de glicose (OGTT 64.37 ± 27.46 vs. ACP-OGTT 26.48 ± 8.53 $\text{mmol.L}^{-1} \cdot 3\text{h}^{-1}$; $p=0.001$). A redução foi semelhante no estudo isoglicêmico, ACP-ISO comparado a ISO (22 ± 9 vs. 73 ± 28 $\text{mmol.L}^{-1} \cdot 3\text{h}^{-1}$, $p<0.001$). Verificamos acentuada redução dos FFA, mesmo durante as duas horas do período de jejum, sem diferença entre ACP-OGTT e ACP-ISO (26 ± 8 vs. 22 ± 9 $\text{mmol.L}^{-1} \cdot 3\text{h}^{-1}$, $p=\text{ns}$), como mostra a **Figura 11 A**. Este comportamento não foi evidenciado nas concentrações plasmáticas de triglicérides - **Figura 11 B**, que foram semelhantes nos quatro estudos, em todos os tempos. Neste grupo (DM2), os valores em jejum de FFA e TG também eram semelhantes.

Figuras 11 A e B: Concentrações dos FFA e Triglicérides nos DM2



$p<0.001$: ACP-OGTT vs. OGTT e ACP-ISO vs. ISO.

B



TG : tempo 180min $p = 0.086$

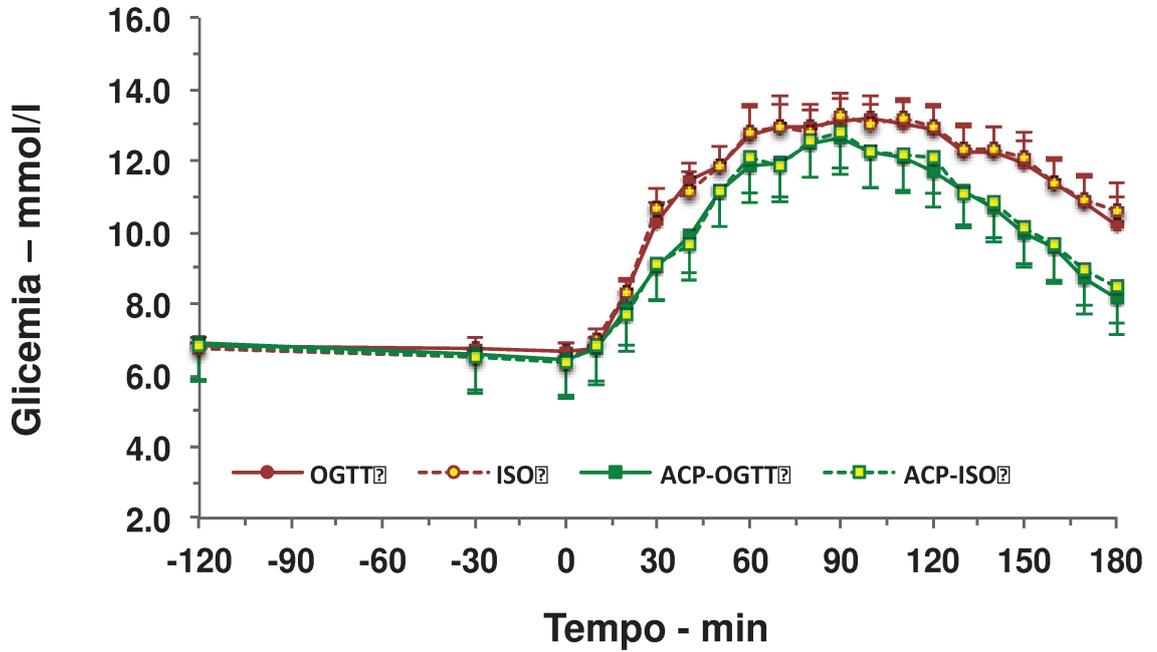
9. Efeito do acipimox na glicose, insulina e peptídeo-C plasmáticos nos pacientes com DM2.

Em jejum os pacientes apresentavam glicemias semelhantes nos quatro estudos (OGTT = 6.91 ± 0.97 ; ISO = 6.97 ± 0.91 ; ACP-OGTT = 6.78 ± 0.74 ; ACP-ISO = 6.91 ± 0.86 mmol/L). Após a ingestão de glicose, a glicemia aumentou atingindo pico máximo aos 90 minutos com valor de 12.9 mmol/L ou 232 mg/dL, e aos 180 minutos ainda apresentava valores médios acima dos valores de jejum (10.3mmol/L ou 185 mg/dL). Nos estudos ISO e ACP-ISO, as glicemias dos OGTTs foram exatamente reproduzidas através da infusão de glicose a 10% usando o algoritmo *ad hoc*.

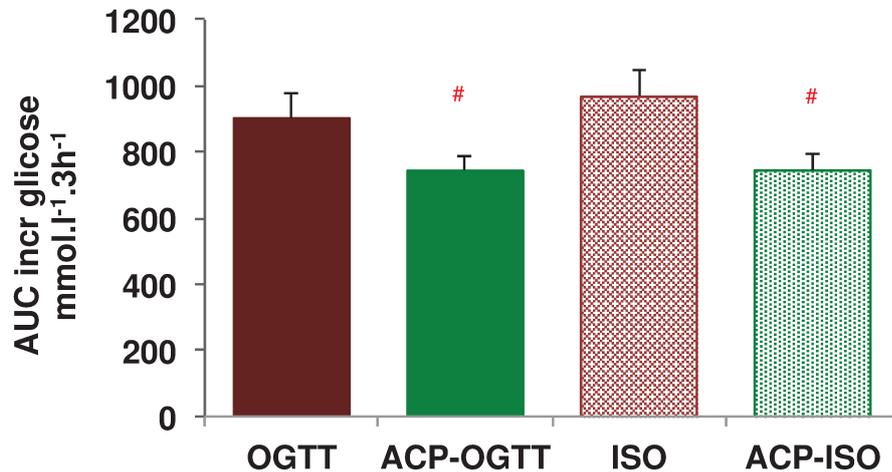
A ingestão de acipimox no período basal (Tempo -120 minutos) e após 60 minutos da ingestão de glicose, induziu discreta diminuição das glicemias conforme se observa na **Figura 12 A**. Na **Figura 12 B** e na **Tabela 6**, estão discriminadas as áreas sob as curvas, tendo ocorrido uma diminuição significativa na área incremental da glicose pelo acipimox.

Figuras 12: Curvas glicêmicas e AUCs nos pacientes com DM2

A



B



p<0.05 ACP-OGTT ou ACP-ISO vs. OGTT ou ISO

Durante o OGTT a curva insulinêmica apresentou padrão semelhante à curva glicêmica, mantendo concentrações plasmáticas, aos 180 minutos, bem superiores às de jejum. Durante o estudo isoglicêmico (ISO), a insulinemia

apresentou excursão significativamente menor que no oral, como pode-se observar na **Figura 13 A** e pelas áreas sob as curvas - **Tabela 6** e **Figura 13 B**. A ingestão de acipimox causou diminuição da insulina e do peptídeo-C plasmáticos (**Figuras 14 A e B**).

Tabela 6 - Glicose, insulina e peptídeo-C dos pacientes com DM2[§]

	OGTT	ISO	ACP-OGTT	ACP-ISO	p1
Glicemia jejum (mmol/L)	6.9 ± 0.9	6.8 ± 0.7	7.0 ± 0.9	6.9 ± 0.9	0.81
Glicemia jejum (mg/dL)	124 ± 16	1 122 ± 13	126 ± 16	124 ± 16	0.81
AUC G _{jejum} (mmol.L ⁻¹ .2h ⁻¹)	815 [112]	791 [76]	811 [85]	797 [86]	0.82
AUC G _{ogtt} (mmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	2097 ± 328	2108 ± 307	1912 ± 172	1923 ± 172	0.18
i AUC G _{ogtt} (mmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	902 ± 262	967 ± 288 *	744 ± 163 #	774 ± 173 #	0.008
Média G _{ogtt} (mmol/L)	11.8 ± 1.9	11.8 ± 1.7	10.7 ± 1.0	10.7 ± 1.0	0.14
Insulina jejum (pmol/L)	144 ± 116	117 ± 70	116 ± 58	137 ± 97	0.68
AUC Ins _{jejum} (nmol.L ⁻¹ .2h ⁻¹)	24.5 ± 20.6	19.8 ± 10.8	19.0 ± 9.4	20.4 ± 13.7	0.95
AUC Ins _{ogtt} (nmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	83.2 ± 55.0	56.9 ± 38.9 *	68.4 ± 45.7 #	47.6 ± 25.9 #*	<0.0001
AUC PC _{ogtt} (nmol.L ⁻¹ .3h ⁻¹)	493 ± 171	400 ± 135 *	449 ± 147 #	371 ± 109 *	<0.0001

[§]Resultados são médias±DP ou mediana[inter quartil] ; AUC = área sob a curva; G = glicose; Ins = insulina; PC = peptídeo-C;

i AUC = AUC incremental

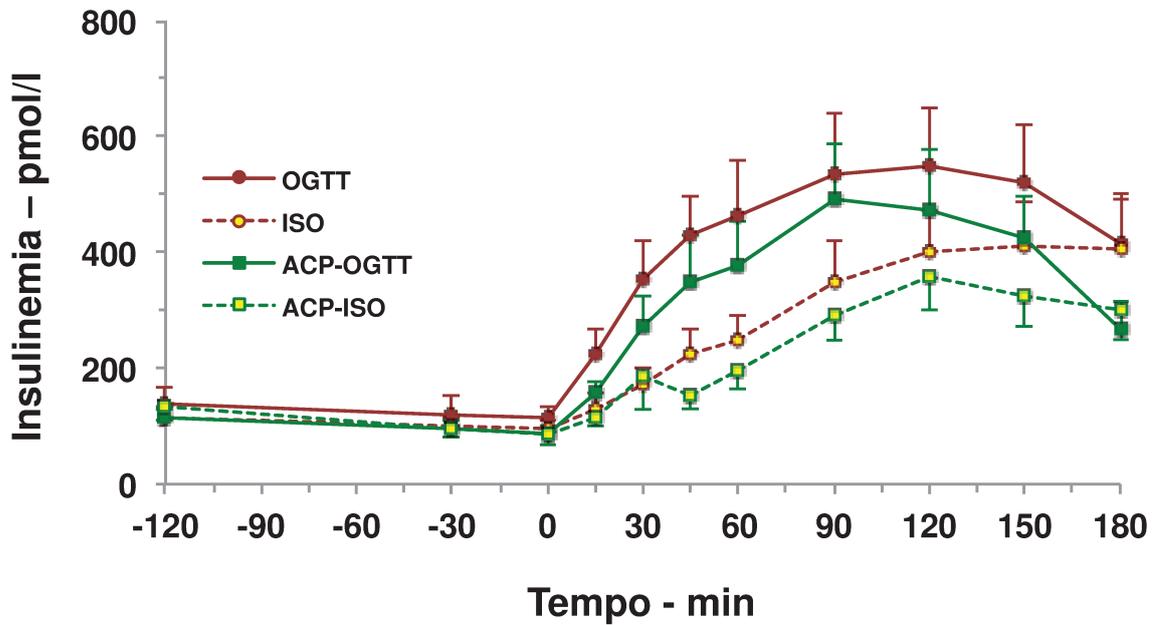
p1 - ANOVA para medidas repetidas com distribuição por postos

p <0.05 para os estudos após acipimox (ACP-OGTT ou ACP-ISO) vs. os correspondentes OGTT ou ISO;

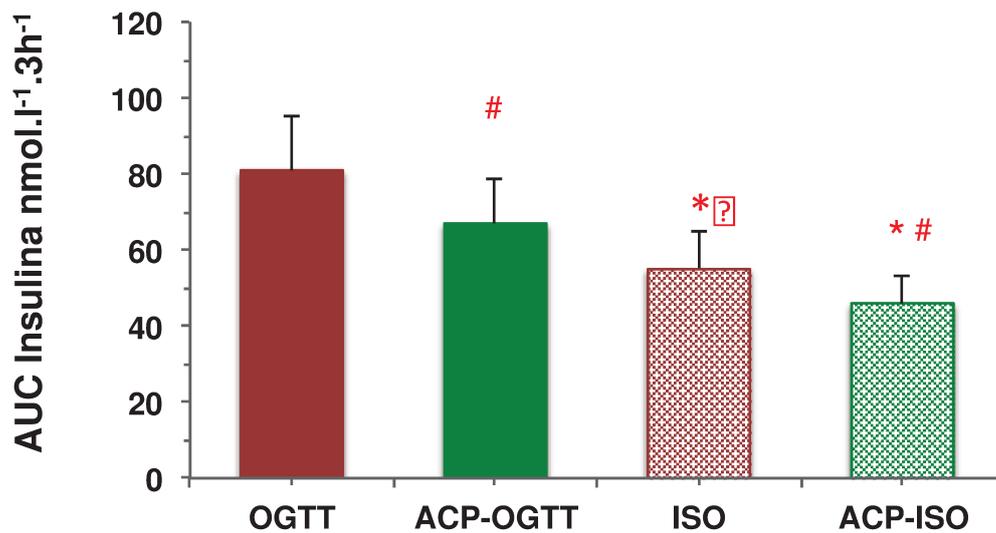
* p <0.05 para os estudos isoglicêmicos (ISO ou ACP-ISO) vs. os correspondentes OGTT e ACP-OGTT.

Figura 13 - Insulinemias e correspondentes AUCs nos DM2

A



B

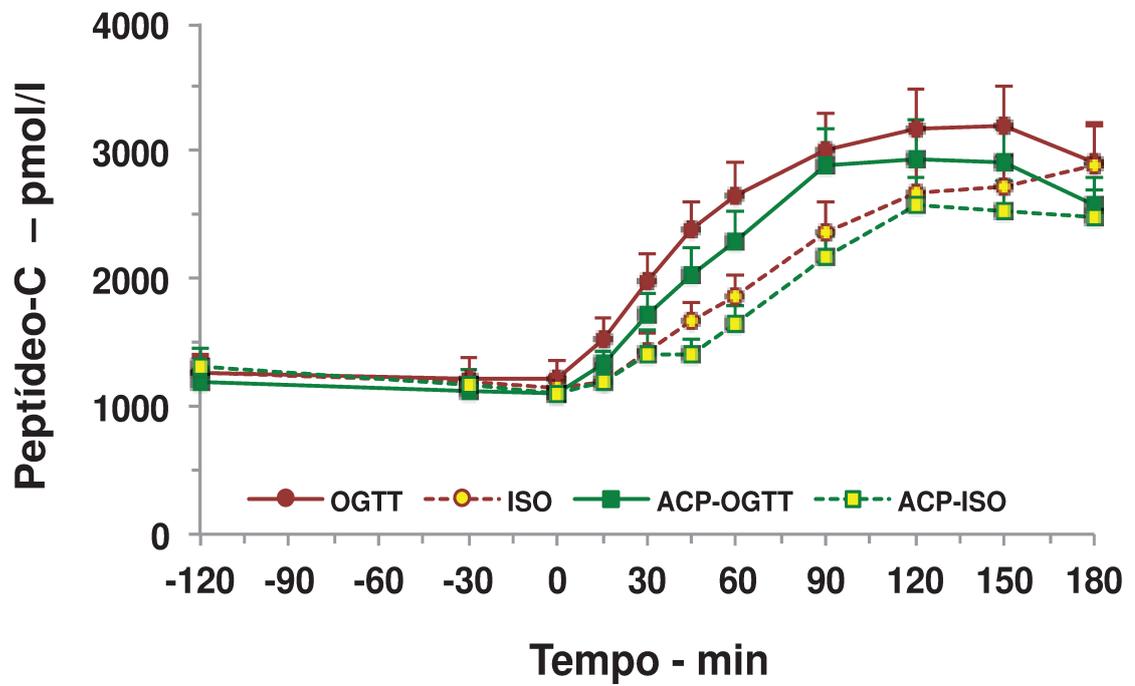


p < 0.05 ACP-OGTT vs. OGTT e ACP-ISO vs. ISO;

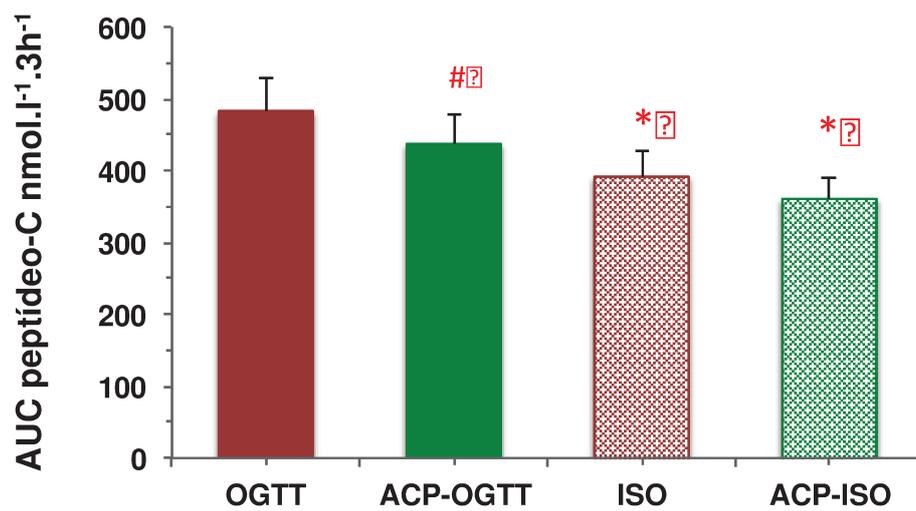
* p < 0.05 ISO vs. OGTT e ACP-ISO vs. ACP-OGTT.

Figura 14 - Curvas de Peptídeo-C e correspondentes AUCs nos DM2

A



B



$p < 0.05$ ACP-OGTT vs. OGTT; * $p < 0.05$ ISO vs. OGTT e ACP-ISO vs. ACP-OGTT.

10. Efeito do acipimox na função β celular: parâmetros derivados do modelo matemático nos DM2.

A secreção de insulina derivada do modelo matemático, TIS, como esperado, foi significativamente maior nos estudos após ingestão de glicose que nos estudos isoglicêmicos. O acipimox reduziu a secreção de insulina em resposta à ingestão de glicose e, embora a diminuição tenha sido discreta foi estatisticamente significante (**Tabela 7; Figura 15**).

Tabela 7 - Parâmetros da função da célula- β em pacientes com diabetes [§]

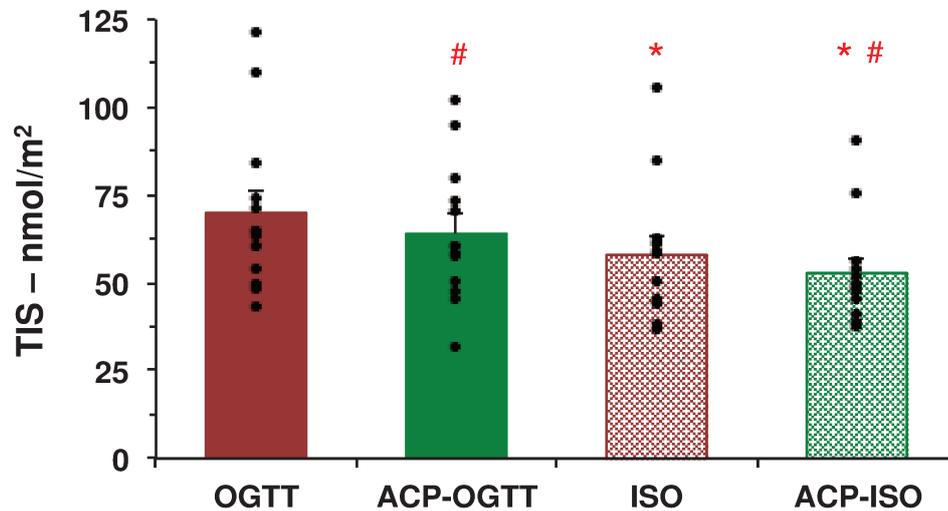
	OGTT	ISO	ACP-OGTT	ACP-ISO	p
ISR jejum ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	129 [40]	134 [39]	130 [43]	113 [53]	0.47
TIS ($\text{nmol}\cdot\text{m}^{-2}$)	64 [24]	58 [17] **	60 [26] #	49 [10] # **	0.0001
β -GS ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$)	-	26 [14]	-	29 [15]	0.24
P_{GLU} (vezes)	-	1.61 [0.82]	-	1.38 [0.50]	0.73
P_{INCR} (vezes)	1.15 [0.21]		1.10 [0.24]		0.47
Rate sensit. ($\text{pmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$)	648 [578]	0.2 [40] **	852 [1382]	0.0 [0.0] **	<0.0001

[§] Resultados são medianas [Interquartis]; ISR - *insulin secretion rate*; TIS - *total insulin secretion*; β -GS - sensibilidade da célula β à glicose; P_{GLU} - potenciação dada pela glicose; P_{INCR} - potenciação dada pelas incretinas; Rate sensit - *rate sensitivity*.

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ - Wilcoxon *signed rank test* para OGTTs vs. ISOs;

$p < 0.05$ - Wilcoxon *signed rank test* para comparação de acipimox vs. estudos controle;

Figura 15 - AUCs da secreção total de insulina nos pacientes com DM2

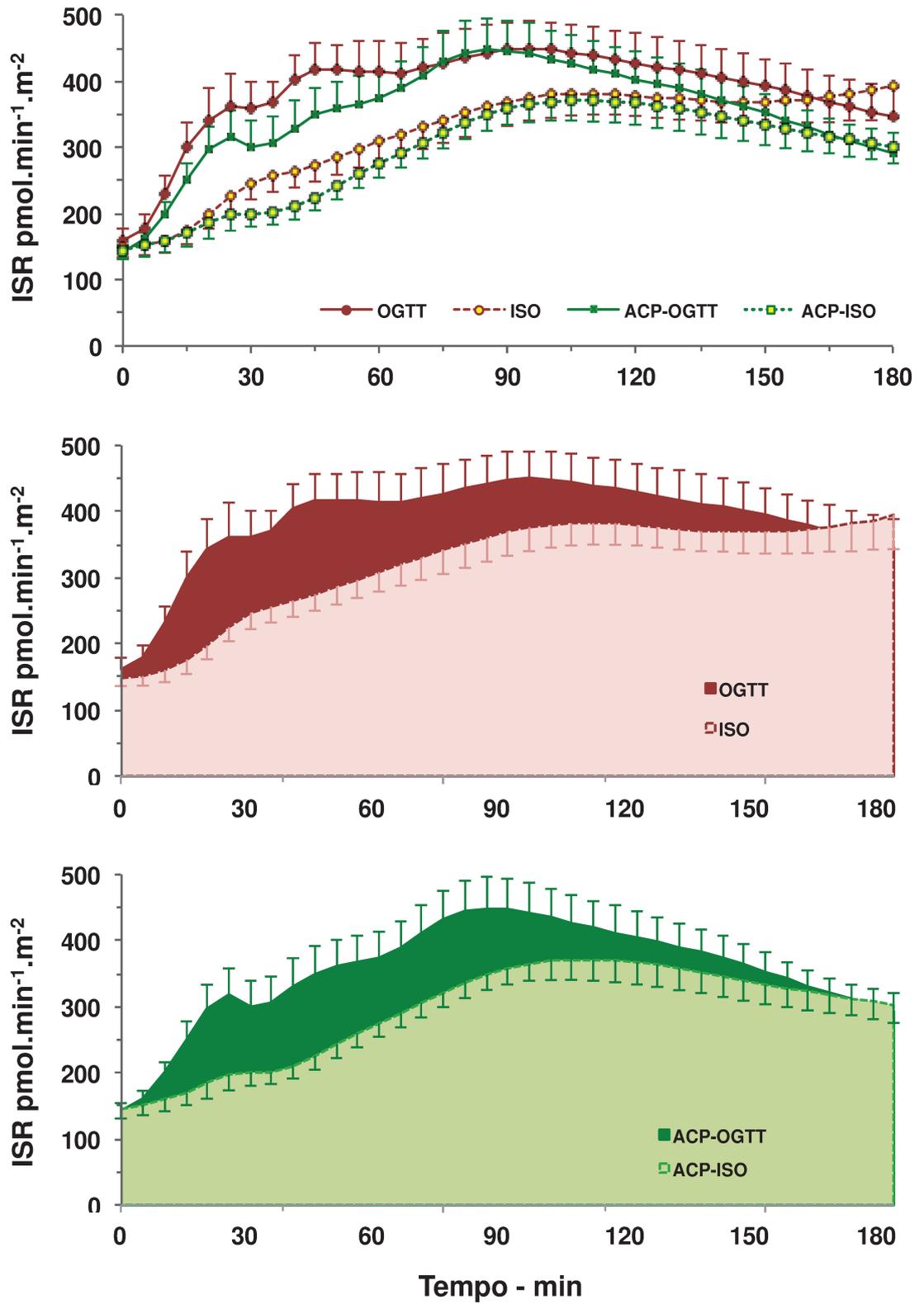


$p < 0.05$: ACP-OGTT vs. OGTT e ACP-ISO vs. ISO;

* $p < 0.01$: ISO vs. OGTT e ACP-ISO vs. ACP-OGTT.

As curvas de secreção de insulina apresentam perfis semelhantes aos do peptídeo-C e da glicemia, com valores três horas após a ingestão de glicose ainda superiores aos de jejum (**Figuras 16 A, B, C**). Nas figuras B e C, as áreas em vinho e verde representam a diferença de secreção entre os OGTTs e os estudos isoglicêmicos, *i.e.*, o efeito incretínico.

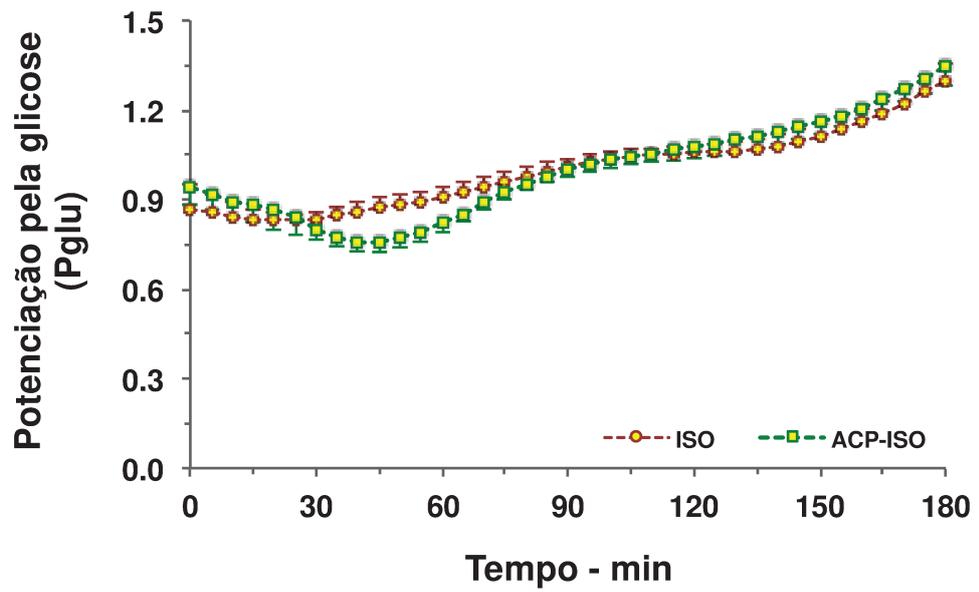
Figura 16 A, B, C - Curvas de secreção de insulina (TIS) nos DM2



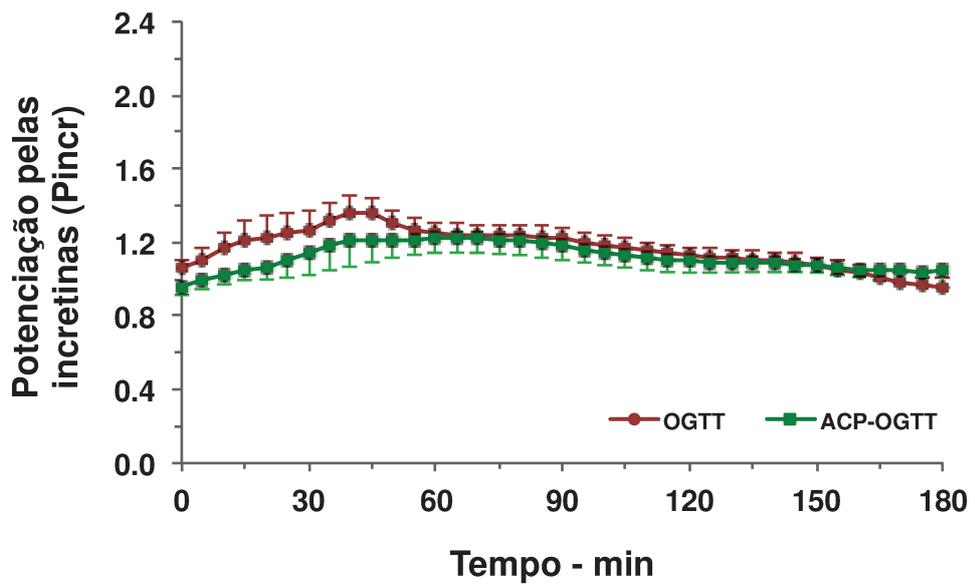
O padrão das curvas (*time-course*) da potenciação pela glicose e pelas incretinas pode ser observado nas **Figuras 17 A e B**. Não houve diferença significativa para ambas entre os estudos basais e após acipimox.

Figura 17 - Curvas de potenciação nos DM2

A



B



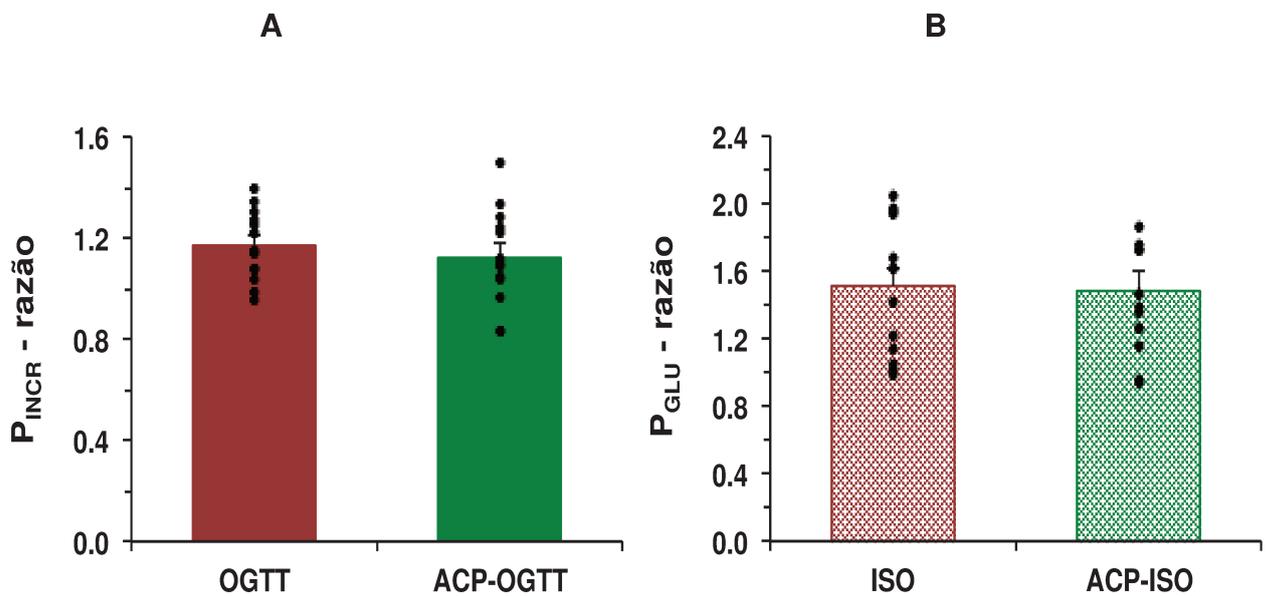
O efeito incretínico calculado como a razão entre as AUCs do peptídeo-C plasmático, ou como a diferença percentual entre OGTT e ISO ou como P_{INCR} não foi modificado pelo uso do acipimox, **Tabela 8** e **Figura 18 A**. A P_{GLU} , nas três horas após a ingestão de glicose, ou durante a infusão de glicose, também não foi modificada pelo acipimox, **Figura 18 B**.

Tabela 8 - Efeito incretínico no grupo DM2[§]

	OGTT	ACP-OGTT	p
AUCs peptídeo C (razão)	1.24 ± 0.16	1.22 ± 0.27	0.42
TIS - EI %	18 [18]	18 [24]	0.98

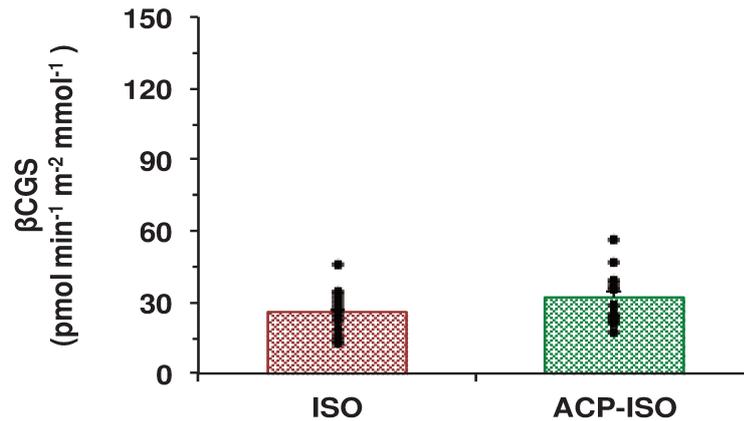
[§]Resultados são médias±DP ou mediana[inter quartil].

Figura 18 - Potenciações dadas pelas incretinas e pela glicose nos DM2



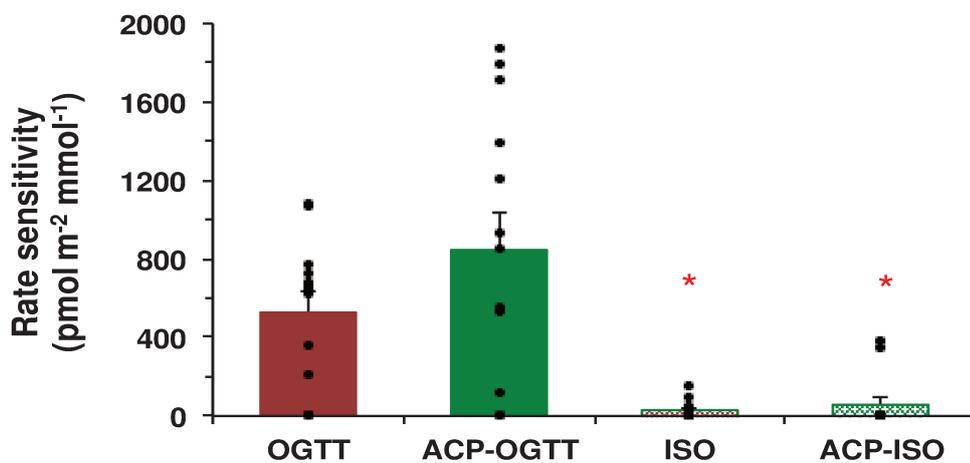
A β -GS, parâmetro que relaciona a secreção de insulina à glicemia, ou seja, o ângulo da curva dose-resposta, não se modificou significativamente após o uso de acipimox (Tabela 7; **Figura 19 A**) e os valores são aparentemente muito menores que os observados em pessoas NGT, mesmo sem compará-los estatisticamente.

Figura 19 - β -GS calculada nos estudos isoglicêmicos para o grupo DM2



O parâmetro *rate sensitivity* foi menor nos estudos ISOs comparados com os OGTTs, mas não foi modificado significativamente pela ingestão de acipimox - **Figura 20**; Tabela 7.

Figura 20 - *Rate sensitivity* no grupo DM2

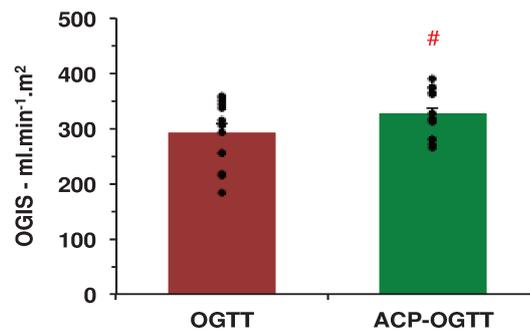


* $p < 0.0001$ vs. OGTT correspondente

11. Efeito do acipimox na sensibilidade à insulina.

A sensibilidade à insulina aumentou pelo uso de Acipimox, o valor de OGIS subiu de 355 ± 28 para 402 ± 22 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ($p=0.01$) (Tabela 1 e **Figura 21**).

Figura 21 - OGIS nos pacientes com DM2



$p = 0.01$ ACP-OGTT vs. OGTT

12. Efeito do acipimox nas respostas hormonais no grupo DM2

Os hormônios incretínicos e o glucagon não se modificaram pela administração de acipimox. Os valores plasmáticos de GIP e GLP-1 foram maiores durante os OGTTs que durante os ISOs, já que durante estes últimos não foram estimulados, mantendo os valores em jejum durante as curvas. Os valores de glucagon foram semelhantes em todos os estudos, apresentando discreto aumento em relação ao jejum, com valores máximos no tempo 60 minutos - **Tabela 9 e Figura 22**.

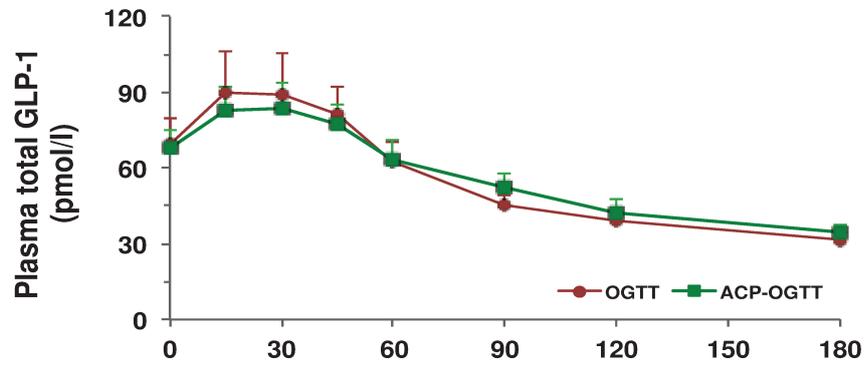
Tabela 9 - AUCs dos hormônios incretínicos e do glucagon nos DM2[§]

T2D	OGTT	ISO	ACP-OGTT	ACP-ISO
AUC GLP-1 ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	9201 ± 4307	6330 ± 2527^c	9023 ± 3191	7754 ± 3283
AUC GIP ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{3h}^{-1}$)	16.29 ± 5.51	4.13 ± 3.01^b	16.92 ± 7.39	3.63 ± 2.40^b
AUC glucagon ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{3h}^{-1}$)	4.47 ± 0.63	4.56 ± 0.97	4.58 ± 0.92	4.49 ± 0.91

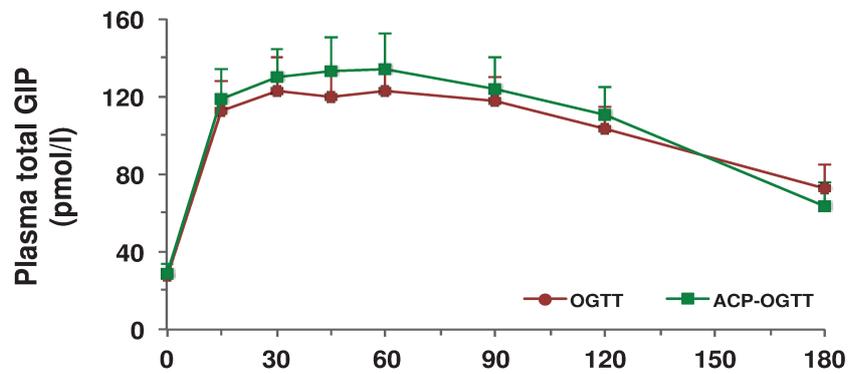
[§]Resultados são médias \pm DP; ^b, ^c – $p < 0.01$; <0.05 - Wilcoxon *signed rank teste* para ISO ou ACP-ISO vs. correspondente OGTT e ACP-OGTT.

Figuras 22 - Curvas hormonais durante os OGTTs nos pacientes DM2

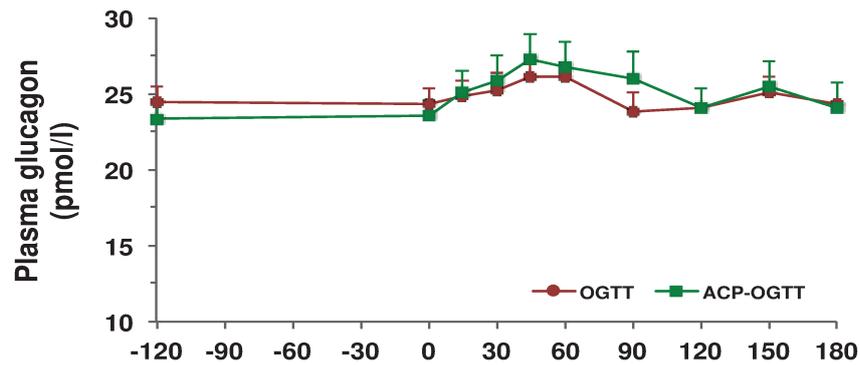
A



B



C



13. Correlação entre variáveis

As mudanças na ISR foram diretamente relacionadas às mudanças das concentrações dos FFA ($\rho = 0.62$, $p = 0.03$) e indiretamente às mudanças do OGIS ($\rho = -0.73$, $p = 0.01$).

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a manipulação aguda dos FFA produz efeitos diversos sobre a secreção de insulina entre os voluntários NTG e DM2. Enquanto em indivíduos NTG a infusão de lipídeos causou uma marcada diminuição da potenciação induzida pelas incretinas, nos pacientes diabéticos não houve melhora do EI após a diminuição aguda dos FFA plasmáticos. A infusão de lipídeos aumentou a glicemia nos voluntários NTG, significativamente, a partir de 120 minutos após a ingestão de glicose. O aumento de FFA e triglicérides foi significativo em todo o período experimental. Conjuntamente, maiores glicemias e FFA estimularam a secreção de insulina e os FFA diminuíram a sensibilidade à insulina, achado compatível com estudos anteriores (96, 101, 119, 138). A infusão de lipídeos não modificou a potenciação pela glicose, mas ocorreu uma diminuição no EI, demonstrado pelo cálculo do P_{INCR} e pelo cálculo da razão entre as AUC_S do peptídeo-C. Portanto, nesse grupo o aumento agudo dos FFA provocou todas as mudanças metabólicas esperadas (91, 113, 115, 132), ou seja, leve deterioração da sensibilidade à insulina e conseqüentemente, da tolerância à glicose, aumento da secreção de insulina e melhora da primeira fase da resposta secretória (*rate sensitivity*) sem alterar a sensibilidade da célula β à glicose. Por outro lado, os efeitos dos FFA sobre o EI não haviam sido estudados anteriormente.

Ao contrário, no grupo DM2, a administração de acipimox, provocou redução significativa dos FFA, da glicemia e da insulinemia, assim como melhora da sensibilidade à insulina. A β -GS e a potenciação pela glicose não foram alteradas de modo significativo. A secreção total de insulina, TIS, foi menor nos estudos isoglicêmicos comparada aos orais, e menor após acipimox comparado ao TOTG controle. A potenciação da secreção pelas incretinas, P_{INCR} , foi aparentemente menor que nos voluntários saudáveis e com perfil achatado da curva e não foi modificado pela redução dos FFA. Ressalta-se que neste estudo a TIS foi obtida pelo modelo matemático considerando os valores de peptídeo-C, que não sofre extração hepática tal como a insulina. Portanto, a diferença de TIS entre diabéticos e saudáveis, ou entre os estudos, não foi devida a diferenças no *clearance* de insulina.

De interesse, observamos os efeitos da manipulação dos FFA tanto nos estudos orais quanto nos EV, o que não sugere um papel do eixo entero - insular na resposta insulínica. Apoiando essa afirmação, nem a infusão de lipídeos, nem o acipimox foram associados com mudanças nos níveis plasmáticos do glucagon, GLP-1 ou GIP. Portanto os resultados não se devem a efeito dos FFA sobre a secreção de incretinas. Estes resultados estão em desacordo com aqueles de Ranganath em mulheres obesas (83, 85), provavelmente pela população do estudo ter sido diferente.

Todos esses achados nos possibilitam concluir que o impacto dos FFA no efeito incretínico é essencialmente dependente da função da célula β , ou seja, o seu aumento pode prejudicar o EI numa célula β normal, mas a sua diminuição não é capaz de resgatar o efeito incretínico numa célula β disfuncional. Claramente, essa conclusão só se aplica às mudanças agudas dos FFA, nas condições criadas neste protocolo, e demonstram o conceito de que os FFA influenciam o efeito incretínico em humanos saudáveis. A longo prazo, o impacto dos FFA na célula β pode ser variável, assim como parece diferir nos pacientes com diabetes que apresentam um comprometimento importante da função β celular. Destaque-se que o principal parâmetro para avaliar a função da célula β é a β -GS, ou seja, a quantidade de secreção em relação aos níveis glicêmicos. Nos pacientes estudados este parâmetro era muito menor que nos voluntários com tolerância normal à glicose. Merovic e cols. adicionaram acipimox na terceira semana de tratamento com dapagliflozina em pacientes com DM2. Ao contrário dos resultados do presente estudo, ocorreu melhora da *β -cell glucose sensitivity* e aumento da secreção de insulina, para níveis além dos obtidos com a dapagliflozina por si só. Não obstante, esses resultados poderiam ser consequência de maior alívio da glicotoxicidade na terceira semana de tratamento pela dapagliflozina - três semanas ao invés de duas semanas (139).

Com relação aos níveis plasmáticos das incretinas, a literatura mostra resultados discrepantes. Uma das razões é a dosagem do GLP-1, que é complexa e obtida com uma variedade de métodos e protocolos experimentais. Nos ensaios há reações cruzadas do GLP-1 com suas diferentes isoformas, sendo muito variáveis a especificidade e a sensibilidade dos kits comercialmente disponíveis (140). Os valores publicados em estudos são consideravelmente heterogêneos. Como ele é rapidamente degradado, indicam-se kits que medem o GLP-1 total para avaliar a sua secreção, como usado neste estudo. Estes fatores são importantes para justificar os

resultados controversos das concentrações plasmáticas das incretinas em diferentes grupos de diabéticos, NTG, ITG e obesos (39, 60, 141). GLP-1 e GIP podem ser regulados não apenas pelos nutrientes ingeridos, mas por outros fatores, tais como níveis de glucagon, gravidade do diabetes e velocidade do esvaziamento gástrico, como previamente sugerido (141).

As concentrações plasmáticas de glucagon foram similares em todos os estudos. A especificidade dos ensaios para o glucagon também é um problema, pois tem sequências de aminoácidos semelhantes às de outros peptídeos endógenos. Além do que, sua concentração basal é muito baixa, em torno de 10pmol/L, ou menos. É a concentração basal que diferencia os ensaios. Ensaio com sensibilidade > 5 pmol/L são inadequados para a completa caracterização da secreção do glucagon (142), o que não se aplica aos kits que utilizamos. A diferença entre os kits utilizados em Pisa e Campinas para dosar o glucagon e incretinas não interferiu nas nossas conclusões, pois as comparações foram feitas apenas intra-grupos. As dosagens dos quatro estudos de cada participante foram realizadas concomitantemente em um único ensaio, minimizando erros devidos a diferenças inter-ensaios. Nos pacientes diabéticos a glucagonemia de jejum foi alta, e não houve supressão com a ingestão de glicose ou de acipimox, o que vem ao encontro com achados de outros estudos (64, 143, 144). Uma correlação inversa entre sensibilidade à insulina e glucagon em jejum, previamente descrita, sugere que a IR esteja presente ao nível de células α pancreáticas (143, 144). Conforme esperado, nos voluntários NTG os valores de glucagon foram suprimidos durante o TOTG.

Sabemos que o aumento dos ácidos graxos é fator de risco para o DM2, através do seu efeito no fígado e músculo esquelético provocando IR (145). Outras evidências, também tem mostrado efeitos negativos na célula β , mas não agudamente, quando os FFA estimulam a secreção de insulina (107, 146). No grupo DM2 do presente estudo houve modificação da insulinemia após o acipimox durante TOTG, discreta, talvez porque os níveis de triglicérides no período basal não eram muito elevados e conseqüentemente a sua diminuição foi pequena. No estudo de Qvigstad foram incluídos pacientes DM2 com hipertrigliceridemia grave ocorrendo discreta diminuição da secreção de insulina após infusão de lipídeos durante *clamp* hiperglicêmico, mas houve discreto aumento nos NTG. Em ambos, o pré-tratamento com acipimox diminuiu os FFA, mas não modificou a secreção de insulina em NTG e

naqueles pacientes DM2 com pior controle da glicemia (maior nível de HbA_{1c}). Entretanto houve um pequeno aumento da secreção de insulina nos DM2 com um melhor controle glicêmico prévio (137). É interessante observar que os indivíduos diabéticos daquele estudo, em outro momento, submetidos a dieta *low-fat* por três dias, não apresentaram o aumento da secreção insulínica em resposta à infusão de lipídeos durante *clamp* hiperglicêmico precedido de acipimox. Esses dados sugerem que o aumento crônico de FFA, associado com pior controle glicêmico, pode inibir tonicamente a secreção de insulina em DM2.

Em teoria, o aumento da tolerância à glicose pelo acipimox pode resultar da melhora da sensibilidade à insulina e/ou da secreção hormonal. Em indivíduos com tolerância normal à glicose e história familiar de DM2, o uso crônico de acipimox induziu aumento da sensibilidade à insulina tanto periférica (músculo), quanto hepática, melhorou a tolerância à glicose, sem mudanças na secreção (147). No presente estudo, ocorreu diminuição da secreção de insulina em pacientes diabéticos, provavelmente secundária à melhora da sensibilidade à insulina. Ao contrário, o aumento da secreção de insulina nos indivíduos NTG, nos levou a inferir que os FFA induzem ao aumento da resposta insulínica em indivíduos não diabéticos e sem dislipidemia, mas não em DM2 com ou sem hipertrigliceridemia. Paralelamente, nos NTG a glicemia aumentou, demonstrando uma inadequada compensação da resistência à insulina observada (redução do OGIS). De fato, o aumento prolongado dos FFA, frequentemente causam a diminuição da secreção de insulina, aumento da IR periférica e da produção hepática de glicose (106, 119, 121). Por outro lado, em indivíduos normais a elevação por 48 horas dos níveis de FFA potencializou a secreção de insulina estimulada pela glicose e inibiu sua captação periférica, devido a resistência à insulina transitória (119). Pode-se especular que um aumento compensatório da secreção de insulina em resposta à IR não ocorra no diabetes. No presente estudo, este incremento da secreção de insulina foi inadequado mesmo nos indivíduos saudáveis, visto que neles ocorreu aumento da glicemia.

Outro aspecto a ser mencionado quando se trata de DM2, é que provavelmente há diferentes interações (e respostas) entre os lipídeos e a célula β , devido à própria heterogeneidade genética da doença. Conforme revisto por Giacca e cols., vários motivos podem explicar os resultados discordantes das variações dos FFA na função da célula β , como exemplo, diferenças nos protocolos experimentais, na duração da infusão dos lipídeos e níveis de glicose. Outro dado é a predisposição

genética afetando a resposta da célula β aos FFA, a exemplo de indivíduos com tolerância normal à glicose e diferentes respostas à prolongada exposição aos FFA de acordo com sua história familiar de DM2 (148). Aqueles com história familiar positiva para DM2 e exposição prolongada aos FFA exibiram GSIS (*glucose stimulated insulin secretion*) menor. Além disso, pessoas francamente diabéticas não demonstraram deterioração da secreção induzida por lipídeos, talvez porque sua função β -celular já esteja profundamente comprometida (121, 148). Esta observação é compatível com nossos resultados relacionados ao EI em pessoas com diabetes.

A hiperglicemia crônica provoca uma *down-regulation* dos receptores incretínicos na célula β , explicando em parte sua disfunção. Além disto, a hiperglicemia agudamente reduziu o receptor de GLP-1 e aumentou receptor de GIP em ratos, durante *clamp* hiperglicêmico por 96 horas (72). Mas estudos *in vivo* em ratos submetidos a dieta com alto teor de gordura, e *in vitro*, em ilhotas de humanos não diabéticos, levantam a hipótese de que, independentemente da glicotoxicidade, a lipotoxicidade prejudica a resposta da célula β às incretinas (73, 126). E que essa diminuição de sensibilidade às incretinas, provavelmente seja um evento precoce na patogênese do DM2 em pessoas obesas, contribuindo, ao invés de ser consequência de uma disfunção mais generalizada da célula β . O sofisticado estudo de Hodson e cols., utilizando imagem de ilhotas humanas, mostrou que as *connexin 36* (Cx36), são importantes para a secreção de insulina induzida pelas incretinas, visto que, através delas o GLP-1 sincroniza o rápido recrutamento das células β para a secreção de insulina em resposta à glicose. Induz assim, uma rápida propagação da sinalização de cálcio durante o estímulo com glicose, e esta ação é fortemente impedida pela adição de palmitato à cultura, que reduz a expressão de Cx36 e a atividade secretória coordenada ao GLP-1 e GIP (126).

Com relação aos mecanismos moleculares que fundamentam a apoptose lipotóxica, uma hipótese é que nas células β os PPAR β/δ exercem um papel protetor. Estudos *in vitro* com células INS-1 (células de insulinoma em cultura) e ilhotas de ratos tratadas com palmitato, revelaram diminuição da expressão do GLP-1R, enquanto que o tratamento com agonista dos PPAR β/δ reverteu esse efeito causando uma *up-regulation* da expressão do GLP-1R, prevenindo assim a lipoapoptose das células β , melhorando sua função e restaurando a GSIS (149).

Em paralelo com a disfunção e redução da massa das células β , a diminuição da expressão da proteína GPR40, um receptor de FFA nas células

pancreáticas, ou sua *down-regulation* pelos FFA, pode contribuir para a ação incretínica diminuída observada no grupo DM2 do presente trabalho nos testes controles. Notadamente, o grupo DM2 apresentava uma combinação de FFA e glicemia elevados, o que parece ser sinergicamente tóxica para as células pancreáticas (148). Altas concentrações de glicose e FFA fazem *down-regulation* da expressão da GPR40 em todas as células da ilhota, β , α , γ , e diminuem a secreção de insulina induzida pela glicose e pelo palmitato em ilhotas de ratos (150). GPR40 é altamente expressa em ilhotas de ratos jovens, normoglicêmicos, hiperlipidêmicos e pré-diabéticos ZDF (fa/fa), mesmo antes do desenvolvimento do diabetes, provavelmente contribuindo para uma hipersecreção de insulina e glucagon (150). Uma similar diminuição da secreção de insulina foi observada em ilhotas humanas expostas por 48 horas ao palmitato ou ao oleato (151), embora o palmitato seja um ácido graxo saturado e o oleato seja monoinsaturado. Mecanismos crônicos podem envolver aumento de esterificação de ácidos graxos e ativação de *stress* do retículo endoplasmático nas células β (148, 127). Assim, uma série de mecanismos podem atuar a esse favor, quais sejam: hiperlipidemia associada ou não à hiperglicemia causando *down-regulation* do GLP-1R, diminuição do recrutamento sincronizado das células β em resposta ao GLP-1; hiperlipidemia associada ou não à hiperglicemia levando à *down-regulation* da expressão da GPR40; complexos mecanismos da lipotoxicidade não totalmente conhecidos, que alteram múltiplos pontos da secreção de insulina com diminuição da GSIS, aumento do *stress* oxidativo e do retículo endoplasmático, sinalização pró-apoptótica, inflamação das ilhotas, etc; *down-regulation* dos receptores da insulina na própria célula β que diminui a secreção insulina, a proliferação e sobrevivência das células β e todos os efeitos do GLP-1 na célula β (125, 126,150,152,153). O ácido palmítico (cadeia longa, saturado) é considerado lipotóxico vs. ácidos oléico e DHA, docosohexaenóico (mono ou polinsaturados) possuem efeito protetor por diminuir o *stress* oxidativo e do retículo endoplasmático e apoptose da célula β (154). A solução lipídica do presente estudo incluiu ácidos graxos saturados e polinsaturados, como na dieta, o que induziu diminuição da potenciação pelas incretinas. Quais concentrações e quais lipídeos podem ser benéficos e qual via de administração é questão ainda a ser respondida no futuro.

Enquanto esses mecanismos, individualmente ou em conjunto, podem embasar o efeito do aumento dos FFA que induzimos nos voluntários NTG, um papel para a leve, porém crônica elevação de FFA, comumente encontrada em pacientes com DM2, na perda do efeito incretínico permanece inconclusiva. Pode-se fazer a hipótese a partir dos resultados do presente estudo e de estudos publicados em DM2, ITG e NTG obesos, de que uma implicação do aumento crônico de FFA seria uma contribuição para o diabetes, tanto por diminuir a sensibilidade à insulina, quanto por prejudicar a sua secreção compensatória. Estes estudos sugerem uma diminuição da “tolerância” aos FFA existindo antes mesmo da deterioração da homeostase da glicose na história natural do DM2 (106, 123). Com relação aos tipos de gorduras, todas elas (saturada, monoinsaturada ou polinsaturada) quando ingeridas por mais de 30 horas, induziram diminuição do *clearance* de insulina em humanos. Apenas a gordura saturada provocou IR e diminuição do *Disposition Index* (DI), ao passo que a gordura polinsaturada reduziu a IR e diminuiu a GSIS, sem alterar o DI, sugerindo uma redução compensatória da secreção de insulina (155). É possível que os ácidos graxos de cadeia longa tenham um potencial diabetogênico durante uma superexposição, e, a duração, a composição dos FFA e a magnitude da exposição tecidual são provavelmente fatores importantes para o desenvolvimento da lipotoxicidade (156). Porém, é possível que os FFA mono/polinsaturados exerçam um efeito protetor diminuindo o *stress* oxidativo e do retículo endoplasmático e apoptose da célula β (154). No entanto, em humanos, trabalhos avaliando respostas lipotóxicas dos vários tipos de FFA, dose e tempo dependentes, *in vivo*, até hoje não foram adequadamente realizados.

As concentrações inalteradas dos hormônios incretínicos durante a manipulação dos FFA nestes voluntários, implica que uma diminuição no EI, induzida em saudáveis ou espontânea em diabéticos, pode ser considerado como algum grau de resistência celular às incretinas como sugerido por Tura e cols. (157).

Num estudo recente, a eficácia da liraglutida em pacientes japoneses com DM2 foi inversamente relacionada aos triglicérides e diretamente ao peptídeo-C plasmáticos basais (158). Assim, é de suma importância entender a interação lipídeos/glicose na secreção de insulina e no controle da dislipidemia e da IR para a preservação da função da célula β e conseqüente resposta terapêutica.

Parry e cols., sugerem que os hormônios incretínicos não parecem interceder no controle glicêmico de adultos jovens saudáveis, após um balanço

energético aumentado a curto prazo (sete dias). Embora tenha ocorrido deterioração da tolerância à glicose em face de maior insulinemia, as concentrações de GLP-1 e GIP não se modificaram (159). Ainda que as concentrações das incretinas não tenham se modificado, tal como no presente estudo, este fato não implica que o EI não tenha sido prejudicado, pois os autores não o avaliaram.

A metformina promove aumento no GLP-1 total e ativo estimulado pela dieta. Um estudo mostrou que quando ela é combinada com a sitagliptina, um inibidor da DPP-IV (iDPP-IV), a concentração do GLP-1 foi maior do que observada com o iDPP-IV sozinho (160) por aumento da secreção das incretinas, mas o efeito incretínico não foi avaliado. No presente estudo, mesmo com a suspensão da metformina dois dias antes dos testes não podemos descartar que as concentrações de GLP-1 tenham sido afetadas por esse tipo de tratamento. Porém o EI nos estudos com acipimox foi semelhante aos estudos controle, nos pacientes pré-tratados com metformina ou não. Por outro lado, é pertinente recordar que a perda do EI em pacientes com DM2 pode não ser revertida pelo tratamento crônico com iDPP-IV ou metformina (82, 161).

Estes resultados são compatíveis com o estudo RISC que incluiu 1267 indivíduos não diabéticos na *cohort* inicial, e 1040 participantes na avaliação após três anos, quando alguns haviam progredido para IFG (diminuição da tolerância à glicose em jejum) ou ITG ou DM2 (162). Neste estudo, os níveis de FFA em jejum eram diretamente associados à secreção de insulina (ISR) e à redução da ação insulínica (sensibilidade à insulina), mais elevados em descendentes de diabéticos, mas não interferiam na β -GS, que é o principal determinante da tolerância à glicose. Por outro lado, os níveis basais de FFA não foram preditores independentes da diminuição da tolerância à glicose no decorrer de três anos, ao contrário do verificado em índios PIMA, em quem os valores basais de FFA foram fatores preditivos para diabetes ao longo de quatro anos (163). O valor preditivo dos FFA endógenos para o desenvolvimento de diabetes é bem controverso, pois análise posterior do estudo com os PIMA não o confirmou na população inteira. Os FFA cronicamente aumentados foram nocivos para a capacidade secretória de insulina apenas nos PIMA com ITG (164). Uma segunda análise do estudo *Medical Research Council Ely Study*, demonstrou que FFA em jejum mais elevados foram associados a maior risco de evolução para ITG ou diabetes após 5,7 anos em população adulta (165), ao contrário

da análise prévia *cross sectional* da mesma população de estudo incluindo os voluntários com ITG (165, 166). Em nenhum destes outros estudos, a β -GS foi avaliada e tampouco o efeito incretínico. Alguns estudos recentes sugerem "remissão do diabetes" após dieta hipocalórica e cirurgia bariátrica buscando explicação para o controle do diabetes (167). Deve-se, porém, considerar que não há uma definição consensual para "remissão ou cura do diabetes", pois tanto o método utilizado na avaliação da secreção, o valor de corte da HbA1c, assim como a duração do controle são parâmetros importantes. Desta forma foram sugeridas definições de remissão parcial, completa e prolongada por Buse e colaboradores (168).

Em nosso estudo experimental, procuramos dissecar características importantes da secreção de insulina, efeito incretínico e β -GS, através da manipulação aguda das concentrações de FFA. O efeito incretínico diminuído e a β -GS preservada, no caso dos participantes com NTG do presente estudo, poderia sugerir que os FFA aumentados exerçam efeito lipotóxico cronicamente, entretanto trata-se de pequeno grupo e estudo transversal.

Limitações e importância da pesquisa

Os estudos foram realizados em dois centros e os grupos participantes tinham fenótipos diferentes. O grupo controle era composto por indivíduos com NTG e o grupo de diabéticos representa o típico paciente com DM2 ambulatorial. Portanto, não foi programada uma comparação entre os mesmos e sim comparações intra-grupo. A maior limitação no nosso entendimento seria o tamanho amostral, não permitindo avaliar as respostas experimentais em diabéticos com diferentes características, tais como sexo, duração da doença, grau de obesidade e entre virgens de tratamento ou sob terapia com metformina e grau de hipertrigliceridemia. No entanto, o nosso principal objetivo - efeito incretínico - foi bastante diferente após a infusão de lipídeos entre os NTG e muito semelhante nos diabéticos após a redução aguda dos FFA. O inconveniente das dosagens realizadas em diferentes centros foi minimizado pela dosagem simultânea dos quatro estudos de cada voluntário. Por outro lado, este é o primeiro estudo a avaliar a ação dos FFA sobre o efeito incretínico em humanos com um protocolo adequado e complexo. A diminuição do EI pelo aumento dos FFA pode ser ítem importante da fisiopatologia do DM2. Além disso, o uso do modelo matemático desenvolvido por Andrea Mari e Andrea Tura, permitiu avaliar aspectos dinâmicos da função β -celular.

CONCLUSÃO

Um incremento agudo nos lipídeos plasmáticos diminuiu a sensibilidade à insulina e estimulou a secreção total de insulina, mas seletivamente diminuiu a secreção estimulada pelas incretinas nos indivíduos não diabéticos. Inversamente, nos pacientes com DM2, uma redução aguda e farmacológica dos FFA não melhorou o efeito incretínico, mas melhorou a sensibilidade à insulina, reduzindo a secreção deste hormônio e diminuindo a glicemia. Com isso, a diminuição do EI pelo aumento dos FFA pode ter impacto importante na fisiopatologia do DM2 em fases iniciais. Ao contrário, este efeito não é significativo em diabéticos com função β -celular mais seriamente comprometida, pois nestes casos já não há resposta da célula β a múltiplos estímulos, e não exclusivamente às incretinas.

Mais estudos são necessários para melhor entendimento dos mecanismos pelos quais os FFA diminuem a secreção de insulina cronicamente nas pessoas com DM2. Estudos longitudinais do efeito incretínico em indivíduos predispostos ao diabetes confirmariam ou não o papel do aumento de FFA endógeno na resposta insulínica. Novos estudos devem também avaliar a interação das terapias com incretinas e os níveis lipídicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VIGITEL Brasil 2013: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014 e 2016. <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/morbidade/Vigitel2013.pdf>.
2. Diabetes Fact Sheet. 2013. World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
3. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:664-71.
4. Cusi K. Lessons learned from studying families genetically predisposed to type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2009;9:200-7.
5. DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus - Banting Lecture. *Diabetes* 2009;58:773-95.
6. Ferrannini E. The stunned beta cell: a brief history. *Cell Metab* 2010;11(5):349-52.
7. Lean ME, Leslie WS, Barnes AC, Brosnahan N, Thom G, et al. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DIRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet* 2018(10);391:541-51.
8. Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: normalization of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 2011;54:2506-14.
9. Steven S, Hollingsworth KG, Al-Mrabeh A, Avery L, Aribisala BS, et al. Very low-calorie diet and 6 months of weight stability in type 2 diabetes: pathophysiological changes in responders and nonresponders. *Diabetes Care* 2016;39:808-15.
10. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131-57.
11. Fritsche A, Stefan N, Hardt E, Häring H, Stumvoll M. Characterization of beta-cell dysfunction of impaired glucose tolerance: Evidence for impairment of incretin-induced insulin secretion. *Diabetologia* 2000;43:852-58.

12. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1967;46:1954-58.
13. Nauck MA, Homberger E, Siegel E, Allen R, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:492-8.
14. Vilsboll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004;47:357-66.
15. Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, Jelic K, Lindgren O, Deacon CF, Ahrén B. Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E779-84.
16. Lindgren O, Carr RD, Deacon CF, Holst JJ, Paccini G, Mari A, Ahrén B. Incretin hormone and insulin responses to oral versus intravenous lipid administration in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2519-24.
17. Lindgren O, Pacini G, Tura A, Holst JJ, Deacon CF, Ahrén B. Incretin effect after oral amino acid ingestion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1172-6.
18. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor Family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 1993;133:2861-70.
19. Mortensen K, Petersen LL, Orskov C. Colocalization of GLP-1 and GIP in human and porcine intestine. *Ann NY Acad Sci* 2000;921:469-72.
20. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human pre-proglucagon gene. *Nature* 1983;304:368-71.
21. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 1986;261:11880-9.
22. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* 2003;114:189-96.
23. Elliot RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1(7-36) amide and glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 1993;138:159-66.
24. Holst JJ. Glucagon-like Peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology* 1994;107:1848-55.

25. Hermann-Rinke C, Vöge A, Hess M, Göke B. Regulation of GLP-1 secretion from rat ileum by neuro-transmitters and peptides. *J Endocrinol* 1995;147:25-31.
26. Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology* 1991;128:3175-82.
27. Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced GLP-1 secretion. *Endocrinology* 1999;140:1687-94.
28. Anini Y, Brubaker PL. Muscarinic receptors control GLP-1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology* 2003;144:3244-50.
29. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ. Secretion of GLP-1 in Type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia* 2011;54:10-8.
30. Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* 1993;133:233-40.
31. Roberge JN, Gronau KA, Brubaker PL. Gastrin-releasing peptide is a novel mediator of proximal nutrient-induced proglucagon-derived peptide secretion from the distal gut. *Endocrinology* 1996;137:2383-8.
32. Hansen L, Lampert S, Mineo H, Holst JJ. Neural regulation of GLP-1 secretion in pigs. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 2004;287:E939-47.
33. Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol(Endocrinol Metab)* 2006;290:E550-9.
34. Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B. GLP-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 1992;22:283-91.
35. Balks HJ, Holst JJ, Muhlen A, Brabant G. Rapid oscillations in plasma GLP-1 in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:786-90.
36. Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3575-81.
37. Vilsboll T, Agerso H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of GLP-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:220-4.

38. Deacon CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ. GLP-1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *Am J Physiol* 1996;271:E458-E64.
39. Nauck MA, Meier JJ. Incretin Hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2018;20(1):5-21
40. Deacon CF, Danielsen P, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition reduces the degradation and clearance of GIP and potentiates its insulinotropic and antihyperglycemic effects in anesthetized pigs. *Diabetes* 2001;50:1588-97.
41. Elahi D, McAloon Dyke M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, et al. The insulinotropic actions of GIP and GLP-1 in normal and diabetic subjects. *Regul Pept* 1994;51:63-74.
42. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of GLP-1[7-36amide] but not of synthetic human GIP in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91:301-7.
43. Toft-Nielsen M, Madsbad S, Holst JJ. Exaggerated secretion of glucagon-like peptide-1 could cause reactive hypoglycemia. *Diabetologia* 1998;41:1180-6.
44. Jia X, Brown JC, Ma P, Pederson RA, McIntosh CH. Effects of GIP and GLP-1(7-36) on insulin secretion. *Am J Physiol* 1995;268:E645-E51.
45. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human GIP and GLP-1(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:912-7.
46. Bang-Berthelsen CH, Holm TL, Pyke C, Simonsen L, Sokilde R et al. GLP-1 induces barrier protective expression in Brunner's glands and regulates colonic inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2016 Sep;22(9):2078-97.
47. Lebrun LJ, Lenaerts K, Kiers D, Pais de Barros JP, Le Guern N et al. *Cell Rep* 2017 oct31;21(5):1160-8.
48. Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 2009;297:127-36.
49. Hare KJ, Vilsboll T, Asmar M, Deacon CF, Knop FK, Holst JJ. The glucagonostatic and insulinotropic effects of GLP-1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes* 2010;59:1765-70.

50. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak AS, Edwards CMB, Meeran K, et al. A role for GLP-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996;379:69-72.
51. Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 2003;52:380-6.
52. Buteau J, Rduit R, Susini S, Prentki M. GLP-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 1999;42(7):856-64.
53. Fehmann HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 1992;130(1):159-66.
54. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* 1999;48:2358-66.
55. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta-cell apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:471-8.
56. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R. GLP-1 promotes islets cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*.2002;143:4397-408.
57. Fan R, Li X, Gu X, Chan JC, Xu G. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced cell damage: potential involvement of AKT and mitochondria biogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:815-24.
58. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 1999;48(12):2270-6.
59. Muscelli E, Mari A, Natali A, Astiarraga BD, Camastra S, Frascerra S, et al. Impact of incretin hormones on beta-cell function in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1144-50.
60. Muscelli E, Mari A, Calsolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, et al. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2008;57:1340-8.

61. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentration of intact biologically active GLP-1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001;50:609-13.
62. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ. Determinants of the impaired secretion of GLP-1 in Type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3717-23.
63. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 diabetes. *Diabetologia* 1986;29:46-52.
64. Knop FK, Aaboe K, Vilsboll T, Volund A, Holst JJ, Krarup T, Madsbad S. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2012;14:500-10.
65. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, Holst JJ, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 2007;56:1951-9.
66. Meier JJ, Nauck MA, Sepmann N, Greulich M, Holst JJ, Deacon CF, et al. Similar insulin secretory response to a gastric inhibitory polypeptide bolus injection at euglycemia in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes and control subjects. *Metabolism* 2003;52:1579-85.
67. Hojberg PV, Vilsboll T, Rabol R, Knop FK, Bache M, Krarup T, et al. Four weeks of near-normalization of blood glucose improves the insulin response to GLP-1 and GIP in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009;52:199-207.
68. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Holst JJ et al. The insulinotropic effect of GIP is impaired in patients with chronic pancreatitis and normal glucose tolerance. *Regul Pept* 2007;144:123-30.
69. Holz IV GG, Kuhlreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone GLP-1(7-37). *Nature* 1993;361:362-5.
70. Meier JJ, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA. Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001;50:2497-504.
71. Tronier B, Dejgaard A, Andersen T, Madsbad S. Absence of incretin effect in obese type 2 diabetics and diminished effect in lean type 2 and obese subjects. *Diab Res Clin Pract* 1985[Suppl 1]:S568.

72. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, et al. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* 2007;56:1551-8.
73. Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, Cho JH, McIntosh CH, Maedler K. Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Human Molec Genetics* 2009;18(13):2388-99.
74. Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 1985;4:110-25.
75. Robertsen RP. Type 2 diabetes, glucose “non-sense”, and islet desensitization (Review Article). *Diabetes* 1989;38:1501-5.
76. Polonsky KS. The B-cell in diabetes: from molecular genetics to clinical research. *Diabetes* 1995;44:705-17.
77. Porte D Jr. Banting lecture 1990: B-cells in type 2 diabetes mellitus (Review Article). *Diabetes* 1991;40:166-80.
78. Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D Jr. Diminished B-cell capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1984;74:1318-28.
79. Byrne MM, Sturis J, Sobel RJ, Polonsky KS. Elevated plasma glucose 2h postchallenge predicts defects in Beta-cell function. *Am J Physiol* 1996;33:E572-9.
80. Borghi VC, Wajchenberg BL, Cesar PF. Plasma glucagon suppressibility after oral glucose in obese subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Metabolism* 1984;33:1068-74.
81. Meier JJ, Ritter PR, Jacob A, Menge BA, Deacon CF, Schmidt WE et al. Impact of hyperglucagonemia on postprandial concentrations of GIP and GLP-1 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4061-5.
82. Muscelli E, Casolaro A, Gastaldelli A, Mari A, Seghieri G, Astiarraga B, et al. Mechanisms for the antihyperglycemic effect of sitagliptin in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(8):2818-26.

83. Ranganath L, Schaper F, Gama R, Morgan L, Wright J, Teale D, Marks V. Effect of glucagon on carbohydrate-mediated secretion of GIP and [7-36 amide] GLP-1. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15:390-4.
84. Lefèbvre PJ. Glucagon and its family revisited. *Diabetes Care* 1995;18:715-30.
85. Ranganath L, Norris F, Morgan J, Wright J, Marks V. The effect of circulating non-esterified fatty acids on the entero-insular axis. *Eur J Clin Invest* 1999;29(1):27-32.
86. Vaag AA, Holst JJ, Volund A, Beck-Nielsen H. Gut incretin hormones in identical twins discordant for NIDDM – evidence for decrease GLP-1 secretion during oral glucose ingestion in NIDDM twins. *Eur J Endocrinol* 1996;135:432-5.
87. Holst JJ, Gromada J, Nauck MA. The pathogenesis of NIDDM involves a defective expression of the GIP receptor. *Diabetologia* 1997;40:984-6.
88. Meier JJ, Holst JJ, Schmidt WE, Nauck MA. Reduction of hepatic insulin clearance after oral glucose ingestion is not mediated by GLP-1 or GIP in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E849-56.
89. Waldhausl V, Bratusch-Marrain P, Gasic S, Korn A, Nowotny P. Insulin production rate following glucose ingestion estimated by splanchnic C-peptide output in normal man. *Diabetologia* 1979;17:221-7.
90. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Holst JJ, Tura A, Pacini G, Ahrén B. Insulin secretion and incretin hormones after oral glucose in non-obese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2004;(53):624-31.
91. Polonsky K, Jaspan J, Pugh W, Cohen D, Schneider M, Schwartz T, et al. Metabolism of C-peptide in the dog. In vivo demonstration of the absence of hepatic extraction. *J Clin Invest* 1983;72:1114-23.
92. Golay A, Swislocki AL, Chen YD, Jaspan JB, Reaven GM. Effect of obesity on ambient plasma glucose, free fatty acid, insulin, growth hormone, and glucagon concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63(2):481-4.
93. Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo RA. Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes* 2017;66:815-22.
94. Subramanian S, Chait A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:819-25.
95. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37(3):635-46.

96. Ferrannini E, Barret EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983;72:1737-47.
97. Santomauro AT, Boden G, Silva ME, Rocha DM, Santos RF et al. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and non diabetic subjects. *Diabetes* 1999;48(9):1836-41.
98. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) - associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002;277(52):50230-6.
99. Kruszynska YT, Worrall DS, Ofrecio J, Frias JP, Macaraeg G, Olefsky JM. Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(1):226-34.
100. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7(1):45-56.
101. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 2012;11(30):1-11.
102. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol* 2012;57(2-4):91-7.
103. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2010;10(4):306-15.
104. Lupi R, Del Prato S. Beta-cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes Metab* 2008;34 Suppl 2:S56-64.
105. Daniele G, Eldor R, Merovci A, Clarke GD, Xiong J, Tripathy D, et al. Chronic reduction of plasma free fatty acid improves mitochondrial function and whole-body insulin sensitivity in obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetes* 2014;63:2812-20.
106. Carpentier A, Bourbonnais A, Frisch F, Giacca A, Lewis GF. Plasma nonesterified fatty acid intolerance and hyperglycemia are associated with intravenous lipid-induced impairment of insulin sensitivity and disposition index. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1256-64.

107. McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 1999;42:128-38.
108. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995;44:863-70.
109. Kruszynska YT, Mulford MI, Yu JG, Armstrong DA, Olefsky JM. Effects of non-esterified fatty acids on glucose metabolism after glucose ingestion. *Diabetes* 1997;46:1586-93.
110. Stein DT, Esser V, Stevenson B, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 1996;97:2728-35.
111. Crespin SR, Greenough WB, Steinberg D. Stimulation of insulin secretion by long-chain free fatty acids. A direct pancreatic effect. *J Clin Invest* 1973;52(8):1979-84.
112. Staehr P, Hother-Nielsen O, Landau BR, Chandramouli V, Holst JJ, Beck-Nielsen H. Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis and glycogenolysis. *Diabetes* 2003;52:260-7.
113. Zhou YP, Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 1994;93:870-6.
114. Sako Y, Grill VE. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and Beta-cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 1990;127(4):1580-9.
115. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F. Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J Lab Clin Med* 1968;72(3):438-48.
116. Pelkonen R, Miettinen TA, Taskinen MR, Nikkila EA. Effect of acute elevation of plasma glycerol, triglyceride and FFA levels on glucose utilization and plasma insulin. *Diabetes* 1968;17(2):76-82.
117. Amery CM, Round RA, Smith JM, Nattrass M. Elevation of plasma fatty acids by ten-hour intralipid infusion has no effect on basal or glucose-stimulated insulin secretion in normal man. *Metabolism* 2000;49(4):450-4.
118. Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F. Opposite effects of short and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 1995;38(11):1295-9.

119. Boden G, Chen X, Rosner J, Baron M. Effects of a 48-hour fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* 1995;44(10):1239-42.
120. Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of β -cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 2001;50(1);S118-21.
121. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(10):2461-74.
122. Salgin B, Marcovecchio ML, Humphreys SM, Hill N, Chassin LJ, Lunn DJ, et al. Effects of prolonged fasting and sustained lipolysis on insulin secretion and insulin sensitivity in normal subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E454-61.
123. Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:399-408.
124. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Gualdiero P, Saccomanno F, Gambardella A, et al. Lowering fatty acids potentiates acute insulin response in first degree relatives of people with type II diabetes. *Diabetologia* 1998;41:1127-32.
125. Kang ZF, Deng Y, Zhou Y, Fan RR, Chan JC, Laybutt DR, et al. Pharmacological reduction of NEFA restores the efficacy of incretin-based therapies through GLP-1 receptor signaling in the beta cell in mouse models of diabetes. *Diabetologia* 2013;56:423-33.
126. Hodson DJ, Mitchell RK, Bellomo LA, Sun G, Sun G, Vinet L, et al. Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human β cell connectivity. *J Clin Invest* 2013;123(10):4182-94.
127. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008;29:351-66.
128. Christie A, McCormick D, Emmison N, Kraemer F, Alberti KG, Yeaman SJ. Mechanism of anti-lipolytic action of acipimox in isolated rat adipocytes. *Diabetologia* 1996;39:45-53.
129. Karpe F, Frayn KN. The nicotinic acid receptor - a new mechanism for an old drug. *Lancet* 2004;363:1892-4.

130. Lorenzen A, Stannek C, Heidrun L, Andrianov V, Kalvinsh I, Schwabe U. Characterization of a G protein-coupled receptor for nicotinic acid. *Mol Pharmacol* 2001;59(2):349-57.
131. Mari A, Pacini G, Brazzale AR, Ahrén B. Comparative evaluation of simple insulin sensitivity methods based on the oral glucose tolerance test. *Diabetologia* 2005;48(4):748-51.
132. Mari A, Schmitz O, Gastaldelli A, Oestergaard T, Nyholm B, Ferrannini E. Meal and oral glucose tests for assessment of beta-cell action: modelling analysis in normal subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E1159-66.
133. Tura A, Muscelli E, Gastaldelli A, Ferrannini E, Mari A. Altered pattern of the incretin effect as assessed by modelling in individuals with glucose tolerance ranging from normal to diabetic. *Diabetologia* 2014;57:1199-203.
134. Van Cauter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS. Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels: comparison of individual and standard kinetic parameters for C-peptide clearance. *Diabetes* 1992;41:368-77.
135. Conover WJ, Iman RL. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. *The American Statistician* 1981 ;35No.3(Aug):124-9.
136. Cusi K, Kashyap S, Gastaldelli A, Bajaj M, Cersosimo E. Effects on insulin secretion and insulin action of a 48h reduction of plasma free fatty acids with acipimox in nondiabetic subjects genetically predisposed to type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292(6):E1775-E81.
137. Qvigstad E, Mostad IL, Bjerve KS, Grill VE. Acute lowering of circulating fatty acids improves insulin secretion in a subset of type 2 diabetes subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E129-37.
138. Hughan KS, Bonadonna RC, Lee SJ, Michaliszyn SF, Arslanian SA. Beta-cell lipotoxicity after an overnight intravenous lipid challenge and free fatty acid elevation in African American versus American white overweight/obese adolescents. *JCEM* 2013;98(5):2062-9.
139. Merovci A, Abdul-Ghani M, Mari A, Solis-Herrera C, Xiong J, Daniele G, et al. Effect of dapagliflozin with and without acipimox on insulin sensitivity and insulin secretion in T2DM males. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:1249-56.
140. Bak MJ, Albrechtsen NJW, Pedersen J, Knop FK, Vilsboll T, Jorgensen NB, et al. Specificity and sensitivity of commercially available assays for GLP-1:

- implications for GLP-1 measurements in clinical studies. *Diabetes Obes Metab* 2014;16:1155-64.
141. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, Meier JJ. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 2008;57:678-87.
 142. Bak MJ, Albrechtsen NJW, Pedersen J, Hartmann B, Christensen M, Vilsboll T, et al. Specificity and sensitivity of commercially available assays for glucagon and oxyntomodulin measurement in humans. *Europ J Endocr* 2014;170:529-38.
 143. Faerch K, Vistisen D, Pacini G, Torekov SS, Johansen NB, Witte DR, et al. Insulin resistance is accompanied by increased fasting glucagon and delayed glucagon suppression in individuals with normal and impaired glucose regulation. *Diabetes* 2016;(65):3473-81.
 144. Ferrannini E, Muscelli E, Natali A, Gabriel R, Mitrakou A, Flyvbjerg A, et al. Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia* 2007;50:2342-7.
 145. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10.
 146. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes* 1994;43:703-11.
 147. Bajaj M, Suraamornkul S, Kashyap S, Cusi K, Mandarino L, DeFronzo R. Sustained reduction in plasma free fatty acid concentration improves insulin action without altering plasma adipocytokine levels in subjects with strong family history of type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4649-55.
 148. Giacca A, Xiao C, Oprescu AI, Carpentier AC, Lewis GF. Lipid-induced pancreatic β -cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E255-62
 149. Yang Y, Tong Y, Gong M, Lu Y, Wang C, Zhou M, et al. Activation of PPAR β/δ protects pancreatic β cells from palmitate-induced apoptosis by upregulating the expression of GLP-1 receptor. *Cell Sign* 2014;26:268-78.
 150. Abaraviciene SM, Muhammed SJ, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. GPR40 protein levels are crucial to the regulation of stimulated hormone secretion in pancreatic islets. Lessons from spontaneous obesity-prone and non-obese type 2 diabetes in rats. *Molec Cell Endocrinol* 2013;381:150-9.

151. Zhou YP, Grill V. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1584-90.
152. Jezek P, Jaburek M, Holendová B, Plecítá-Hlavatá L. Fatty acid-stimulated insulin secretion vs. Lipotoxicity. *Molecules* 2018;23(6):1483;doi10.3390.
153. Caporarello N, Parrino C, Trischitta V, Frittitta L. Insulin receptor signaling and glucagon-like peptide 1 effects on pancreatic beta cells. *Plos One* 2017;12(8):doi10.1371/e0181190.
154. Suzuki E, Matsuda T, Kawamoto T, Takahashi H, Mieda Y et al. Docosahexaenoic acid reduces palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic B cells. *Kobe J Med Sci*;64(2):E43-55.
155. Xiao C, Giacca A, Carpentier A, Lewis GF. Differential effects of monounsaturated, polyunsaturated and saturated fat ingestion on glucose-stimulated insulin secretion, sensitivity and clearance in overweight and obese, non-diabetic humans. *Diabetologia* 2006;49:1371-9.
156. Carpentier AC. Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diab Metab* 2008;34:97-107.
157. Tura A, Bagger JI, Ferrannini E, Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, Mari A. Impaired beta cell sensitivity to incretins in type 2 diabetes is insufficiently compensated by higher incretin response. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2017;27:1123-9.
158. Tanabe A, Kaneto H, Kamei S, Hirukawa H, Shimoda M, Kimura T, et al. Clinical effects of liraglutide are possibly influenced by hypertriglyceridemia and remaining pancreatic β -cell function in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2016;30:1201-3.
159. Parry SA, Smith JR, Corbett TR, Woods RM, Hulston CJ. Short-term, high-fat overfeeding impairs glycaemic control but does not alter gut hormone responses to a mixed meal tolerance test in healthy, normal-weight individuals. *Br J Nutr* 2017;117:48-55.
160. Migoya EM, Bergeron R, Miller J, Snyder R, Tanen M, Hilliard D, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors administered in combination with Metformin result in an additive increase in the plasma concentration of active GLP-1. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88(6):801-8.

161. Vardarli I, Arndt E, Deacon CF, Holst JJ, Nauck MA. Effects of sitagliptin and metformin treatment on incretin hormone and insulin secretory responses to oral and isoglycemic intravenous glucose. *Diabetes* 2014;63:663-74.
162. Rebelos E, Seghieri M, Natali A, Balkau B, Golay A, Piatti PM, et al. Influence of endogenous NEFA on beta cell function in humans. *Diabetologia* 2015;58:2344-51.
163. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995;38:1213-7.
164. Stefan N, Stumvoll M, Bogardus C, Tataranni PA. Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E1156-61.
165. Salgin B, Ong KK, Thankamony A, Emmett P, Wareham NJ, Dunger DB. Higher fasting plasma FFA levels are associated with lower insulin secretion in children and adults and a higher incidence of T2D. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(9):3302-9.
166. Byrne CD, Maison P, Halsall D, Martensz N, Hales CN, Wareham NJ. Cross-sectional but not longitudinal associations between non-esterified fatty acid level and glucose intolerance and other features of the metabolic syndrome. *Diabet Med* 1999;16(12):1007-15.
167. vanRaalte and Verchere. Improving glycaemic control in type 2 diabetes: stimulate insulin secretion or provide beta-cell rest? *Diabetes Obes Metab* 2017;19:1205-13.
168. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Del Prato S, et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* 2009;32(11):2133-5.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

PUBLICAÇÕES e APRESENTAÇÕES em CONGRESSOS

CONGRESSOS:

- **Acute lowering of circulating fatty acids does not improve the incretin effect in patients with type 2 diabetes.** Chueire VB; Astiarraga BD; Souza AL; Pereira-Moreira R; Rodovalho S; Monte Alegre S; Tura A; Mari A; Natali A; Ferrannini E; Muscelli E. Apresentado no 53rd congresso da EASD-2017
- **Effects of acute elevation of plasma NEFA on incretin-stimulated insulin secretion.** Astiarraga BD, Muscelli E, Chueire VB, Pereira-Moreira R, Souza AL, Camastra S, Baldi S, Tura A, Mari A, Natali A, Ferrannini E. Apresentado no XXI CBD em São Paulo 2017
- **Acute lowering of circulating fatty acids does not improve the incretin effect in patients with type 2 diabetes.** Chueire VB; Astiarraga BD; Souza AL; Pereira-Moreira R; Rodovalho S; Monte Alegre S; Tura A; Mari A; Natali A; Ferrannini E; Muscelli E. Apresentado no XXI CBD em São Paulo 2017

ARTIGO PUBLICADO:

Revista Diabetologia (2018) 61:1829–1837
Up Front Diabetologia (2018) 61:1691–1692

APÊNDICE 2

Diabetologia (2018) 61:1829–1837
<https://doi.org/10.1007/s00125-018-4633-z>

ARTICLE



Effects of acute NEFA manipulation on incretin-induced insulin secretion in participants with and without type 2 diabetes

Brenno Astiarraga¹ · Valéria B. Chueire² · Aglécio L. Souza² · Ricardo Pereira-Moreira² · Sarah Monte Alegre² · Andrea Natali¹ · Andrea Tura³ · Andrea Mari³ · Ele Ferrannini⁴ · Elza Muscelli²

Received: 26 February 2018 / Accepted: 4 April 2018 / Published online: 7 May 2018
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Aims/hypothesis Incretin effect—the potentiation of glucose-stimulated insulin release induced by the oral vs the i.v. route—is impaired in dysglycaemic states. Despite evidence from human islet studies that NEFA interfere with incretin function, little information is available about the effect in humans. We tested the impact of acute bidirectional NEFA manipulation on the incretin effect in humans.

Methods Thirteen individuals with type 2 diabetes and ten non-diabetic volunteers had a 3 h OGTT, and, a week later, an i.v. isoglycaemic glucose infusion (ISO; OGTT matched). Both pairs of studies were repeated during an exogenous lipid infusion in the non-diabetic volunteers, and following acipimox administration (to inhibit lipolysis) in people with diabetes. Mathematical modelling of insulin secretion dynamics assessed total insulin secretion (TIS), beta cell glucose sensitivity (β -GS), glucose-induced potentiation (P_{GLU}) and incretin-induced potentiation (P_{INCR}); the oral glucose sensitivity index was used to estimate insulin sensitivity.

Results Lipid infusion increased TIS (from 61 [interquartile range 26] to 78 [31] nmol/m² on OGTT and from 29 nmol/m² [26] to 57 nmol/m² [30] on ISO) and induced insulin resistance. P_{INCR} decreased from 1.6 [1.1] to 1.3 [0.1] ($p < 0.05$). β -GS, P_{GLU} and glucagon, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and gastric inhibitory polypeptide (GIP) responses were unaffected. Acipimox (lowering NEFA by ~55%) reduced plasma glucose and TIS and enhanced insulin sensitivity, but did not change β -GS, P_{INCR} , P_{GLU} or glucagon, GLP-1 or GIP responses. As the per cent difference, incretin effect was decreased in non-diabetic participants and unchanged in those with diabetes.

Conclusions/interpretation Raising NEFA selectively impairs incretin effect and insulin sensitivity in non-diabetic individuals, while acute NEFA reduction lowers plasma glucose and enhances insulin sensitivity in people with diabetes but does not correct the impaired incretin-induced potentiation.

Keywords Acipimox · Beta cell function · Incretin effect · Incretin hormones · Isoglycaemic protocol · NEFA · Potentiation

Brenno Astiarraga and Valéria B. Chueire contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00125-018-4633-z>) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

✉ Ele Ferrannini
ferranni@ifc.cnr.it

¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy

² Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil

³ CNR Institute of Neuroscience, Padua, Italy

⁴ CNR Institute of Clinical Physiology, Via Savi, 10, 56100 Pisa, Italy

Abbreviations

Acp-OGTT	OGTT following acipimox
Acp-ISO	ISO following acipimox
β -GS	Beta cell glucose sensitivity
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion
ISO	Isoglycaemic glucose infusion
ISR	Insulin secretion rate
L-ISO	Lipid infusion/ISO
L-OGTT	Lipid infusion/OGTT
OGIS	OGTT-derived index of insulin sensitivity
P_{GLU}	Glucose-induced potentiation
P_{INCR}	Incretin-induced potentiation
TIS	Total insulin secretion

Research in context

What is already known about this subject?

- The incretin effect is impaired in dysglycaemic states
- In human islets in vitro, NEFA interfere with incretin function

What is the key question?

- How does acute bidirectional manipulation of plasma NEFA impact on the incretin effect in humans?

What are the new findings?

- NEFA elevation selectively impairs the incretin effect, but does not change beta cell function in healthy volunteers
- In participants with type 2 diabetes, acute NEFA reduction does not correct the impairment in incretin-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion

How might this impact on clinical practice in the foreseeable future?

- The impairment of the incretin effect by an increase in NEFA could be important to the pathophysiology of diabetes. However, the possible therapeutic benefits of NEFA reduction on the incretin effect in type 2 diabetic individuals must be further investigated

Introduction

Previous studies in vitro [1, 2] and in intact animals [3] have consistently shown that acute exposure to NEFA results in a substantial increase in both basal and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Studies in humans, however, have yielded contrasting results. Acute (3–12 h) lipid infusions in normal participants have been reported to have no effect [4], to increase [5–7] or to inhibit [8] GSIS. In participants with [9] or without [10] family history of type 2 diabetes, a physiological rise in NEFA induced a mild deterioration of beta cell function, which was more evident when insulin secretion was examined in relation to the prevailing insulin resistance. In the same individuals, lowering plasma NEFA with acipimox was associated with an improvement in the acute insulin response to i.v. glucose [10, 11]. Different approaches to assessing GSIS, different types of test, adjustment for the insulin sensitivity and genetic predisposition might influence the controversial results, as reviewed by Giacca et al [12]. Incretin-mediated insulin secretion accounts for about 40–80% [13] of total insulin secretion (TIS) in response to an oral stimulus and is impaired in type 2 diabetic individuals and in those with some degree of glucose intolerance [14–17]. However, surprisingly little information is available on the effect of NEFA on incretin-stimulated insulin secretion in humans, despite recent evidence in human islets that NEFA might interfere with incretin function [18, 19].

We designed this study to test: (1) whether incretin-induced potentiation of insulin secretion is reduced by acute elevation of plasma NEFA levels in healthy volunteers; and (2) whether,

in participants with type 2 diabetes, the impaired incretin effect can be improved by an acute reduction in circulating NEFA. The incretin effect was measured as the potentiation of glucose-induced insulin release selectively caused by the oral vs i.v. glucose route of entry. Plasma NEFA levels were acutely raised in non-diabetic volunteers through an i.v. lipid infusion and lowered in type 2 diabetic participants by the administration of acipimox.

Methods

The study was carried out at two centres (University of Pisa, Italy, and State University of Campinas, Brazil). Fifteen individuals with type 2 diabetes treated with diet or stable doses of metformin were recruited from the outpatient clinic of the Catholic University of Campinas and State University of Campinas. Inclusion criteria were: age 18–60 years, HbA_{1c} 47.5–85.8 mmol/mol (6.5–10.0%), BMI <40 kg/m², no other endocrine disease, no clinical evidence of neoplastic or chronic inflammatory disease, or major organ (liver, kidney, heart, pulmonary) failure. Two participants with diabetes were excluded: one dropped out after the first test, the other was excluded at the end of the study when it was realised that the participant had an HbA_{1c} of 42.1 mmol/mol [6.0%], lower than the lower limit of the protocol; thus, 13 diabetic individuals were included in the final analysis. Ten healthy volunteers were enrolled at the University of Pisa. Participants gave their informed consent, and the study was approved by the Ethics Committees (Protocol number 23474 at the Pisa centre; Certificate of Presentation for Ethical Appreciation, CAAE, 48181215.2.0000.5404 at the Campinas centre). The

Table 1 Anthropometric and metabolic characteristics of the study participants

Characteristic	Healthy	Type 2 diabetes
<i>n</i> (women/men)	10 (4/6)	13 (10/3)
Age (years)	34 ± 11	55 ± 8
Duration (<1/<10/≥10 years)	-	2/7/4
Body weight (kg)	68 ± 22	88 ± 16
BMI (kg/m ²)	23.8 ± 5.9	32.8 ± 5.6
Fat-free mass (kg)	52 ± 15	51 ± 10
Fat mass (%)	23 ± 3	39 ± 6
Energy expenditure (kJ/24 h)	6592 ± 548	6772 ± 302
HbA _{1c} (mmol/mol)	-	55.2 ± 4.3
HbA _{1c} (%)	-	7.2 ± 0.5
Triacylglycerols (mmol/l)	1.05 ± 0.27	1.77 ± 0.74
Insulin sensitivity (ml min ⁻¹ m ⁻²)	402 ± 22	291 ± 60

Data are mean ± SD

anthropometric and metabolic characteristics of the study participants are summarised in Table 1.

Study protocol All participants had two control tests, a 3 h OGTT (75 g) and, on a separate occasion ~7 days later, a 3 h isoglycaemic glucose infusion (ISO) using an ad hoc

algorithm to exactly reproduce the glycaemic curve observed during the OGTT (isoglycaemic protocol). In the healthy volunteers, both tests were repeated during an i.v. infusion of a 20% (vol./vol.) lipid/water emulsion (60 ml/h) together with a primed (200 U) continuous (0.4 U kg⁻¹ min⁻¹) heparin infusion, started 2 h before either test (lipid infusion/OGTT [L-OGTT] and lipid infusion/ISO [L-ISO]). In participants with diabetes, the two tests were repeated after the ingestion of acipimox (Olbetam, Pfizer, Rome, Italy) (250 mg) 2 h before glucose administration and 1 h into each study (OGTT following acipimox [Acp-OGTT], ISO following acipimox [Acp-ISO]).

Measurements Fat-free mass was measured by electrical bioimpedance at both sites. Bedside plasma glucose concentrations were measured at 10 min intervals throughout the studies using the glucose oxidase technique (YSI 2300 Stat Plus Glucose Analyser, Yellow Springs, OH, USA, at the University of Campinas; Beckman Glucose Analysers, Fullerton, CA, USA, at the University of Pisa); plasma insulin and C-peptide concentrations were all measured by chemiluminescence (on a COBAS e411 instrument, Roche, Indianapolis, IN, USA). In both centres, total plasma glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and gastric inhibitory polypeptide (GIP) were assayed using the same ELISA kit (Merck

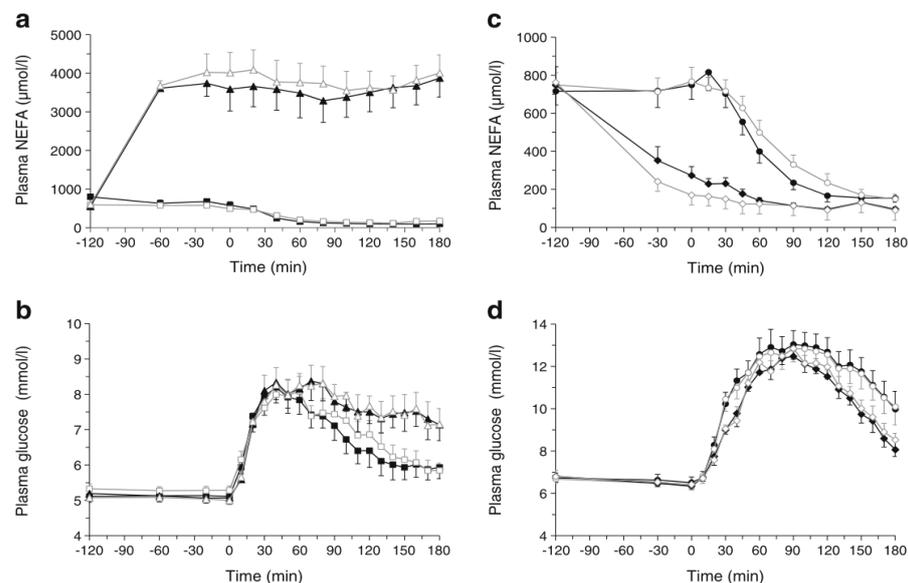
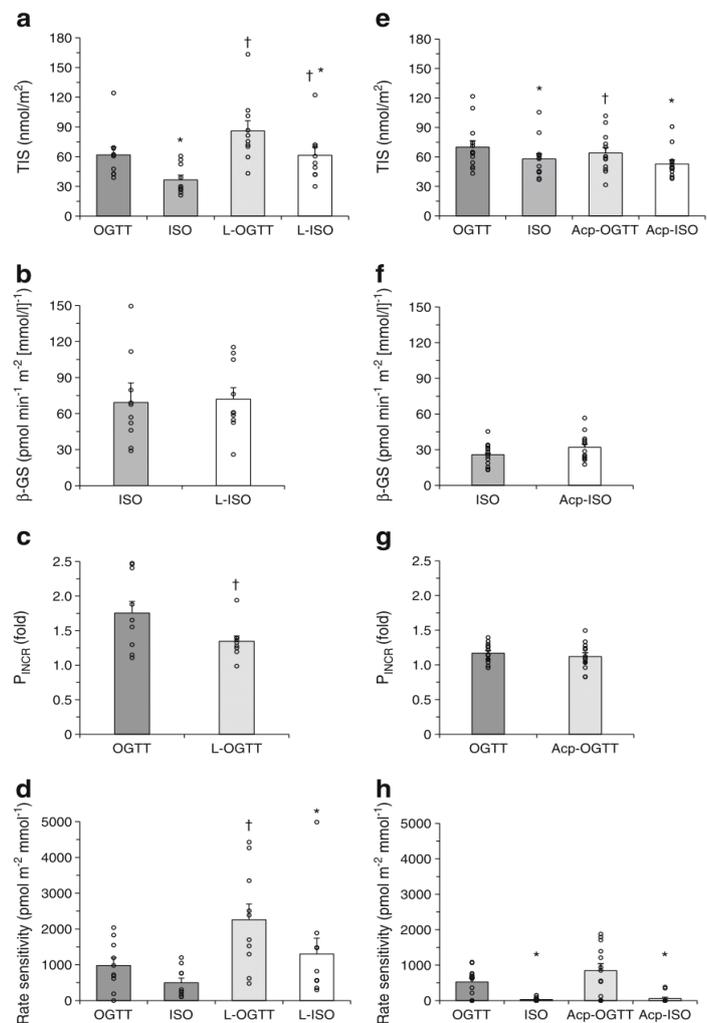


Fig. 1 Plasma NEFA (a) and glucose concentrations (b) in non-diabetic volunteers in OGTT and ISO control studies and with lipid infusion. Black squares, OGTT; white squares, ISO; black triangles, L-OGTT; white triangles, L-ISO. Plasma NEFA (c) and glucose concentrations (d) in participants with type 2 diabetes in OGTT and ISO control studies

and after acipimox ingestion. Black circles, OGTT; white circles, ISO; black diamonds, Acp-OGTT; white diamonds, Acp-ISO. Data are presented as mean ± SEM for *n* = 10 non-diabetic participants and *n* = 13 type 2 diabetic participants

Fig. 2 TIS (a,e), β -GS (b,f), P_{INCR} (c,g) and rate sensitivity (d,h) in non-diabetic volunteers (a–d) and participants with type 2 diabetes (e–h). * $p < 0.05$ for ISO vs OGTT, L-ISO vs L-OGTT or Acp-ISO vs Acp-OGTT. † $p < 0.05$ for treatment (lipid or acipimox) vs corresponding (OGTT or ISO) control study. Data are presented as mean \pm SEM for $n = 10$ non-diabetic participants and $n = 13$ type 2 diabetic participants



Millipore, Billerica, MA, USA), plasma NEFA by a standard colorimetric method (WAKO Chemicals, Neuss, Germany), and plasma glucagon by ELISA (RD System, Minneapolis, MN, USA; Campinas) and by Mercodia Glucagon ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden; Pisa).

Data analysis Insulin sensitivity was estimated from the plasma glucose and insulin responses to oral glucose using the OGTT-derived index of insulin sensitivity (OGIS) [20]. AUCs were calculated using the trapezoid rule. Plasma C-peptide deconvolution was used to calculate insulin secretion rate (ISR) and TIS, and mathematical modelling to quantify

beta cell function and the incretin effect [21]. The main variables in the beta cell model are glucose sensitivity (β -GS), i.e. the slope of the ISR/glucose dose–response curve obtained during the ISO test. Glucose-induced potentiation (P_{GLU}), a time-dependent modulation of the dose–response calculated during the ISO test, was parameterised as the ratio of the value at 3 h to the fasting value; incretin-induced potentiation (P_{INCR}) was calculated as the time-dependent fold ISR increment during OGTT compared with ISO glucose, and was parameterised as its integral over the 3 h of the tests. The incretin effect was also calculated using conventional model-independent indices (per cent difference ((OGTT TIS – ISO

TIS)/OGTT TIS] $\times 100$) and the ratio (OGTT TIS/ISO TIS between oral and i.v. glucose insulin secretory response), as described by Nauck et al [13, 14].

Statistical analysis Data from healthy participants and those with diabetes were analysed separately. Within-group treatment responses were analysed by paired *t* test or Wilcoxon signed rank test for normally or non-normally distributed variables, respectively. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Lipid infusion in non-diabetic volunteers While plasma NEFA levels were markedly suppressed during saline (154 mmol/l NaCl) infusion, exogenous lipid infusion increased mean plasma NEFA from 0.20 ± 0.08 to 3.55 ± 1.29 mmol/l during the L-OGTT, and from 0.23 ± 0.08 to 3.77 ± 1.10 mmol/l during the L-ISO study ($p < 0.001$ for both) (Fig. 1a). Correspondingly, mean triacylglycerol rose from 0.7 ± 0.3 to 3.1 ± 1.3 mmol/l and from 0.6 ± 0.2 to 3.2 ± 1.3 mmol/l during the L-OGTT and L-ISO, respectively ($p < 0.005$ for both). Plasma glucose profiles were matched between the oral and i.v. studies. Lipid infusion caused a marked deterioration of glucose tolerance (glucose incremental AUC 0.44 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.03 mol/l \times h, $p < 0.05$) that was particularly evident

during the second half of the test (Fig. 1b). As expected, total insulin release was greater with oral than i.v. glucose with both saline (Figs 2a, 3a) and lipid (Figs 2a, 3b); in addition, the relative hyperglycaemia induced by lipid infusion produced an increase in ISR and TIS, which was particularly pronounced (and statistically significant) during i.v. glucose administration (Table 2 and Fig. 2a). Neither β -GS (Fig. 2b) nor glucose potentiation (P_{GLU}) (Fig. 4) were significantly affected by the rise in NEFA, while rate sensitivity was approximately doubled (Table 2 and Fig. 2d) in both the oral and i.v. tests. In contrast, lipid infusion induced a marked decrease in incretin potentiation (P_{INCR}) (Table 2; Figs 2c, 4b), as well as in incretin effect calculated by conventional formulae (Table 2).

Response to oral glucose of plasma glucagon (0.76 ± 0.34 vs 0.68 ± 0.25 mol/l \times h, OGTT_{AUC} vs L-OGTT_{AUC}, respectively) (data not shown), GLP-1 (7.8 ± 2.2 vs 7.6 ± 2.1 nmol/l \times h, respectively) and GIP (9.4 ± 1.1 vs 9.4 ± 1.4 nmol/l \times h, respectively) were not different (electronic supplementary material [ESM] Fig. 1). Lipid infusion induced mild insulin resistance (OGIS = 355 ± 28 vs 402 ± 22 ml min⁻¹ m⁻², L-OGTT vs OGTT, respectively, $p < 0.01$).

Type 2 diabetic participants Plasma glucose profiles were superimposable on the paired oral and the i.v. tests. Acipimox administration was associated with a marked decrease in NEFA AUC ($55 \pm 14\%$, $p < 0.01$), which was similar

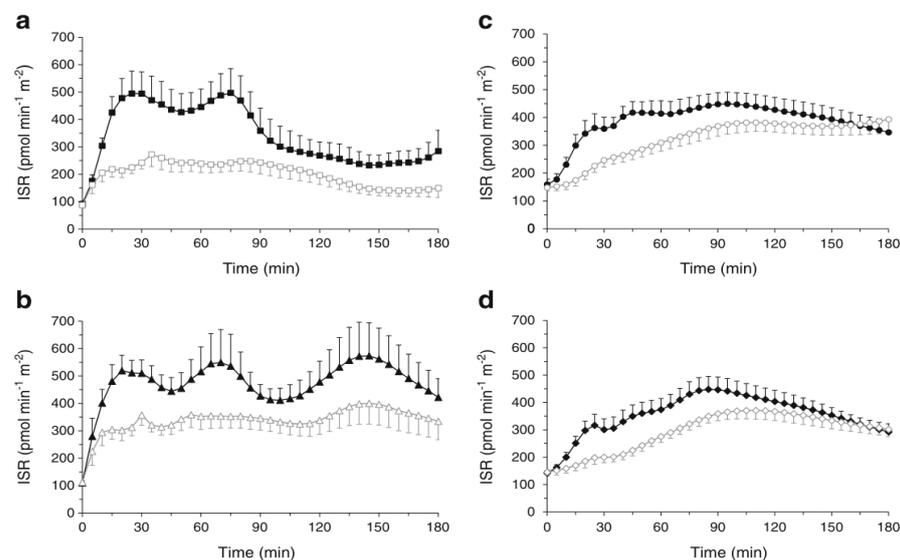


Fig. 3 ISR in non-diabetic volunteers during control studies, OGTT and corresponding ISO test (a), and during the lipid infusion studies, L-OGTT and L-ISO (b). Black squares, OGTT; white squares, ISO; black triangles, L-OGTT; white triangles, L-ISO. ISR in people with type 2 diabetes

during (c) control studies and after acipimox ingestion (d). Black circles, OGTT; white circles, ISO; black diamonds, Acp-OGTT; white diamonds, Acp-ISO. Data are presented as mean \pm SEM for $n = 10$ non-diabetic participants and $n = 13$ type 2 diabetic participants

Table 2 Beta cell function in non-diabetic volunteers and individuals with type 2 diabetes

Variable	OGTT	ISO	L-OGTT	L-ISO
No diabetes				
Fasting plasma glucose (mmol/l)	5.11 ± 0.28	5.33 ± 0.42*	5.19 ± 0.50	5.08 ± 0.41†
Fasting NEFA (μmol/l)	630 ± 121	595 ± 152*	554 ± 109†	607 ± 310
Fasting ISR (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	81 [19]	73 [43]	103 [25]	105 [24]††
TIS (nmol/m ²)	61 [26]	29 [26]**	78 [31]†	57 [30]**, †
β-GS (pmol min ⁻¹ m ⁻² [mmol/l] ⁻¹)	–	62 [34]	–	61 [50]
Rate sensitivity (nmol m ⁻² mM ⁻¹)	0.85 [0.94]	0.28 [0.59]	2.02 [2.05]†	0.70 [0.92]*
P _{GLU} (fold)	–	1.04 [0.38]	–	1.19 [0.73]
P _{INCR} (fold) ^a	1.61 [1.10]	–	1.30 [0.10]†	–
Incretin effect (ratio) ^a	1.79 [0.69]	–	1.41 [0.21]†	–
Incretin effect (%) ^a	44 [19]	–	29 [12]†	–
Type 2 diabetes				
	OGTT	ISO	Acp-OGTT	Acp-ISO
Fasting plasma glucose (mmol/l)	6.91 ± 0.97	6.97 ± 0.91	6.78 ± 0.74	6.91 ± 0.86
Fasting NEFA (μmol/l)	716 ± 262	749 ± 231	748 ± 348	763 ± 349
Fasting ISR (pmol min ⁻¹ m ⁻²)	129 [40]	134 [39]	130 [43]	113 [53]
TIS (nmol/m ²)	64 [24]	58 [17]**	60 [26]†	49 [10]**
β-GS (pmol min ⁻¹ m ⁻² [mmol/l] ⁻¹)	–	26 [14]	–	29 [15]
Rate sensitivity (nmol m ⁻² mmol ⁻¹)	0.65 [0.58]	0.23 [0.04]**	0.85 [1.39]	0.00 [0.00]**
P _{GLU} (fold)	–	1.61 [0.82]	–	1.38 [0.50]
P _{INCR} (fold) ^a	1.15 [0.21]	–	1.10 [0.24]	–
Incretin effect (ratio) ^a	1.22 [0.26]	–	1.22 [0.35]	–
Incretin effect (%) ^a	18 [18]	–	18 [24]	–

Data are mean ± SD or median [interquartile range]

^a These values were determined using oral and i.v. glucose results. For a further explanation of these variables, please refer to the ‘Data analysis’ section of the Methods

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by Wilcoxon test for oral vs i.v. glucose: ISO vs OGTT in non-diabetic and in type 2 diabetic participants; L-ISO vs L-OGTT in non-diabetic and Acp-ISO vs Acp-OGTT in type 2 diabetic participants

† $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ by Wilcoxon test for the comparison of lipid infusion or acipimox vs respective control study

in the oral and i.v. tests (Fig. 1c), and an improved glucose tolerance (glucose AUC = 0.74 ± 0.16 vs 0.90 ± 0.26 mol/l × h, $p = 0.04$) (Fig. 1d). Lowering plasma NEFA with acipimox reduced TIS during the OGTT, without significant changes in β-GS or rate sensitivity (Table 2 and Fig. 2e,h). Similarly, in the control (Fig. 3c) and the acipimox study (Fig. 3d), insulin secretion was lower in response to i.v. than oral glucose, particularly during the first 2 h of the tests. Neither P_{GLU} (Fig. 4c) nor P_{INCR} (Figs 2g,4d) (or the incretin effect indices [Table 2]) were changed by acipimox. P_{INCR} was ~30% lower in these participants with diabetes than in the control group ($p < 0.05$).

Acipimox administration did not change the AUCs of plasma glucagon (4.58 ± 0.92 vs 4.47 ± 0.63 nmol/l × h) (data not shown), GLP-1 (9.0 ± 3.2 vs 9.2 ± 4.3 nmol/l × h) or GIP (16.9 ± 7.4 vs 16.3 ± 5.5 nmol/l × h) (all $p = \text{NS}$) (ESM Fig. 1). Insulin sensitivity was slightly, but significantly, improved by acipimox (OGIS: 326 ± 44 vs 291 ± 60 ml min⁻¹ m⁻², $p = 0.01$).

In the data from the diabetes group, changes in ISR were directly related to changes in NEFA ($\rho = 0.62$, $p = 0.03$).

Discussion

In this study, we show that the acute effects of NEFA on insulin secretion are asymmetric. While in non-diabetic volunteers NEFA elevation caused a marked impairment of incretin-induced potentiation, in individuals with type 2 diabetes the impaired incretin effect was not improved by acutely lowering plasma NEFA. Of note, in the non-diabetic participants raising NEFA induced all the expected metabolic changes [9, 22]: mild deterioration of glucose tolerance and insulin sensitivity, increased insulin secretion and enhanced early insulin response (i.e. rate sensitivity) without any changes in β-GS. Conversely, acipimox administration in diabetic participants was associated with reduced insulin secretion and plasma glucose excursions and improved insulin sensitivity, but neither beta cell glucose sensitivity nor incretin-induced potentiation was changed. Of interest is that the effects of plasma NEFA modulation were observed in both the oral and i.v. tests; this rules out a role for the entero–insular axis or the

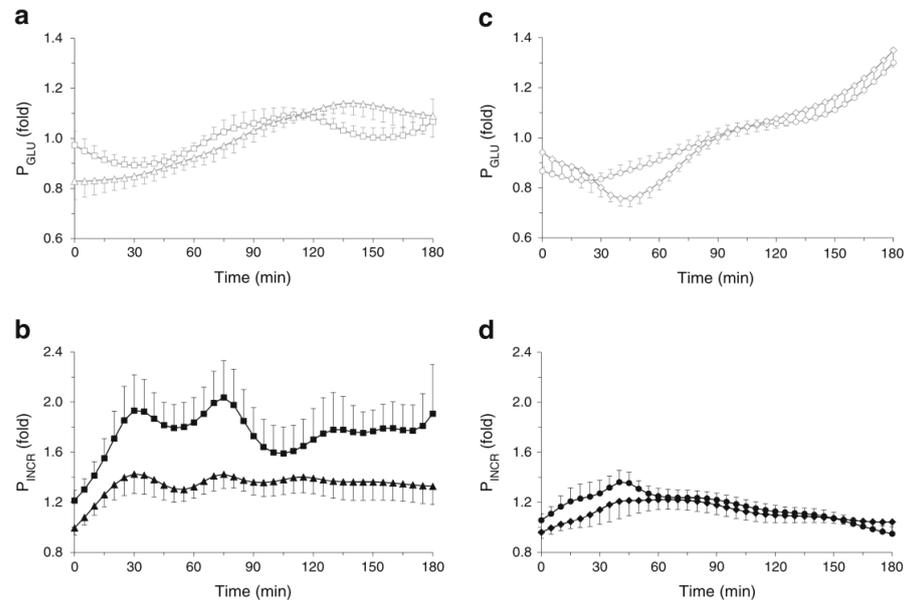


Fig. 4 P_{GLU} during ISO test and L-ISO in non-diabetic volunteers (a), and during ISO test and Acp-ISO study in participants with type 2 diabetes (c). P_{INCR} during the control studies and during the lipid infusion studies in non-diabetic volunteers (b) and during control studies and acipimox studies in participants with type 2 diabetes (d). Non-diabetic

participants: white squares, ISO; white triangles, L-ISO; black squares, OGTT; black triangles, L-OGTT. Diabetic participants: white circles, ISO; white diamonds, Acp-ISO; black circles, OGTT; black diamonds, Acp-OGTT. Data are presented as mean \pm SEM for $n = 10$ non-diabetic participants and $n = 13$ type 2 diabetic participants

taste receptors/cerebral–insular axis. In support of this, neither lipid infusion nor acipimox was associated with any changes in plasma glucagon, GLP-1 or GIP responses in the participants with or without diabetes. The absence of short-term changes in gut hormones agrees with studies in normal volunteers subjected to 1 week of high-fat overeating, in whom glucose tolerance deteriorated, plasma insulin increased but GLP-1 and GIP responses were not modified [23].

Taken together, these findings make it possible to conclude that the direction of the impact of NEFA on incretin effect depends, essentially, on beta cell function: raising NEFA can impair the incretin effect on a normal beta cell but lowering NEFA cannot rescue the incretin effect on a dysfunctional beta cell. In line with the latter result, lipid-induced impairment of beta cell function is not observed in frankly diabetic animals or humans [12]. Obviously, our conclusions apply only to acute changes in NEFA concentration and to the experimental conditions created by these protocols, i.e. they provide proof of concept. In the longer term, the impact of NEFA on beta cell function may be more heterogeneous. For example, Kashyap et al [9] reported that in normal participants a prolonged (4 day) lipid infusion led to mild meal-induced hyperglycaemia and insulin hypersecretion, which was associated with a marked improvement in first-phase insulin secretion. In contrast, opposite responses were observed in

individuals with a family history of diabetes [9]. However, in a similar study, 48 h acipimox treatment improved the acute insulin response to i.v. glucose in individuals with a family history of type 2 diabetes [24]. It must be observed, however, that these studies did not directly assess the incretin effect, which, by definition, requires performing an isoglycaemic protocol. On the other hand, it is pertinent to recall that chronic treatment with a dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitor, sitagliptin [25] or metformin [26], in diabetic individuals did not improve the incretin effect.

The current results align with those of a previous study carried out in a large cohort of non-diabetic individuals [27], which indicated that relatively higher NEFA levels, such as are typically found in type 2 diabetic individuals, are associated with enhanced absolute ISRs and reduced insulin action, but they do not interfere with β -GS, which is the strongest determinant of glucose tolerance.

Several cellular mechanisms may be involved in the impairment of incretin function caused by NEFA exposure. Kang et al reported that, in rat insulinoma INS-1E cells and in isolated islets of *db/db* mice, palmitate decreases the expression and levels of the GLP-1 receptor; this was associated to impairment of: cAMP production, protein phosphorylation of cAMP-responsive elements binding protein (p-CREB) and insulin secretion [18]. A recent very elegant study investigated

the effect of palmitate on the recruitment, by GLP-1, of the beta cell network, which is essential to synchronise rapid increases in glucose-induced insulin secretion. Gap junctions in human beta cells, through connexin 36 (Cx36), are important for incretin-stimulated but not for GSIS [19]. In these human islet preparations, palmitate reduced Cx36 expression and the coordinated secretory activity in response to GLP-1 and GIP, thereby reducing insulin release. Thus, elevated NEFA might disrupt the GLP-1-sensitive syncytium. Chronic mechanisms may involve accumulation of malonyl-coenzyme A (CoA) and long-chain fatty acyl-CoAs, increased fatty acid esterification and activation of endoplasmic reticulum stress in beta cells (reviewed in Giacca et al [12] and Poitout and Robertson [28]). Decreased free fatty acid receptor 1 (GPR40) expression in the beta cell, or its downregulation by NEFA, may contribute to the impaired incretin action observed in diabetes. It is noteworthy that our diabetic participants had higher fasting glucose and marginally higher fasting NEFA concentrations (700 [352] vs 588 [220], $p = 0.12$), a combination that seems to be synergistically toxic to islets [12], where it downregulates GPR40 expression in all cell types [29]. Similar insulin secretion impairment was observed in human islets exposed to palmitate or oleate for 48 h [30]. GPR40 is highly expressed in islets from young normoglycaemic, hyperlipidaemic and prediabetic Zucker diabetic fatty (ZDF) rats (*fal/fa*) even before diabetes development [29]. Furthermore, in rats maintained under hyperglycaemic conditions for 96 h, GLP-1 receptor expression is reduced, and GIP receptor expression is increased [31]. While these mechanisms, alone or in combination, may underlie the effect of raising NEFA into the millimolar range we observed in our non-diabetic participants, a role for the mild but chronic NEFA elevations, commonly found in individuals with type 2 diabetes, to the loss of incretin effect remains to be conclusively demonstrated. The absence of changes in gut hormones across our NEFA manipulations implies that an impaired incretin effect—whether induced in non-diabetic participants or spontaneous in diabetes—is coupled with a degree of cellular resistance to incretins [32]. Interestingly, in a recent study in type 2 diabetic individuals, the clinical efficacy of liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, was related to the baseline plasma triacylglycerols and C-peptide levels [33].

Limitations and strengths These studies were carried out in two centres and the general phenotypes of the two participant groups were different. We chose a very healthy group to test the effects of NEFA, and typical individuals with type 2 diabetes to evaluate a possible improvement in incretin effect after NEFA reduction. The results were not meant to be compared across groups but within groups. Another limitation is the sample size, but the incretin effect, i.e. the main outcome variable of the protocol, was very different after lipid infusion in the non-diabetic participants, and very similar after

acipimox ingestion in the diabetic participants. On the other hand, this is the first study to evaluate the effect of NEFA on the incretin effect in humans with an appropriate protocol. The mathematical model yielded the dynamic characteristics of beta cell function, including the time course of glucose potentiation and the incretin potentiation of insulin secretion.

Acknowledgements We warmly thank F. K. Saraiva and S. Rodovalho, Faculdade de Medicina, Pontificia Universidade Católica de Campinas, for their valuable collaboration. We also thank LC Oliveira and RF Castilho from the Department of Patologia Clínica at the University of Campinas for the laboratory assays.

The results were presented at the EASD 2017 Annual Meeting as oral presentation 197 and poster 512.

Data availability The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding European Foundation for the Study of Diabetes (EFS)/Sanofi Collaborative Program 2015 award to EM; partial support was also provided by a European Medical Information Framework (EMIF) grant (IMI JU GA 115372-2) for Pisa participation. The study sponsors were not involved in: the design of the study; the collection, analysis nor the interpretation of data; writing the report; nor the decision to submit the report for publication.

Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

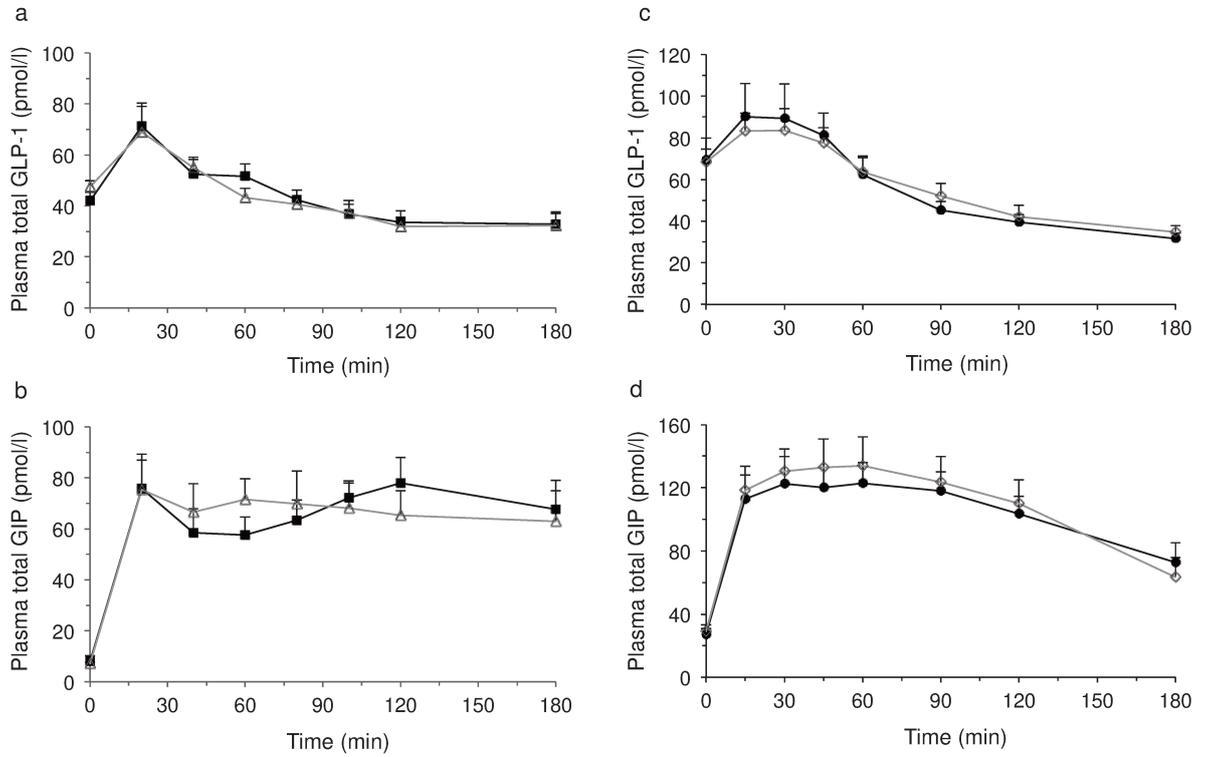
Contribution statement EF, EM, AN and BA designed the protocol. VBC, EM, ALS, BA, RP-M and SMA performed the experimental studies, and acquired the data and participated in its interpretation. VBC, BA and EM wrote the manuscript. AM and AT performed the mathematical modelling. EF and AN discussed and revised the manuscript. All authors reviewed the manuscript critically and approved the final manuscript version. EF and EM are the guarantors of this work.

References

1. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785–789
2. Boden G, Chen X, Iqbal N (1998) Acute lowering of plasma NEFA lowers basal insulin secretion in diabetic and non diabetic subjects. *Diabetes* 47:1609–1612
3. Sako Y, Grill VE (1990) A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and β -cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 127:1580–1589
4. Amery CM, Round RA, Smith JM, Nattrass M (2000) Elevation of plasma fatty acids by ten-hour intralipid infusion has no effect on basal or glucose-stimulated insulin secretion in normal man. *Metabolism* 49:450–454
5. Felber JP, Vannotti A (1964) Effects of fat infusion on glucose tolerance and insulin plasma levels. *Med Exp Int J Exp Med* 10: 153–156
6. Pelkonen R, Miettinen TA, Taskinen MR, Nikkila EA (1968) Effect of acute elevation of plasma glycerol, trygliceride and NEFA levels on glucose utilization and plasma insulin. *Diabetes* 17:76–82
7. Paolisso G, Gambardella A, Amato L et al (1995) Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38:1295–1299

8. Boden G, Chen X, Rosner J, Baron M (1995) Effects of a 48-hour fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* 44:1239–1242
9. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A et al (2003) A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop Type 2 diabetes. *Diabetes* 52:2461–2474
10. Salgin B, Marcovecchio ML, Humphreys SM et al (2009) Effects of prolonged fasting and sustained lipolysis on insulin secretion and insulin sensitivity in normal subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E454–E461
11. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR et al (1998) Lowering fatty acids potentiates acute insulin response in first degree relatives of people with type II diabetes. *Diabetologia* 41:1127–1132
12. Giacca A, Xiao C, Oprea AI, Carpentier AC, Lewis GF (2011) Lipid-induced pancreatic β -cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E255–E262
13. Nauck MA, Homberger E, Siegel E et al (1986) Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 63:492–498
14. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W (1986) Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29:46–52
15. Muscelli E, Mari A, Natali A et al (2006) Impact of incretin hormones on β -cell function in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E1144–E1150
16. Muscelli E, Mari A, Casolaro A et al (2008) Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57:1340–1348
17. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ (2011) Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in T2D: what is up, what is down? *Diabetologia* 54:10–18
18. Kang ZF, Deng Y, Zhou Y et al (2013) Pharmacological reduction of NEFA restores the efficacy of incretin-based therapies through GLP-1 receptor signalling in the β -cell in mouse models of diabetes. *Diabetologia* 56:423–433
19. Hodson DJ, Mitchell RK, Bellomo LA et al (2013) Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human β -cell connectivity. *J Clin Invest* 123:4182–4194
20. Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ (2001) A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 24:539–548
21. Tura A, Muscelli E, Gastaldelli A, Ferrannini E, Mari A (2014) Altered pattern of the incretin effect as assessed by modelling in individuals with glucose tolerance ranging from normal to diabetic. *Diabetologia* 57:1199–1203
22. Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA (1983) Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 72:1737–1747
23. Parry SA, Smith JR, Corbett TR, Woods RM, Hulston CJ (2017) Short-term, high-fat overfeeding impairs glycaemic control but does not alter gut hormone responses to a mixed meal tolerance test in healthy, normal-weight individuals. *Br J Nutr* 117:48–55
24. Cusi K, Kashyap S, Gastaldelli A, Bajaj M, Cersosimo E (2007) Effects on insulin secretion and insulin action of a 48-h reduction of plasma free fatty acids with acipimox in nondiabetic subjects genetically predisposed to T2D. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1775–E1781
25. Muscelli E, Casolaro A, Gastaldelli A et al (2012) Mechanisms for the antihyperglycemic effect of sitagliptin in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2818–2826
26. Vardarli I, Amdt E, Deacon CF, Holst JJ, Nauck MA (2014) Effects of sitagliptin and metformin treatment on incretin hormone and insulin secretory responses to oral and “isoglycemic” intravenous glucose. *Diabetes* 63:663–674
27. Rebelos E, Seghieri M, Natali A et al (2015) Influence of endogenous NEFA on beta cell function in humans. *Diabetologia* 58:2344–2351
28. Poirier V, Robertson RP (2008) Glucolipotoxicity: Fuel excess and β -cell dysfunction. *Endocr Rev* 29:351–366
29. Meidute Abaraviciene S, Muhammed SJ, Amisten S, Lundquist I, Salehi A (2013) GPR40 protein levels are crucial to the regulation of stimulated hormone secretion in pancreatic islets. Lessons from spontaneous obesity-prone and non-obese type 2 diabetes in rats. *Mol Cell Endocrinol* 381:150–159
30. Zhou YP, Grill V (1995) Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1584–1590
31. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR et al (2007) Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* 56:1551–1558
32. Tura A, Bagger JI, Ferrannini E et al (2017) Impaired beta cell sensitivity to incretins in type 2 diabetes is insufficiently compensated by higher incretin response. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 27: 1123–1129
33. Tanabe A, Kaneto H, Kamei S et al (2016) Clinical effects of liraglutide are possibly influenced by hypertriglyceridemia and remaining pancreatic β -cell function in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat* 30:1201–1203

ESM Fig. 1



Plasma concentrations of GLP-1 and GIP during the oral studies in Healthy (n=7), **a** and **b** (OGTT - filled squares and L-OGTT - empty triangles) and in T2D (n=13), **c** and **d**, (OGTT - filled circles and Acp-OGTT - empty diamonds).

APÊNDICE 3

Diabetologia

August 2018, Volume 61, Issue 8, pp 1691–1692 | Cite as

Up front

Effects of acute NEFA manipulation on incretin-induced insulin secretion in participants with and without type 2 diabetes

Brenno Astiarraga, Valéria B. Chueire, Aglécio L. Souza, Ricardo Pereira-Moreira, Sarah Monte Alegre, Andrea Natali, Andrea Tura, Andrea Mari, Ele Ferrannini, Elza Muscelli

In type 2 diabetes, stimulation of insulin secretion by the entry of glucose into the digestive system (i.e. the incretin effect) is impaired. Recent experimental evidence suggests that NEFA might interfere with incretin function. In this issue, Astiarraga, Chueire et al (<https://doi.org/10.1007/s00125-018-4633-z>) tested this hypothesis by exposing individuals without diabetes to an acute rise in NEFA and by lowering NEFA in participants with type 2 diabetes. The results indicate the presence of a clear asymmetry: while elevation of NEFA disrupted the incretin effect in those without diabetes, lowering NEFA in individuals with type 2 diabetes had no effect. Neither beta cell sensitivity to glucose nor plasma incretin hormone concentrations were altered by NEFA manipulation. Whilst modest elevations of NEFA typically observed in type 2 diabetes are unlikely to be solely responsible for reduced beta cell sensitivity to incretins, they may have some role in disease progression; however, this remains to be demonstrated conclusively.

All text supplied by the authors.