

**CICILIA LUIZA ROCHA DOS SANTOS PAIVA**

**EFEITOS DO CAFÉ SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HORMÔNIOS  
INCRETÍNICOS E PEPTÍDEO C: ENSAIO CLÍNICO CRUZADO  
RANDOMIZADO COM ISÓTOPOS ESTÁVEIS**

**BRASÍLIA**

**2018**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CICILIA LUIZA ROCHA DOS SANTOS PAIVA**

**EFEITOS DO CAFÉ SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HORMÔNIOS**  
**INCRETÍNICOS E PEPTÍDEO C: ENSAIO CLÍNICO CRUZADO**  
**RANDOMIZADO COM ISÓTOPOS ESTÁVEIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

**Orientadora: Professora Doutora Angélica Amorim Amato**

**Co-orientadora: Professora Doutora Teresa Helena Macedo da Costa**

**Brasília**

**2018**

*Dedico este trabalho aos dezessete voluntários  
que participaram deste estudo.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pela força, coragem e determinação.

À minha querida mãe, Verônica Rocha, por compreender minha ausência, pelo apoio em todas as fases de minha vida e amor incondicional.

Ao meu querido pai, Geraldo Luiz Ferreira dos Santos, pela atenção, preocupação, carinho e amor, mesmo distante.

Ao meu amado marido, Pedro Henrique Lobo Paiva, por estar sempre ao meu lado, com palavras de incentivo e carinho, desde o vestibular de medicina, e por acreditar no meu potencial de vencer todas etapas de minha vida acadêmica.

Ao meu irmão querido Otávio Luiz Rocha Ferreira dos Santos, minha cunhada Vivian Keli Leite Rocha, e minhas queridas sobrinhas, Katarina Leite Rocha e Lívia Leite Rocha, por entenderem meu curto tempo, mas me proporcionarem um convívio familiar de muita alegria.

À minha querida orientadora, Professora Dra. Angélica Amorim Amato, pela incansável ajuda e orientação, não só como orientadora, mas como amiga, sempre com muita paciência, dedicação e sabedoria.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Teresa Helena Macedo Costa, por ter me inserido no grupo de pesquisa Glicafé, pelos valiosos ensinamentos acadêmicos e científicos, além do empenho para a finalização deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Nutrição da UnB que faziam parte do grupo de pesquisa Glicafé, Professor Dr. Caio Eduardo Gonçalves Reis, Alessandra Gaspar de Sousa, Leandro Faleiros Garcia, Luiz Araújo, pelo trabalho em equipe tanto nos experimentos, como nas discussões e reuniões para preparação dos artigos científicos.

À minha colega e nova amiga Bruna Teles Soares Bezerra, por me ajudar nos trabalhos de bancada, na escrita de artigos e nas apresentações das disciplinas, sempre alegre e companheira.

Ao Professor Dr. José Garrofe Dórea e à Professora Dra. Adriana Lofrano Porto, pelos ensinamentos e participação no Projeto Glicafé.

Ao Werte Chaves, e à enfermeira Rejeane Serrat, pelo auxílio na realização dos experimentos, principalmente nas coletas de sangue.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia molecular, por me acolherem, me ajudarem com programas de computação que eu desconhecia, bem como na bancada com os ensaios laboratoriais.

À estatística, Edina Miazaki, pelas análises estatísticas do projeto em conjunto com à minha co-orientadora, Professora Dra. Teresa Helena Macedo Costa

À minha secretária e amiga, Teresa, por me ajudar a organizar minha casa, pelo apoio e amizade.

À minha querida amiga e sócia Ana Paula, pela grande amizade, carinho e preocupação com este projeto.

Aos queridos amigos, Carolina, Débora, Francisco, Gisela, Henrique, Lenira, Larissa, Jane, Aline, Clarissa, Ana Cláudia e Lia por me proporcionarem momentos de alegria e descontração.

À amiga Consolação, pelo constante apoio em todas etapas de minha vida pessoal, profissional e acadêmica.

Aos colegas e residentes do Hospital de Base, pela compreensão de minha ausência, e apoio nessa etapa de vida acadêmica.

Aos colegas das disciplinas de mestrado, por compartilharem experiências, angústias e alegrias.

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), pela oportunidade de realização do curso.

## RESUMO

**Introdução:** O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e há grande interesse sobre seus efeitos sobre a saúde. Dados de estudos epidemiológicos prospectivos e de metanálises indicam que o consumo regular de café, em longo prazo, está associado à redução de risco de diversas condições clínicas, entre elas o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Neste contexto, parece haver contribuição dos hormônios gastrointestinais incretínicos, como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o polipeptídeo inibitório gástrico ou polipeptídeo insulínico dependente da glicose (GIP). **Objetivo:** O presente estudo investigou, em homens jovens e saudáveis, o efeito do consumo de café com e sem açúcar e do café descafeinado, em condições basais, pós sobrecarga oral de glicose e durante o teste de estimulação intravenosa com glicose marcada (*Oral Dose Intravenous Label Experiment*, ODILE), sobre a concentração sérica de GLP-1, GIP e peptídeo C. **Métodos:** Foi conduzido um ensaio clínico randomizado, cruzado, monocego (pesquisadores) em que 17 voluntários saudáveis e consumidores habituais de café participaram de cinco intervenções: ingestão de café cafeinado com açúcar (CS), café cafeinado sem açúcar (CC), café descafeinado (DC), e 2 controles - água com açúcar (WS) e água sem açúcar (W). A avaliação foi feita em dois cenários: em condição basal (após administração da bebida teste e antes da administração da sobrecarga oral de glicose) e pós sobrecarga oral de glicose. Além disso, foi utilizado um procedimento misto (PROC MIXED) para comparar os efeitos das bebidas teste sobre as variáveis estudadas, sendo adotado, neste modelo, o sujeito como efeito aleatório e o tempo como medida repetida. **Resultados:** Em condições basais, o CS aumentou, o CC e o DC não modificaram a concentração sérica de GLP-1 em relação aos seus respectivos controles. O CS, o CC e o DC não modificaram a concentração sérica de GLP-1 em resposta à sobrecarga oral de glicose. Em condições basais, o CS reduziu, o CC e o DC não modificaram a concentração sérica de GIP em relação aos seus respectivos controles. O CS aumentou, o CC e o DC não modificaram a concentração sérica de GIP em resposta à sobrecarga oral de glicose. Em condições basais, o CS reduziu, o CC e o DC não modificaram a concentração sérica de peptídeo C em relação aos seus respectivos controles. O CS aumentou, o CC e o DC não modificaram a concentração sérica de peptídeo C em resposta à sobrecarga oral de glicose, quando comparado com os respectivos controles. Entretanto, o DC promoveu menor concentração sérica de peptídeo C quando comparado ao CC. A análise dos dados com o procedimento de modelo misto com o sujeito como efeito aleatório e o tempo como medida repetida para comparar os efeitos das bebidas não mostrou modificações significativas na concentração sérica de GLP-1, GIP ou peptídeo C em resposta às bebidas testadas, quando comparadas aos seus controles. **Conclusão:** O efeito discreto do café sobre a secreção de GLP-1 e GIP sugere que os benefícios do consumo da bebida sobre a homeostase da glicose não tenham contribuição significativa de modificações da liberação de hormônios incretínicos. Além disso, o efeito do café descafeinado, embora discreto, de reduzir a concentração sérica de peptídeo C em resposta a sobrecarga oral de glicose, quando comparado ao café cafeinado, indica que essa preparação de café possa melhorar a sensibilidade à insulina, em consistência com dados de estudos prévios.

**Palavras-chave:** café cafeinado e café descafeinado, incretínicos, *diabetes mellitus* tipo 2

## ABSTRACT

**Introduction:** Coffee is one of the most consumed beverages worldwide and there is great interest in understanding its effects on health. Data from prospective epidemiological studies and meta-analyses indicate that long-term regular coffee consumption is associated with reduced risk of various clinical conditions, including type 2 diabetes mellitus (DM2). Although the mechanisms underlying this are not completely understood, incretin gastrointestinal hormones, such as glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and gastric inhibitory polypeptide or glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), may play a role. **Objective:** The present study investigated the effect of coffee with and without sugar and decaffeinated coffee, in both basal conditions and during the insulin sensitivity test assessed by stable isotopes with oral glucose administration (ODILE), on the serum levels of GLP-1, GIP and C-peptide. **Methods:** A randomized, crossover, single-blind clinical trial (researchers) was conducted in which 17 healthy volunteers who were habitual coffee consumers participated in five interventions: ingestion of caffeinated coffee with sugar (CS), caffeinated coffee without sugar (CC), decaffeinated coffee (DC), and 2 controls - water with sugar (WS) and water without sugar (W). The evaluation was performed in two scenarios: baseline (after administration of the test drink and before administration of oral glucose overload) and oral glucose overload. In addition, a mixed procedure (PROC MIXED) was used to compare the effects of the test beverages on the studied variables. In this model, the subject was adopted as a random effect and time as a repeated measure. **Results:** At baseline, CS increased, CC and DC did not change the serum levels of GLP-1 when compared with its respective controls. CS, CC and DC did not modify the serum levels of GLP-1 in response to oral glucose overload. In basal conditions, CS reduced, CC and DC did not modify the serum levels of GIP when compared with its respective controls. CS increased, and CC and DC did not modify the serum levels of GIP in response to oral glucose overload. At baseline, CS reduced, CC and DC did not modify the serum levels of C-peptide when compared with its respective controls. CS increased, CC and DC did not change the serum C-peptide levels in response to oral glucose overload when compared to their controls. However, DC promoted a lower serum C-peptide concentration when compared to CC. Data analysis using the PROC MIXED model did not indicate significant changes in GLP-1, GIP or C-peptide levels in response to any of the beverages tested. **Conclusion:** The slight effect of coffee on GLP-1 and GIP serum levels suggests that the benefits of this beverage consumption on glucose homeostasis do not have a significant contribution of modifications of incretin hormones release. In addition, the effect of decaffeinated coffee to reduce serum C-peptide concentration in response to oral glucose overload, when compared to caffeinated coffee, indicates that this coffee preparation may improve insulin sensitivity, consistent with data from previous studies.

**Keywords:** caffeinated coffee, decaffeinated coffee, incretins, type 2 diabetes mellitus

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Fluxograma do estudo

**Figura 2.** Esquema de periodicidade das coletas de dados do estudo Glicafé

**Figura 3.** Esquema de coleta dos hormônios incretínicos GLP-1, GIP e do Peptídeo C durante o procedimento de ODILE

**Figura 4.** Resposta do peptídeo C após o consumo de café cafeinado com açúcar e água com açúcar.

**Figura 5.** Resposta do GLP-1 após o consumo de café cafeinado com açúcar e água com açúcar.

**Figura 6.** Resposta do GIP após o consumo de café cafeinado com açúcar e água com açúcar.

**Figura 7.** Resposta do peptídeo C após o consumo de café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água.

**Figura 8.** Resposta do GLP-1 após o consumo de café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água.

**Figura 9.** Resposta do GIP após o consumo de café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água.



## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Efeito do consumo do café e de seus componentes sobre doenças

**Quadro 2.** Classificação do diabetes Mellitus

**Quadro 3.** Anti-hiperglicemiantes utilizados no tratamento do DM2.

**Quadro 4.** Quantidades em mg/g de cafeína, das frações 3-, 4-, 5 e totais dos ACG.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Métodos utilizados para determinação das variáveis bioquímicas e suas características

**Tabela 2.** Características basais dos sujeitos do estudo (n= 17)

**Tabela 3.** Média dos mínimos quadrados dos parâmetros metabólicos em cada grupo de tratamento

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1c- hemoglobina glicada

ACG- ácidos clorogênicos

AGL- ácidos graxos livres

AMPc- monofosfato de adenosina cíclico

AMPK- 5' proteína quinase adenosina monofosfato ativada

ANOVA- análise de variância unidirecional

AVC- acidente vascular isquêmico

B-Y método - método Benjamin-Yekutieli

CS- café cafeinado com açúcar

CC- café cafeinado sem açúcar

CQA- ácidos cafeoilquínicos totais

3-, 4-, 5- CQA frações- 3-, 4-, 5- frações dos ácidos cafeoilquínicos

CV: cardiovascular

CYP1A2- enzima do citocromo P450 1A2

DASH- Dietary Approaches to Stop Hypertension

DC- café descafeinado

DLP- dislipidemia

DM- Diabetes Mellitus

DM1- Diabetes mellitus tipo 1

DM2- Diabetes mellitus tipo 2

DMG- diabetes gestacional

DPP-IV- enzima dipeptidil peptidase-4

ELAM-1- molécula de adesão leucocitária endotelial-1

ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática

FAS- ácido graxo sintase

GIP- polipeptídeo inibitório gástrico ou polipeptídeo insulino-trópico dependente da glicose

GLP-1- peptídeo semelhante ao glucagon 1

GLP-1R- receptor de GLP-1

GLUT2- transportador de glicose tipo 2

GLUT4- transportador de glicose tipo 4

GPCRs- receptores acoplados à proteína G

HAS- hipertensão arterial sistêmica

HDL- concentração de lipoproteína de alta densidade

HMGCo-A redutase- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

IAM- infarto agudo do miocárdio

IAPP- polipeptídeo amiloide da ilhota

ICC- insuficiência cardíaca.

IGF-1- fator de crescimento semelhante à insulina 1

IGT- tolerância oral à glicose diminuída

IL- interleucina

K<sub>ATP</sub>- canais de potássio ATP-sensíveis

IKK- quinases inflamatórias kB quinase

IMC- índice de massa corporal

IRC- insuficiência renal crônica

IRS -1- substrato 1 do receptor de insulina

IRS-2- substrato do receptor de insulina-2

ITU- infecção do trato urinário

Kir6.2- canal de potássio 6.2

LADA- Diabetes auto-imune latente do adulto

LDL- colesterol na lipoproteína de baixa densidade

MAP quinase- proteíno-quinases ativadas por mitógenos

MCP-1- proteína quimiotática de monócitos-1

MODY- Maturity-Onset Diabetes of the Young

NF-Kb- fator nuclear kappa B

NMP- N-metilpiridínio

Nrf2/ARE- fator de transcrição relacionado ao eritrócito nuclear 2 ligado ao elemento de resposta antioxidante

ODILE- *Oral Dosing Intravenous Labeled Experiment*

PA- Pressão Arterial

PAI-1- inibidor do ativador do plasminogênio-1

PCR- proteína C reativa

PCR-as- proteína C reativa de alta sensibilidade

Pdx-1- homeobox pancreático e duodenal 1

PKA- proteína quinase A

PPAR- $\alpha$ - receptor ativado por proliferadores peroxissomais alfa

PPAR- $\gamma$ -receptor ativador por proliferadores peroxissomais gama

PROC MIXED- análise de dados de medidas repetidas com procedimento misto

RFU- unidade de fluorescência relativa

SEM- erro padrão da média

SD- desvio padrão

SGLT1- co transportador intestinal de sódio e glicose

SGLT2- co-transportador renal de sódio e glicose

SHBG- globulina ligadora de esteroides sexuais

SM- síndrome metabólica

SOCS- membros supressores de sinalização de citocinas

SNC- sistema nervoso central

SUR1- receptor de sulfonilureia-1

TG- triglicerídeos

TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1- molécula de adesão celular vascular-1

W- água sem açúcar

WS- água com açúcar

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO-----	18
2 REVISÃO DE LITERATURA-----	22
2.1 CAFÉ E SEUS BENEFÍCIOS SOBRE A SAÚDE-----	22
2.1.1 Visão geral-----	22
2.1.2 Efeito do consumo de café sobre a sensibilidade à insulina-----	31
2.1.3 Efeito do consumo do café sobre a mortalidade-----	35
2.2 DIABETES MELLITUS-----	36
2.2.1 Epidemiologia-----	36
2.2.2 Classificação do diabetes mellitus-----	37
2.2.3 Fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2-----	38
2.2.4 Tratamento do DM2-----	45
2.3 O SISTEMA INCRETÍNICO-----	52
2.3.1 Fisiologia-----	52
2.3.2 Papel do sistema incretínico no DM2-----	60
3 JUSTIFICATIVA-----	65
4 OBJETIVO-----	66

5. MATERIAL E MÉTODOS-----	67
5.1 ASPECTOS ÉTICOS-----	67
5.2 SUJEITOS DO ESTUDO-----	67
5.2.1 Critérios de inclusão-----	67
5.2.2 Critérios de exclusão-----	68
5.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO-----	71
5.4 PROCEDIMENTOS-----	72
5.5 PROCEDIMENTOS EM CASO DE EMERGÊNCIA-----	75
5.6 PREPARAÇÃO DAS BEBIDAS TESTE-----	75
5.7 ANÁLISE DO CAFÉ -----	76
5.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA INGESTÃO ALIMENTAR-----	77
5.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS-----	78
5.9.1 Procedimentos do ensaio-----	78
5.9.2 Cálculo da concentração dos hormônios incretínicos e peptídeo C-----	82
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	83
6. RESULTADOS-----	85
6.1 CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS DO ESTUDO-----	85
6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS BEBIDAS ADOÇADAS E DAS BEBIDAS SEM AÇÚCAR SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLICOSE, INSULINA, PEPTÍDEO C, GLP-1 E GIP-----	86
6.2.1 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica de	



glicose e insulina-----	<b>87</b>
6.2.2 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica de peptídeo C-----	<b>88</b>
6.2.3 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GLP-1-----	<b>89</b>
6.2.4 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GIP-----	<b>90</b>
6.2.5 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica de glicose e insulina-----	<b>91</b>
6.2.6 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica de peptídeo C-----	<b>92</b>
6.2.7 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GLP-1-----	<b>93</b>
6.2.8 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GIP-----	<b>93</b>
7. DISCUSSÃO-----	<b>97</b>
8. CONCLUSÃO-----	<b>107</b>
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	<b>108</b>
10. APÊNDICES-----	<b>120</b>
11. ANEXO-----	<b>130</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Como o café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, há um grande interesse sobre seus reais benefícios e possíveis associações negativas com diversas doenças de impacto na saúde pública (1-4). Anteriormente, seu consumo não era visto como um hábito saudável (3), em razão das propriedades estimulantes de um dos seus constituintes mais conhecidos, a cafeína (5, 6). Entretanto, o café é rico em compostos com outras atividades biológicas (5). Esses compostos se apresentam na sua forma natural ou são formados durante o processo de torra (7) e muitos possuem ação antioxidante e anti-inflamatória (1, 5), como os ácidos clorogênicos, magnésio- como co-fator de enzimas do sistema antioxidante-, lignanas (8), quinides, trigonelina (9) e o N-metilpiridínio (NMP), gerado pela torra desse último (10). Além desses, há também os diterpenos, como o caveol e cafestol, que apesar de possuírem atividade anti-inflamatória (11) e anti-carcinogênica em animais e *in vitro* (12), podem promover elevação do colesterol total e do colesterol na lipoproteína de baixa densidade (LDL) (1), quando o café é consumido na forma não filtrada (12, 13).

Atualmente, estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais estão sendo realizados para investigar os efeitos do café sobre a mortalidade, doenças cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicas, oncológicas e endocrinológicas, como síndrome metabólica (SM) e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (11). A redução da inflamação subclínica e do estresse oxidativo poderiam ser os responsáveis pelas associações entre o consumo de café (14-16) e menor risco de aparecimento, além do agravamento de diversas doenças (5, 7).

Em curto prazo, o consumo de café promove um aumento do estado de alerta mental, melhora de alguns aspectos da cognição e do desempenho atlético (11, 12, 17). Em contrapartida, a ingestão de quantidade elevada de café de 4-5 xícaras por dia correspondente a mais 400 mg de cafeína por dia – está associada a cefaleia, ansiedade, tremores e insônia. O uso crônico determina menor sensibilidade aos efeitos adversos comportamentais da

cafeína. Em longo prazo, também, são observados efeitos benéficos dose-dependentes do consumo de café (17). Este é associado a redução do risco de doença de Parkinson, doença de Alzheimer, cirrose alcoólica, progressão da hepatite C avançada (6) e gota. (17) Entretanto, cronicamente o consumo de café está associado a baixa densidade mineral óssea, quando superior a mais de quatro xícaras por dia, principalmente nas mulheres com baixa ingestão de cálcio (17). Também é observada maior frequência de eventos coronários e arrítmicos em indivíduos suscetíveis, em associação com o maior consumo de café, embora a ingestão da bebida não seja considerada um fator de risco para a doença arterial coronariana em longo prazo (6, 17). A associação do consumo do café com o risco de câncer também é controversa, na medida em que alguns estudos descrevem resultados inconclusivos, alguns, aumento do risco e outros, efeito protetor de vários tipos de câncer (17-19). Entretanto, a maioria dos estudos demonstra que pode haver uma relação moderadamente inversa entre o consumo de café e todas as causas de mortalidade (17, 20, 21), principalmente se o consumo for de 2 a 4 xícaras por dia (6).

O consumo de café cafeinado ou descafeinado está relacionado a um menor risco de DM (6, 17, 22). Além disso, há um possível efeito do café em promover perda de peso (6, 10, 23), sendo esse efeito associado a um aumento da taxa metabólica basal, da lipólise, do gasto energético (12), da glicogenólise muscular (6, 10, 24), além de um provável papel na regulação da fome e apetite (10), promovidos tanto pela cafeína (24) quanto pelos outros compostos bioativos (6, 10).

A SM é definida como a presença de no mínimo três das cinco seguintes condições: glicemia de jejum elevada, obesidade abdominal, elevação da pressão arterial, elevação dos triglicerídeos e baixa concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL). Acomete 20-25% da população adulta mundial e está associada a inflamação de baixo grau, aumento de doenças cardiovasculares, bem como a maior risco de alguns tipos de câncer (24, 25). O DM2 é um dos componentes mais importantes da síndrome (24, 25). Sua prevalência mundial é de 425 milhões e esse número aumentará para cerca de 642 milhões em 2040 (26). Além disso, estima-se que 46% dos casos de

diabetes em adultos não sejam diagnosticados. Na maioria dos países desenvolvidos, quando se analisa apenas a causa básica do óbito, verifica-se que o diabetes está entre a quarta e oitava principais causas (26).

Os principais componentes fisiopatológicos do DM2 são a resistência à insulina e a disfunção das células beta pancreática, que levam a uma secreção deficiente de insulina (27). A hiperglicemia e glicolipototoxicidade desencadeadas por essas duas disfunções promovem um estresse oxidativo crônico (28) e ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como a via do fator nuclear NF-KB (29). Essas alterações, por sua vez, contribuem para as lesões teciduais e conseqüentemente complicações crônicas do DM2 (28).

Em relação à insulina, é importante mencionar que a clivagem da pró-insulina origina a insulina e o peptídeo C, sendo que o peptídeo C é uma das medidas de função secretória da célula beta (30).

Conforme revisado por Hamid Akash e cols (11), o consumo regular de café pode reduzir significativamente a expressão de marcadores de pró-inflamatórios, como a interleucina (IL) -1b, IL-6, IL-18, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína C reativa (PCR), a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão leucocitária endotelial-1 (ELAM-1), além de vários marcadores de estresse oxidativo. Por sua vez, seu consumo pode aumentar a expressão de adiponectina, IL-4 e IL-10, todos com ação anti-inflamatória (11).

Os ácidos clorogênicos (ACG), segundo componente mais abundante do café, bem como a trigonelina, magnésio promovem melhora do perfil glicídico e/ou lipídico (11, 12, 31, 32).

Dados de estudos epidemiológicos prospectivos e de metanálise demonstram que o consumo de café e/ou cafeína, em curto prazo, pode promover piora da resistência à insulina, por bloqueio do receptor de adenosina A1 e aumento da secreção de epinefrina, com conseqüente redução da captação de glicose pelo músculo esquelético (11). Em contraste, o consumo em longo prazo está associado a melhora da sensibilidade à insulina, de forma dose dependente (11, 22). Esta ação parece ter a contribuição de hormônios

gastrointestinais incretínicos, como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o polipeptídeo inibitório gástrico ou polipeptídeo insulínico dependente da glicose (GIP). Estes hormônios são produzidos em resposta à presença e/ou absorção de glicose intestinal, sendo também estimulados pelos ACG (12).

Os hormônios incretínicos GLP-1 e GIP são liberados pelas células enteroendócrinas intestinais em resposta à absorção de nutrientes e estimulam a secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans pancreáticas, caracterizando seu efeito incretínico ou insulínico (33-38). Em conjunto, o efeito insulínico do GIP e do GLP-1 determinam entre 25-70% do total de secreção de insulina em resposta à ingestão de glicose/refeição em indivíduos saudáveis, a depender da quantidade de glicose ingerida (35-38). Tanto o GLP-1 como o GIP são rapidamente degradados pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-IV) (33, 34, 36); com isso, a meia-vida plasmática desses hormônios é de apenas 1-2 minutos (36, 37). Outras funções do GLP-1 incluem a inibição da secreção de glucagon (34, 36, 37), do esvaziamento gástrico e apetite (34, 36, 37), além de melhora da sensibilidade periférica à insulina (36).

Considerando a importância dos hormônios incretínicos na homeostase da glicose e os efeitos benéficos do café sobre o risco de DM2, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de diferentes preparações de café na concentração sérica de hormônios incretínicos e peptídeo C. Cabe destacar que este estudo é parte de um projeto mais abrangente, que envolveu a avaliação destas diferentes preparações de café sobre a glicemia, insulinemia e sensibilidade insulínica (39), e também de uma revisão sistemática da literatura que investigou o efeito do café e da cafeína sobre a concentração sérica de marcadores inflamatórios (40).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CAFÉ E SEUS BENEFÍCIOS SOBRE A SAÚDE

#### 2.1.1 Visão geral

A visão global sobre o consumo de café está sendo modificada ao longo dos anos (41). Anteriormente, a bebida era vista como prejudicial à saúde (41, 42), porém, atualmente, diversos estudos, principalmente observacionais (41, 42) do tipo transversal, caso-controle ou de coorte, e também revisões sistemáticas e metanálises (42), têm demonstrado um provável benefício (41, 42). Assim, por esse motivo, e por ser uma bebida de amplo consumo mundial (42), há um grande interesse sobre quais seriam essas implicações favoráveis na saúde humana (41, 42), bem como se haveria algum efeito desfavorável (42).

O café promove diversos efeitos sistêmicos, entre eles: no sistema neuropsiquiátrico, cardiovascular, endócrino, gastrointestinal e osteomuscular, além de interferir na fisiopatologia de certas doenças, como a resistência à insulina (17, 42), e nos desfechos relacionados à gravidez (42). Além disso, seu consumo está sendo estudado em relação a vários tipos de câncer e na mortalidade por todas as causas (17, 42).

O impacto na saúde que o consumo de café promove pode ser modificado por fatores genéticos (17, 42), microbiota intestinal (42, 43), idade, sexo, medicamentos e outras exposições ambientais (17). Além disso, a variedade de grão de café utilizado (*Arabica versus Robusta*), o grau de torrefação e o método de preparo terão influência na composição química final da bebida (42, 43). Esses fatores, em conjunto, determinarão a biodisponibilidade e o tipo de metabólitos do café a que um indivíduo será exposto (42).

O café é uma mistura complexa de centenas de compostos fitoquímicos (42, 43), entre eles os ácidos clorogênicos, a cafeína, a trigonelina, os

diterpenos (42, 43) e as melanoidinas (43). Essas substâncias teriam efeitos terapêuticos potenciais, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antifibrótica ou anticancerígena (42), os quais poderiam estar associados aos benefícios à saúde promovidos por essa bebida (42, 43).

Os ácidos clorogênicos (ACG) são os polifenóis ou compostos fenólicos mais abundantes no café, que possuem importante ação antioxidante (41-43). Eles constituem uma família de ésteres constituídos por ácidos trans cinâmicos, principalmente o ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido quínico (41). Além disso, os ACG possuem 3 isômeros: 3-ACG, 4-ACG, 5-ACG, sendo esse último o isômero mais frequente (41, 43). Uma única porção de café fornece entre 20 e 675 mg de ACG, a depender do tipo de torrefação e do volume consumido. (41). Esses polifenóis inibem a metilação do DNA de uma maneira dose-dependente, evitando a regulação negativa da expressão de proteínas supressoras tumorais e enzimas de reparo do DNA envolvidas na carcinogênese (43, 44). Foi observado, em estudo *in vitro* com células hepáticas de roedores, a indução de enzimas que promovem desintoxicação, como a glutatona S-transferase (43, 45).

Além disso, os ACG podem estar envolvidos na redução de risco cardiovascular possivelmente por mecanismos envolvendo efeitos antitrombóticos e ações favoráveis no metabolismo da glicose, conforme revisado por Cano-Marquina e cols (41) e Ludwig e cols (43). Os ACG atuam como antitrombóticos por reduzir a atividade plaquetária *in vitro* e diminuir a P-selectina em estudos com animais (43). Por outro lado, esses compostos estariam associados ao aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína, porém a correlação entre esse aminoácido e risco cardiovascular não está bem definida em humanos (41, 46). Outras funções descritas para os ACG em estudos *in vitro* são a inibição da absorção de glicose, por bloqueio direto dos transportadores SGLT1 (co-transportador intestinal de sódio e glicose) ou GLUT2 (transportador de glicose 2) ou indiretamente, ao reduzir a liberação de glicose a partir de dissacarídeos ou polissacarídeos ingeridos (43). Além disso, foi demonstrado supressão do pico de glicemia plasmática pós-prandial e regulação das concentrações dos hormônios incretínicos em alguns

estudos em humanos (43). A maioria moléculas absorvidas de ACG provenientes do café não mantêm sua estrutura original, com isso, os efeitos teciduais são provavelmente mediados por metabólitos desses compostos fenólicos – hidroxicinamato - que são gerados na parede do intestino delgado e/ou sistemicamente após absorção no intestino grosso (41, 43). O metabolismo dos ACG ocorre principalmente no cólon, pela microbiota intestinal (41).

O café é o produto alimentício que contém maior concentração de cafeína, uma das substâncias mais estudadas na literatura (41). A cafeína é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal (43) e sofre desmetilação no fígado por meio da enzima do citocromo P450 1A2 (CYP1A2) (41, 43, 47), sendo que menos de 5 % é excretado de forma inalterada na urina (48). A principal via metabólica é através da formação de paraxantina (1,7-dimetilxantina), levando aos principais metabólitos urinários, 1-metilxantina, ácido 1-metilúrico e um derivado acetilado de uracila (48). Uma via secundária envolve a formação de teofilina e teobromina (48). Variantes genéticas que alteram a atividade da enzima CYP1A2 estão associados a retardo do metabolismo da cafeína, bem como prolongamento de sua meia-vida (47). Os polimorfismos genéticos na via CYP1A2 podem, em parte, explicar inconsistências nos estudos de café e seus efeitos sobre a saúde (17).

A meia-vida média da cafeína no plasma de adultos é de cinco horas (41, 43, 48), podendo variar entre três a sete horas. Em crianças, a meia-vida é mais curta, entre três a quatro horas, podendo aumentar em gestantes no último trimestre em até duas vezes, sendo também prolongada em mulheres usuárias de anticoncepcional e hepatopatas (48). Além disso, a taxa de eliminação pode variar intensamente entre os indivíduos (48). A cafeína é distribuída em todos os compartimentos do corpo; atravessa a placenta e passa para o leite materno (48). Uma xícara de café contém aproximadamente entre 50 a 100 mg de cafeína (43), sendo que essa quantidade pode variar de acordo com o grau de torrefação dos grãos - podendo essa diferença chegar a 6 vezes por porção de café (43) - e o modo de preparo do café (41). Esses dois



fatores podem dificultar a avaliação da ingestão de cafeína em uma população (43).

A cafeína exerce vários efeitos fisiológicos, por meio do antagonismo dos receptores de adenosina do tipo A1 e A2 ( $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ ) (41, 43, 49) Esses receptores estão expressos na maioria dos tecidos, incluindo o sistema nervoso central, o endotélio vascular, coração, fígado, tecido adiposo e músculo (41). Os receptores A1 estão localizados principalmente no hipocampo, córtex cerebral e cerebelar e certos núcleos talâmicos, enquanto os receptores A2 são localizados nas regiões com alta concentração de dopamina (43). O bloqueio dos receptores A2 está associado a aumento da ação da dopamina, que promove efeito estimulante no sistema nervoso central (SNC) (43, 49), podendo levar a propriedades viciantes da cafeína (43).

A cafeína também interage sinergicamente com os neurotransmissores do sistema nervoso simpático, como a adrenalina e noradrenalina (43, 49). Com isso, a cafeína, por ser uma substância estimulante, promove maior alerta, redução da fadiga e vigília por períodos prolongados (43), bem como melhora do humor, da função cognitiva e resistência durante a prática de exercícios prolongados (50, 51). Além disso, foi demonstrado que em longo prazo ela melhora a consolidação da memória (43). Entretanto, esses efeitos nos receptores de adenosina podem contribuir para os efeitos nocivos da cafeína, como aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, maior excitação e ansiedade, incluindo tremores, insônia, cefaleia, palpitação e nervosismo (43). Essas reações adversas podem variar entre os indivíduos, devido a variações genéticas de suscetibilidade (43), bem como por tolerância a esses efeitos em consumidores regulares de café (17, 43). Além de ações no SNC e sistema cardiovascular, a cafeína promove modificações no sistema endócrino, como no metabolismo de carboidratos (41) e aumento da taxa metabólica (41, 43), atuando também em mecanismos inflamatórios (41), antioxidantes (42, 43) e promovendo aumento de diurese (41).

A trigonelina é um alcaloide de piridina encontrado em quantidades substanciais no café. Durante o processo de torrefação, a trigonelina é parcialmente degradada a ácido nicotínico ou niacina, em N-metilpiridínio

(NMP) e em vários derivados de piridina (43). Os níveis de trigonelina podem variar a depender da variedade de café – sendo encontrada em quantidade um pouco maior no Arábica em relação ao Robusta –, do grau de torrefação, bem como do método de preparo do café (43). A trigonelina possui ação hipoglicemiante (12), neuroprotetora, estrogênica (funcionando de forma similar a um fitoestrógeno), anti-bacteriana, inclusive com efeitos anticariogênicos, porém seu efeito anticarcinogênico é controverso (43). Em roedores, foi evidenciado que esse composto regula as principais enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídios, com aumento da atividade da glicoquinase, glicose-6-fosfatase e carnitina palmitoil transferase, e redução da atividade da sintase de ácidos graxos (12, 43). Além disso, foi observado que a trigonelina protege roedores contra atrofia axonal e dendrítica, de forma dose dependente, em modelo de lesão induzida pela neurotoxina peptídeo beta amiloide (43).

Os diterpenos, como o caveol e cafestol (41, 43) conferem o gosto amargo ao café (43). A quantidade desse composto presente na bebida depende do modo de preparo (41, 43). Assim, o café não filtrado possui as maiores quantidades de diterpenos, enquanto que o processo de filtração imediatamente antes de servir a bebida (41, 43) ou durante o processo de fabricação do pó de café solúvel (43) remove quase que completamente os diterpenos (41, 43). O café espresso tem uma quantidade intermediária, provavelmente, por conta das menores porções que são servidas ou pelo rápido contato da água com o café (41, 43). A presença de diterpenos tem sido implicado na elevação do colesterol sérico (41, 43). Em estudos *in vitro*, foi observado que o cafestol poderia levar a aumento significativo da secreção de insulina (células de insulinoma) e também da captação de glicose (células musculares esqueléticas), mesmo nas baixas concentrações presentes no café filtrado (12). Ademais, os diterpenos possuem papel anticarcinogênico, na medida que induzem enzimas relacionadas à desintoxicação e regulam as vias de sinalização Nrf2/ARE (fator de transcrição relacionado ao eritrócito nuclear 2 ligado ao elemento de resposta antioxidante), aumentando, assim, resposta endógena contra processos oxidativos intracelulares (52).

O café é uma das principais fontes dietéticas de melanoidinas. São produtos de torrefação que podem ser considerados como fibra alimentar, sendo não digeridos e, com isso, fermentados no intestino. A quantidade desses compostos que chega ao intestino grosso é em torno de 0,5 a 2,0 gramas por dia, após consumo moderado a intenso de café. Considerando que a recomendação diária de ingestão de fibra alimentar solúvel é de 10 gramas, as melanoidinas poderiam contribuir significativamente para a melhor saúde do cólon (43). Esses compostos podem também estar envolvidos em atividades antioxidante e antimicrobiana por meio de quelação de metais (12, 43), anti-cariogênica e de modulação de flora colônica, bem como melhora da motilidade gastrointestinal (43).

Quadro 1. Efeito do consumo do café e de seus componentes sobre doenças.

Doença	Observações
Doenças neurológicas	
Doença de Parkinson	<p>Redução do risco (42, 53-57)</p> <p>Ação independente (observada após ajuste para outros fatores de risco)</p> <p>Efeito dose-resposta</p> <p>Associação mais forte em homens vs mulheres</p> <p>Efeito protetor superior do café cafeinado vs descafeinado</p> <p>Papel protetor da cafeína</p> <p>Aumento do risco (58, 59)</p> <p>Mulheres no período pós-menopausa em terapia estrogênica</p>
Doença de Alzheimer	<p>Redução do risco (42, 60)</p> <p>Efeito leve (42, 60, 61)</p> <p>Efeito corroborado por estudos em modelos animais (62)</p> <p>Antagonismo dos receptores de adenosina atenua dano causado pela proteína beta-amiloide (61)</p> <p>Possibilidade de contribuição da melhora da sensibilidade à insulina em resposta ao consumo de café (61)</p> <p>Redução do estresse oxidativo (60)</p>
Doenças psiquiátricas	
Transtorno de ansiedade	Efeito desfavorável, porém, inconclusivo (63, 64)

Transtorno de pânico	Efeito desfavorável, porém inconclusivo (64)
Depressão	Efeito desfavorável, porém inconclusivo (64) Efeito benéfico (65, 66) Menor taxa de suicídio (67) Possíveis mecanismos: modulação dopaminérgica, colinérgica e serotoninérgica (65, 66), efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (66)
Comportamento antissocial	Efeito desfavorável, porém inconclusivo (64)
Abuso de substâncias	Efeito desfavorável, porém inconclusivo (64)
Doenças cardiovasculares	
Infarto do miocárdio	Efeito desfavorável da cafeína (47, 48) Possíveis mecanismos: ação inotrópica positiva por inibição da fosfodiesterase e por inibição dos receptores de adenosina; aumento da liberação de catecolaminas; aumento da concentração de cálcio intracelular e da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (48)
Fibrilação atrial	Efeito protetor em consumidores habituais de café (68) Possível mecanismo: efeito anti-fibrótico na musculatura cardíaca; efeitos adrenérgicos atenuados pelo consumo habitual (68)
Arritmias cardíacas	Efeito neutro do consumo regular de café ou de doses moderadas de cafeína (< 400 mg/d ou 5 xícaras/d) (42, 69-76) Efeito arritmogênico de doses elevadas de cafeína (48)
Pressão arterial	Efeito agudo de aumentar a PA em consumidores não regulares (77-79), sobretudo hipertensos (80) e idosos (81); efeito neutro em consumidores regulares (42, 77, 79, 82, 83) Efeito neutro do consumo crônico de café descafeinado (42, 77) Possíveis mecanismos: ação da cafeína e outros componentes (36); influência do perfil de metabolização da cafeína (84)
Ação diurética	Efeito agudo de estimular a diurese em consumidores não regulares, porém não em consumidores regulares (85)
Rigidez aórtica	Efeito agudo em aumentar a rigidez aórtica, sinérgico com tabagismo (86)
Perfil lipídico	Efeito neutro do café filtrado e café descafeinado (87-90) Efeito desfavorável do café não filtrado (42, 88-91): aumento do colesterol LDL (88, 91) e triglicérido (42) por ação dos diterpenos caveol e cafestol (92)
Mortalidade cardiovascular	Redução de risco (42, 48)
Doenças gastrointestinais	
Constipação intestinal	Efeito favorável na constipação intestinal (93) por efeito

	estimulatório sobre a musculatura lisa (17)
Colelitíase	Efeito redutor do risco (42, 94) por estimulação da secreção de colecistoquinina, aumento da contratilidade da vesícula biliar e redução da cristalização do colesterol biliar e da formação de espécies reativas de oxigênio (94)
Doença hepática gordurosa não alcoólica	Redução do risco (94, 95) Proteção contra fibrose e cirrose hepáticas (95, 96) Confirmado por modelos animais e ensaios em células (95-97) Possíveis mecanismos: efeito anti-fibrótico (96), antioxidante (96, 97), anti-inflamatório (95, 96, 98), aumento da expressão de PPAR $\gamma$ (95, 97), inibição de receptores de adenosina (96), melhora da sensibilidade insulínica (95, 98)
Doença do refluxo gastroesofágico	Efeito neutro (99)
Hepatite crônica	Efeito protetor (96, 97) Melhora da atividade de síntese – albumina e fatores de coagulação (97) Redução da progressão de hepatite C crônica (96-98)
Doenças musculoesqueléticas	
Osteoporose	Possível redução da densidade mineral óssea e aumento do risco de fraturas em mulheres (42, 100-104), acentuada por baixa ingestão de cálcio (102, 104, 105) Efeito neutro sobre o risco de fratura em homens (42) Efeitos dependentes da cafeína, que promove aumento da diurese e perda urinária de cálcio (102, 105), aumento da perda cutânea e fecal de cálcio (102) e redução da absorção intestinal de cálcio (102) Comprometimento da ossificação fetal e pós-natal em roedores pela cafeína, por aumento da excreção urinária e fecal de cálcio (102, 105)
Artrite reumatoide	Efeitos inconsistentes sobre o risco de artrite reumatoide (42, 106-108)
Gota	Efeito protetor do café cafeinado e descafeinado sobre hiperuricemia e gota (109, 110) Possível efeito da cafeína e de outras xantinas em inibir competitivamente a xantina oxidase (estudos in vitro e em roedores, (110) Efeito indireto, via melhora da sensibilidade à insulina (109, 110)
Doenças renais urinárias	
Incontinência urinária	Piora em curto prazo, dose-dependente (111-113) Efeito mais acentuado em pacientes com sintomas relacionados ao trato urinário inferior (113, 114) ou com hiperatividade do detrusor (113)

	Possivelmente pelo efeito diurético da cafeína (111, 112) ou pelo seu efeito de aumentar a velocidade de contração da musculatura lisa da bexiga em razão do aumento da liberação intracelular de cálcio (113)
Alterações hidroeletrólíticas	Efeito neutro em indivíduos saudáveis, a despeito do efeito diurético da cafeína (112)
Desfechos obstétricos	
Retardo de crescimento fetal	Aumento do risco relacionado ao consumo elevado (>300 mg/d de cafeína ou > 3 xícaras de café/dia vs baixo consumo) (115), embora a redução do consumo não tenha reduzido a frequência de baixo peso ao nascer (116)  Antagonismo do receptor de adenosina pela cafeína e comprometimento da regulação do fluxo sanguíneo fetal durante hipóxia (115)  Inibição de fosfodiesterases pela cafeína e vasoconstrição placentária (115, 116)
Prematuridade	Aumento do risco de partos prematuros no segundo trimestre, mas não no terceiro (>300 mg/d de cafeína ou > 3 xícaras de café/dia vs baixo consumo) (117), embora a redução do consumo não tenha reduzido a frequência de baixo peso ao nascer (116)
Perda gestacional	Aumento do risco (>300 mg/d de cafeína ou > 3 xícaras de café/dia vs baixo consumo) (118)
Teratogenicidade	Estudos observacionais sugerem efeito neutro (119, 120), embora uma metanálise de 12 estudos caso-controle tenha evidenciado maior risco de leucemia linfóide aguda e leucemia mielóide aguda em crianças cujas mães ingeriram maior quantidade de café e bebidas contendo cafeína (121)  Preocupação com teratogenicidade decorrente do efeito da cafeína em promover redução do fluxo sanguíneo placentário (115, 116) e de sua incorporação à molécula de DNA durante a mitose, em razão da semelhança estrutural com adenina e guanina (118)
Câncer	
Câncer de mama	Efeito inconsistente entre diferentes estudos (122-125)  Plausibilidade biológica do efeito protetor decorrente (i) do efeito da cafeína em promover a metabolização preferencial do estrogênio em metabólito menos potente (122), (ii) da presença de fitoestrogênios no café, que atuam como agonistas mais fracos e competitivos do receptor estrogênico (122, 125) e (iii) do efeito do café em aumentar a SHBG, reduzindo a concentração de estrogênio biodisponível (122, 125)
Câncer de endométrio	Efeito inconsistente entre diferentes estudos (126), embora haja alguns indícios de efeito protetor discreto (126, 127), dose-dependente (127)  Plausibilidade biológica do efeito protetor decorrente do efeito do café sobre o metabolismo dos esteroides sexuais, aumento da concentração de SHBG e redução de esteroides sexuais

	biodisponíveis (126, 127)
Câncer de ovário	Efeito neutro (128)
Câncer de pulmão	Aumento do risco associado ao consumo de café cafeinado, porém análise estratificada para tabagismo indicou associação inversa limítrofe entre não fumantes (129)  Redução do risco associada ao consumo de café descafeinado (129)
Câncer do trato digestivo	Redução do risco de câncer orofaríngeo e hepático associado ao consumo habitual de café (130-132)  Redução do risco de carcinoma hepatocelular decorrente do consumo do café vs nenhum consumo (131)  Efeito inconsistente sobre o risco de carcinoma colorretal (133)  Plausibilidade biológica decorrente de (i) compostos com ação antioxidante/anticarcinogênica (ácidos clorogênicos, melanoidinas e diterpenos) (130, 131); (ii) modulação da atividade de enzimas hepáticas (no caso do hepatocarcinoma) (131, 132); (iii) redução da resistência à insulina (131, 132)
Câncer de bexiga	Aumento de risco associado ao consumo de café (134, 135), sem característica dose-resposta (135)
Câncer de próstata	Redução dose-dependente do risco (136, 137)  Possíveis mecanismos: melhora da resistência à insulina, efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes, aumento da SHBG e alteração da concentração sérica de esteroides sexuais (137)

PPARg: receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais; SHBG: globulina ligadora de esteroides sexuais.

### 2.1.2 Efeito do consumo de café sobre a sensibilidade à insulina

O consumo de café em longo prazo é associado a melhora da sensibilidade à insulina e da glicemia pós-prandial em vários estudos prospectivos de longo prazo (138-144), enquanto que em estudos onde foi avaliada a ingestão aguda de café ou cafeína foi demonstrada piora da sensibilidade à insulina e aumento da glicemia (145-148) em indivíduos saudáveis e em indivíduos com diabetes (143, 148).

Os efeitos agudos da cafeína seriam mediados por 3 mecanismos principais: (i) aumento de catecolaminas, principalmente da epinefrina (22, 144-148), (ii) aumento dos ácidos graxos livres (145, 146, 148) e (iii) antagonismo aos receptores de adenosina A1 (22, 144, 147). A epinefrina promoveria efeitos

contra-regulatórios no metabolismo de glicose (147), como aumento da produção hepática de glicose e inibição da captação de glicose pelos adipócitos e tecido muscular esquelético (146). Esta última ação também seria consequência do bloqueio dos receptores de adenosina (147). Todos esses mecanismos levariam a piora da resistência à insulina desencadeada pelo efeito agudo da cafeína (22, 144-148). Além disso, há maior produção de ácidos graxos livres, como consequência da lipólise mediada por epinefrina e pelo antagonismo dos receptores de adenosina, pois uma das funções da adenosina é a supressão da lipólise (146). Os ácidos graxos livres, por sua vez, também reduzem a captação hepática e periférica de glicose, correlacionando-se negativamente com a sensibilidade à insulina (145, 146).

O uso crônico de cafeína pode resultar na atenuação dos efeitos pressóricos e humorais associados ao consumo agudo (144, 146), provavelmente pela regulação negativa dos receptores de adenosina (146), ou seja, decorrente do desenvolvimento de tolerância a esses efeitos agudos (138, 141, 143, 144, 146). Com isso, pode-se esperar melhora da sensibilidade à insulina com o uso crônico da cafeína (144, 146). Entretanto, o surgimento de tolerância depende da meia-vida de eliminação da cafeína, podendo não se desenvolver em indivíduos com meia-vida de eliminação mais curta (146).

Como foi observado nos estudos prospectivos que tanto o café cafeinado, como o café descafeinado, trazem benefício ao metabolismo glicídico, reduzindo o risco de DM2 (141, 142, 144, 148), é provável que outro componente do café, que não a cafeína, seja responsável por estes efeitos benéficos (141, 142, 148).

Os ácidos clorogênicos, por sua ação antioxidante (138, 140, 142-144, 149), podem promover redução do estresse oxidativo nas células beta pancreáticas (11, 142) e melhora da sensibilidade à insulínica periférica (12, 138, 139, 142-144). Estes importantes compostos fenólicos podem favorecer a captação de glicose pelos tecidos periféricos, via ativação de GLUT4 (transportador de glicose tipo 4) (11) e / ou receptor de insulina (11, 12) e, com isso, melhorar a sensibilidade insulínica (11, 12). Além disso, os ácidos clorogênicos podem retardar a absorção intestinal de glicose (11, 12, 141, 142,



149), por meio de inibição da  $\alpha$ -amilase salivar e pancreática (12), redução da ação da  $\alpha$ -glicosidase intestinal (11, 12) e do transporte de glicose dependente de sódio na borda em escova intestinal (22). Outras funções destes compostos fenólicos são apresentadas em diferentes revisões da literatura, como em Pereira e cols (142), Williams e cols (149), Zhang e cols (150), Ding e cols (22), Hamid Akash e cols (11), Santos e cols (12). Entre estas funções, pode-se citar a diminuição da atividade da glicose-6-fosfatase hepática, o que reduz a produção hepática de glicose (11, 12, 22, 142), e a regulação da concentração dos hormônios incretínicos, como o GIP e o GLP-1, ambos secretados em resposta à absorção de glicose. Por alguns destes mecanismos, os ácidos clorogênicos reduziram a taxa de absorção intestinal de glicose, deslocando-a para regiões mais distais do trato gastrointestinal (11, 12, 142, 149, 150). Por todos os mecanismos descritos anteriormente, os compostos fenólicos podem diminuir a concentração de glicose em jejum, de glicose pós-prandial e melhorar o metabolismo glicídico (142, 149). Em relação ao metabolismo lipídico, os ácidos clorogênicos podem levar a aumento da oxidação de ácidos graxos, por meio de regulação positiva do PPAR- $\alpha$ , e a redução da síntese de ácidos graxos, por meio de inibição das enzimas hepáticas HMGCo-A redutase e FAS (31).

Outros componentes do café, como o magnésio (22, 139, 143, 144, 151), o potássio (144), a niacina (144), a trigonelina (22, 141), a lignana (22, 141, 151), o ácido quínico (22, 141) são implicados na melhora do perfil glicídico e sensibilidade insulínica. O magnésio é um cofator essencial para múltiplas reações enzimáticas envolvidas no metabolismo da glicose, com melhora da sensibilidade à insulina (32, 152).

Apesar dos efeitos agudos da cafeína em promover piora da sensibilidade à insulina, há evidências sugestivas de que a cafeína, juntamente com outros componentes do café, poderia estar envolvida na redução de risco de DM2 (142, 143, 153). A cafeína pode levar ao aumento do gasto energético basal e da termogênese, à estimulação da oxidação de gordura, à mobilização de glicogênio muscular e a aumento da lipólise dos tecidos periféricos. (11, 143, 144). Desta forma, promoveria redução ou manutenção do peso corporal,

que está diretamente associado a redução do risco de DM2 (144). Em estudos com roedores, foi observado que a cafeína, em curto prazo, aumenta a fosforilação da AMPK (5' proteína quinase adenosina monofosfato ativada) nos músculos esqueléticos dos animais, sendo que essa ativação desencadeia o transporte de glicose independentemente de insulina (154). Outro estudo demonstrou que o consumo de cafeína, em longo prazo, induz a expressão do IRS-2 (substrato 2 do receptor de insulina), que potencializa a cascata de sinalização de insulina / IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) em ilhotas pancreáticas, levando a melhora da sensibilidade à insulina, bem como da função das células beta pancreáticas em roedores diabéticos (155).

Os componentes do café, como os ácidos clorogênicos, cafeol, cafestol, e a trigonelina, possuem fortes propriedades anti-inflamatórias (11, 156-158). Foi demonstrado, em estudos envolvendo animais e humanos, que o consumo habitual de café pode reduzir significativamente os níveis de biomarcadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR (proteína C reativa) (159), MCP-1, VCAM-1, ELAM-1, IL-18, fetuína-A (126), IL-18, 8- isoprostano (160). Da mesma forma, a ingestão regular de café também aumentou significativamente os níveis de vários biomarcadores anti-inflamatórios, como a adiponectina (40, 149), IL-4 e IL-10 (11). A adiponectina é o peptídeo mais abundantemente secretado pelos adipócitos e está associada a maior oxidação hepática de ácidos graxos e captação de glicose muscular. A concentração sérica de adiponectina está inversamente relacionada à massa gorda e à intensidade da resistência à insulina (161). Sabe-se que o estado de inflamação subclínica está associado a aumento da resistência à insulina e, conseqüentemente, ao risco de DM2 (40). A glicolipototoxicidade envolvida na fisiopatogenia do DM2 induz inflamação por meio de ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como a do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Os ácidos clorogênicos poderiam atuar via inibição do NF- $\kappa$ B para interromper este processo inflamatório (11). Em uma revisão sistemática da literatura de estudos clínicos, foi evidenciado que o consumo de café - que variou entre 6 a 83,33 gramas de café por dia, com duração entre 2 a 20 semanas - estava associado ao aumento de adiponectina, bem como, com a redução de fetuína-A, IL-18, 8- isoprostano (40). Adicionalmente, foi observado que a ingestão habitual de café

bloqueia a ativação desses marcadores pró-inflamatórios, enquanto os níveis de marcadores anti-inflamatórios aumentam significativamente, reforçando os efeitos protetores do consumo de café no DM2 (11).

A inflamação subclínica, bem como a resistência à insulina, correlacionam-se com a síndrome metabólica (SM), em que estão presentes outras doenças crônicas além do DM2, como hipertensão arterial (HAS), dislipidemia (DLP), e obesidade. Em uma metanálise publicada em 2015, foi observado associação inversa entre o consumo de café e a SM (24). Neste contexto, é possível que os efeitos benéficos dos polifenóis na prevenção de doenças crônicas possam ocorrer devido à sua capacidade de melhorar a função endotelial e de suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais vasculares, com a consequente regulação de moléculas de adesão e de monócitos (24).

O café cafeinado pode aumentar a concentração plasmática de SHBG (12, 162), resultando não apenas em regulação das ações biológicas dos hormônios sexuais, como testosterona e estradiol, mas também promovendo efeitos metabólicos diretos na homeostase glicêmica (12, 162, 163).

Tendo em vista todos esses possíveis mecanismos, o consumo de café cafeinado e descafeinado vem sendo associado a redução de risco de DM2, de forma dose-dependente (22, 151, 153, 164).

### **2.1.3 Efeito do consumo do café sobre a mortalidade**

A maioria dos estudos observacionais evidenciou que a ingestão de café está associada a menor risco de mortalidade por todas as causas (2, 5, 42, 165-169). A maior redução de risco relativo ocorreu com o consumo de 3 xícaras por/dia, em comparação ao não consumo, em relação dose-resposta não linear e sem diferença após estratificação por sexo (42). O mesmo foi observado em relação ao café descafeinado (42). Além disso, a maior parte dos estudos observacionais encontrou uma relação inversa entre consumo de café e mortalidade por causas cardiovasculares (5, 42, 165, 168, 169),

resultado observado em diferentes grupos raciais e étnicos (168, 169). A redução de risco relativo também foi observada com a ingestão de 3 xícaras de café/ dia (42). Um dos maiores estudos que avaliou a associação entre o consumo de café e a mortalidade por todas as causas e a mortalidade específica em 229.119 homens saudáveis e 173.141 mulheres saudáveis evidenciou associação inversa significativa entre o consumo de café e a mortalidade por todas as causas e mortalidade cardiovascular, após ajuste para tabagismo e outros potenciais fatores confundidores (5).

Outros estudos, contudo, encontraram resultados diferentes (170, 171). Em um estudo, o café cafeinado não foi associado a qualquer causa de mortalidade ou a mortalidade cardiovascular em mulheres com doença cardiovascular estabelecida (170). Em outro estudo, o consumo de mais de 4 xícaras de café por dia foi associado a aumento da mortalidade geral em homens, bem como em homens e mulheres com menos de 55 anos, porém não houve diferença significativa em relação à mortalidade por causas cardiovasculares tanto em homens quanto em mulheres (171).

O foco do presente estudo foi investigar o efeito de diferentes preparações de café sobre fatores que influenciam a homeostase da glicose, como forma de explorar os possíveis mecanismos que explicam a observação de que o café reduz o risco de desenvolvimento de DM (Diabetes Mellitus).

## 2.2 DIABETES MELLITUS

### 2.2.1 Epidemiologia

O DM consiste em um distúrbio metabólico definido por hiperglicemia persistente, causado por deficiência na produção de insulina e/ou resistência à sua ação, levando a complicações crônicas micro e macrovasculares em longo prazo (26).

É um importante problema de saúde pública mundial, em virtude de sua prevalência crescente em todos os países, bem como por sua elevada

morbimortalidade (26, 30). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o número de pessoas com esse diagnóstico está em torno de 425 milhões (172). Estima-se que esse número aumente para 642 milhões de pessoas em 2040 (26). Os países em desenvolvimento detêm 75% dos casos de DM atualmente e, provavelmente, são os locais onde será registrado o maior aumento do número de casos nas próximas décadas. Esse aumento de prevalência ocorre por conta da urbanização, maior expectativa de vida, envelhecimento da população, erros alimentares e estilo de vida sedentário, com consequente obesidade (26, 30).

Os diabéticos possuem maior risco de complicações crônicas, como infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular isquêmico (AVC), cegueira, insuficiência renal e amputações não traumáticas de membros inferiores (26, 30, 151). Além disso, há maiores taxas de hospitalização, incluindo maior duração para o mesmo problema de saúde e de utilização de serviços de saúde, gerando grandes custos econômicos, sociais e de saúde. O custo com casos de DM da maioria dos países é de 5-20% do seu gasto total com saúde (26).

### **2.2.2 Classificação do diabetes mellitus**

O DM é classificado de acordo com sua etiologia em (i) DM1, (ii) DM2, (iii) diabetes gestacional (DMG) e (iv) outras formas de DM (173), conforme apresentado no Quadro 2.

O DM1 corresponde a 5-10 % dos casos de DM e é subdividido em DM 1A e DM 1B. O DM 1A é caracterizado pela destruição autoimune das células beta pancreáticas, levando à deficiência absoluta de insulina (26, 174).

O DM2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM. É uma doença de etiologia não totalmente esclarecida (26, 173), em que vários genes estão envolvidos, com forte predisposição familiar e contribuição significativa de fatores ambientais, como a obesidade (26, 173, 174). Acomete sujeitos a partir da quarta década de vida, apesar de que com o aumento mundial da incidência da obesidade crianças e adolescentes também estão sendo acometidos (26). Assim, 80-90% dos pacientes com DM2 apresentam

sobrepeso ou obesidade, além de outros componentes da síndrome metabólica (26, 173). De forma geral, sua fisiopatologia é marcada por resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina (26, 173, 174), aumento da produção hepática de glicose, disfunção incretínica, aumento de lipólise e consequentemente de ácidos graxos livres circulantes, aumento da reabsorção renal de glicose (26) e graus variados de deficiência da secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática (26, 173, 174).

Quadro 2. Classificação do diabetes Mellitus

CLASSIFICAÇÃO DIABETES MELLITUS
DIABETES MELLITUS TIPO 1A E 1B
DIABETES MELLITUS TIPO 2
DIABETES MELLITUS GESTACIONAL
OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS:
DEFEITOS GENÉTICOS NA FUNÇÃO DA CÉLULA $\beta$
DEFEITOS GENÉTICOS NA AÇÃO DA INSULINA
DOENÇAS DO PÂNCREAS EXÓCRINO
ENDOCRINOPATIAS
DIABETES INDUZIDO POR MEDICAMENTOS OU SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
INFECÇÕES
FORMAS INCOMUNS DE DIABETES AUTO-IMUNE
SÍNDROMES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES

### 2.2.3 Fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2

A resistência à insulina muscular e hepática, em conjunto com a disfunção de células  $\beta$  pancreáticas, representa os defeitos fisiopatológicos centrais no DM2 (175-177). Além do músculo esquelético, fígado e células  $\beta$

pancreáticas, a célula adiposa (lipólise acelerada), o trato gastrointestinal (disfunção incretínica), a célula alfa pancreática (hiperglucagonemia), o rim (aumento da reabsorção de glicose) e cérebro (resistência à insulina) desempenham importante papel no desenvolvimento de intolerância à glicose(175).

Na história natural do DM2, há a predisposição genética que torna os tecidos corporais resistente à ação da insulina, bem como leva a disfunção de célula  $\beta$  pancreáticas (175, 177, 178). A obesidade e o sedentarismo também estão relacionados à resistência à insulina e, juntamente com a carga genética, podem promover disfunção das células  $\beta$  pancreáticas (175, 176, 178). Enquanto as células  $\beta$  pancreáticas forem capazes de aumentar a secreção de insulina para compensar a resistência à insulina dos tecidos periféricos, não haverá disglucemia (175, 176, 178). Entretanto, provavelmente por conta de um componente genético do envelhecimento, ocorre a disfunção das células beta, ocasionando elevação da glicemia (175, 176, 178). O declínio da tolerância à glicose está associado com uma diminuição acentuada da secreção de insulina sem maiores alterações da sensibilidade à insulina (175, 178). Assim, apesar das contribuições da resistência à insulina e da disfunção das células  $\beta$  pancreáticas no aparecimento do DM2, o início e o ritmo de disfunção de célula  $\beta$  é que determina a taxa de progressão da hiperglicemia (175, 176, 178).

A disfunção das células  $\beta$  pancreáticas ocorre precocemente e de forma grave na patogenia do DM2, diferentemente do que se pensava anteriormente (175, 178). À medida que a tolerância à glicose fica minimamente comprometida, a secreção de insulina nos primeiros 30 minutos de alimentação (primeira fase) torna-se acentuadamente atenuada, resultando em elevação pós-prandial da glicemia, o que representa a definição fisiológica de tolerância oral à glicose diminuída (IGT). A hiperglicemia pós-prandial, por sua vez, determina hiperinsulinemia após os primeiros 30 minutos (segunda fase), como uma resposta compensatória (178). Estudos demonstraram que no estágio de IGT os indivíduos possuem grau de resistência à insulina máximo ou quase máximo e já perderam mais de 80% da função das células beta (175), além de aproximadamente 50% do volume das mesmas (175, 178). Desta maneira, tanto a resistência à insulina como a disfunção de células  $\beta$  pancreáticas se

desenvolvem precocemente, quando ainda há normoglicemia, sendo igualmente importantes na patogenia do DM2 (177, 178).

Vários fatores contribuem para a disfunção de célula  $\beta$  pancreáticas, incluindo a idade, genética, resistência à insulina, glicolipotoxidade, hipersecreção de compostos amiloides, alteração dos hormônios incretínicos, (175) além de biossíntese de pró-insulina prejudicada (178).

O avançar da idade está comprovadamente associado à progressiva disfunção de células  $\beta$  pancreáticas, bem como existem fortes evidências para uma base genética associada à disfunção das células  $\beta$  em parentes de primeiro grau de diabéticos tipo 2 e em gêmeos monozigóticos (175-177). História familiar positiva confere um aumento de 2 a 4 vezes do risco de desenvolver DM2, sendo que 15 a 25% dos parentes de primeiro grau de pacientes com DM2 desenvolvem intolerância à glicose ou DM2 (176).

Alguns genes vêm sendo relacionados a disfunção de célula  $\beta$  pancreáticas; entre estes, o mais importante parece ser o fator de transcrição TCF7L2 (175, 177). Foi demonstrado que o alelo T do polimorfismo de nucleotídeo único rs7903146 do gene TCF7L2 está associado a alterações na secreção de insulina *in vivo* e redução da responsividade ao GLP-1. Além disso, este gene codifica o fator de transcrição envolvido na sinalização do Wnt, o qual desempenha função importante na regulação e proliferação da célula  $\beta$ , como também na secreção de insulina (175). Outros fatores genéticos associados ao risco de DM2 são o polimorfismo Pro12Ala do receptor ativador por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR gama) (176, 177), os genes ABCC8 e KCNJ11, que codificam o SUR1/Kir6.2 (receptor de sulfonilureia-1/canal de potássio 6.2), respectivamente, envolvidos na secreção de insulina (176, 177), e variantes genéticas do gene que codifica a calpaína-10 (176-178).

A resistência à insulina, ao provocar uma demanda excessiva da célula  $\beta$  pancreática no sentido de aumentar a produção de insulina, também promove disfunção progressiva da mesma, porém os mecanismos precisos envolvidos nessa disfunção ainda não estão esclarecidos (175).

A hiperglicemia favorece a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio nas células  $\beta$  pancreáticas, com subsequente dano aos componentes celulares. Além disso, na presença de excesso de



glicose, a oxidação de ácidos graxos livres nas células  $\beta$  é inibida e ocorre acúmulo de acil coenzima A de cadeia longa, que promove redução da secreção de insulina (175, 176). Assim, uma das explicações possíveis para a disfunção das células  $\beta$  está no fato de que tanto a hiperglicemia crônica, quanto o excesso de ácido graxos livres, promovem glicotoxicidade e lipotoxicidade, respectivamente (175-178).

Da mesma forma, a hipersecreção do polipeptídeo amiloide da ilhota (IAPP), que é co-secretado em uma relação de um-para-um com insulina, pode levar à disfunção progressiva da célula  $\beta$ . Isso ocorre pela deposição de amiloide no pâncreas, composto associado a toxicidade tecidual. Inicialmente há hiperinsulinemia na patogenia do DM2, porém insuficiente para compensar a resistência à insulina. Essa insuficiência caracteriza a deficiência secretória de célula  $\beta$  pancreática, mas é suficiente para resultar no efeito tóxico do polipeptídeo amiloide (175, 176, 178).

Os hormônios incretínicos, GLP-1 e GIP, possuem um importante papel na disfunção progressiva de célula  $\beta$  (175), pois eles são responsáveis por até 75% do estímulo à secreção de insulina após a ingestão oral de glicose (38). No DM2, a secreção de GLP-1 pelas células L do intestino delgado distal é deficiente, enquanto que a secreção de GIP pelas células K do intestino delgado proximal está pouco aumentada, por conta de uma provável resistência à ação do GIP no estímulo à secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática (175). Com isso, a atividade insulínica do GIP está bastante comprometida (38). Ambas as alterações incretínicas ocorrem progressivamente durante a história natural do DM2, ou seja, essas alterações já estão presentes em estágios iniciais de intolerância à glicose (175).

Além disso, a biossíntese de pró-insulina estaria prejudicada, pois dados da literatura sustentam que a hiperglicemia poderia dificultar a transcrição da pró-insulina (178). A clivagem da pró-insulina origina a insulina e o peptídeo C, sendo que o peptídeo C é uma das medidas de função secretória da célula beta (30).

Os fatores envolvidos na resistência à insulina em jejum são diferentes daqueles relacionados à resistência no estado pós-prandial (175, 178). Em decorrência da resistência à insulina, há produção exagerada de glicose

hepática em jejum, apesar da hiperinsulinemia de jejum. Além disso, por não haver resposta adequada à insulina no estado pós-prandial, a produção hepática de glicose não é suprimida (175, 176, 178). Em conjunto com a resistência insulínica hepática, há outros fatores que contribuem para o excesso de produção hepática de glicose, entre eles: o aumento do glucagon sérico, bem como elevação da sensibilidade hepática ao glucagon; lipotoxicidade hepática, levando a uma maior expressão da carboxiquinase de fosfoenolpiruvato e piruvato carboxilase, enzimas limitantes da gliconeogênese; e glicotoxicidade, levando a maior expressão de glicose-6-fosfatase, enzima limitante na produção hepática de glicose (175).

A captação de glicose muscular representa 85-90% do total de captação de glicose corporal. Assim, em decorrência da resistência insulínica muscular, há um prejuízo importante da captação de glicose após a ingestão de carboidrato, resultando em hiperglicemia pós-prandial (175, 178). Foi documentada a presença de lesões intramiocelulares, defeitos na ação da insulina, incluindo transporte e fosforilação deficiente de glicose, redução da síntese de glicogênio muscular e da oxidação de glicose. Entretanto, defeitos mais proximais de transdução do sinal de insulina desempenham maior importância na resistência à insulina muscular (175, 178).

A transdução do sinal de insulina também se encontra prejudicada nos indivíduos DM2, o que é caracterizado por perda de sua capacidade de fosforilar em tirosina o receptor de insulina e o substrato do receptor de insulina-1 (IRS -1) (175, 176, 178). Isso ocorre, entre outros aspectos, pela ação de fosfatases celulares que desfosforilam os resíduos de tirosina do receptor de insulina e do IRS-1 (176). Além disso, ocorre fosforilação em resíduos de serina e treonina ao invés de fosforilação em resíduos de tirosina (176, 178). Esse defeito da sinalização de insulina leva à diminuição do transporte de glicose celular, causando hiperglicemia (175, 176, 178), além de reduzir a liberação de óxido nítrico, com consequente disfunção endotelial (175). A ativação da via MAP quinase (proteína-quinases ativadas por mitógenos), por sua vez, a qual retém sua sensibilidade à insulina, leva a aumento de sinais intracelulares envolvidos na inflamação, proliferação celular e aterosclerose. Isso, em parte, explica a forte associação entre a resistência à

insulina e a doença cardiovascular aterosclerótica em indivíduos não diabéticos, bem como em indivíduos diabéticos tipo 2 (175).

Em resumo, a secreção prejudicada de insulina, associada à redução da captação de glicose muscular e hepática, bem como o aumento da produção hepática de glicose, contribuem para a intolerância à glicose e DM2 (175, 176).

O tecido adiposo participa, conjuntamente com células  $\beta$  pancreáticas, fígado e músculo esquelético, na patogênese do DM2 (175, 176). Os adipócitos, sobretudo localizados em depósitos viscerais, são resistentes à ação antilipolítica da insulina, o que promove elevação da concentração circulante dos ácidos graxos livres (AGL). A elevação crônica de AGL, por sua vez, estimula a gliconeogênese hepática, induz resistência insulínica hepática e muscular (175-177), além de prejudicar a secreção de insulina, ou seja, geram lipotoxicidade pancreática, hepática e muscular. Associado a isso, os adipócitos resistentes à insulina são incapazes de estocar o excesso de gordura. Assim, esse conteúdo lipídico extravasa para os outros tecidos corporais, como fígado, músculo, e células  $\beta$  pancreáticas, levando também à resistência à insulina hepática e muscular (175, 176). Outra contribuição importante do tecido adiposo disfuncional na fisiopatologia do DM2 seria pela produção em excesso de adipocitoquinas inflamatórias, que aumentam a resistência insulínica (175, 177, 178), como o fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa), resistina (176-178), interleucina-6 (IL-6) (176, 177), proteína C reativa (PCR) e inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) (177). O TNF alfa reduz a sinalização da insulina por favorecer a lipólise adipocitária e por efeitos diretos no receptor de insulina; a IL-6 aumenta a expressão das proteínas SOCS (membros supressores de sinalização de citocinas) que degradam o IRS (176) e a resistina estaria envolvida na inativação da AMP quinase, favorecendo a gliconeogênese hepática (178). Da mesma forma, os adipócitos disfuncionais reduzem a produção de adipocitoquinas sensibilizadoras de insulina, como a adiponectina (175-178). A adiponectina atua via AMP quinase na supressão da gliconeogênese hepática, no aumento da captação de glicose muscular, na oxidação de AGL e inibição da lipólise (176, 177). Foi observado que a infusão lipídica causou inibição da fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor de insulina muscular e do IRS-1, além de

redução da atividade da PI 3-quinase e da Akt, moléculas envolvidas na sinalização de insulina e transporte celular de glicose (175). Os AGL, ainda, ativam quinases celulares, incluindo isoformas atípicas da proteína C quinase, que levam ao aumento de diacilglicerol e, por sua vez, ativam o inibidor de quinases inflamatórias  $\kappa$ B quinase (IKK) e c-jun quinase N-terminal, aumentando a fosforilação em serina /treonina do IRS-1 e reduzindo, assim, a fosforilação em tirosina e sinalização do IRS-1 (176, 178). Os AGL intracelulares são convertidos em triglicerídeos e em metabólitos tóxicos, como o acil coAs graxos, diacilglicerol e ceramidas, que estão associados à resistência insulínica e prejuízo da sinalização insulínica muscular (175)(138).

A disfunção mitocondrial muscular e hepática também contribui para resistência à insulina (175-178). O acúmulo muscular e hepático de triglicerídeos e captação deficiente de glicose, que caracterizam a resistência à insulina do DM2, são desencadeados pela diminuição da oxidação de ácidos graxos e da produção de ATP pela mitocôndria. Outro fato que sustenta esse mecanismo é o achado de mais fibras musculares tipo 1B (tipo não oxidativo) em indivíduos com DM2, além de um número reduzido de mitocôndrias musculares (176, 178).

Um polimorfismo comum no ativador transcricional de genes que regulam a biogênese mitocondrial, o coativador 1 de PPAR $\gamma$  (proliferador de peroxissoma ativado gama) (PGC-1), pode representar um mecanismo genético para explicar os defeitos mitocondriais e, portanto, resistência à insulina no DM2 (178). O PPAR $\gamma$  está envolvido na oxidação de ácidos graxos mitocondriais e síntese de ATP e sua expressão deficiente leva a um defeito na fosforilação oxidativa mitocondrial, com conseqüente acúmulo de lipídios celulares (176). Todos esses achados fornecem suporte para o papel da lipotoxicidade e resistência à insulina adipocitária na patogênese do DM2 (175).

Outro mecanismo fisiopatológico no DM2 é a disfunção do sistema incretínico. Além desta limitar a função das células  $\beta$  pancreáticas, como mencionado anteriormente, o GLP-1 atua como um potente inibidor da secreção de glucagon pela célula alfa pancreática e como supressor da produção hepática de glicose no estado pós-prandial. Assim, com a deficiência de secreção de GLP-1 observada nos indivíduos com DM2, há

hiperglucagonemia e aumento da produção hepática de glicose, mesmo após uma refeição. Tanto a supressão do glucagon como a elevação da insulinemia são importantes para a supressão da produção hepática de glicose após uma refeição mista. Na patogênese do DM2, também ocorre elevação da concentração sérica de glucagon em jejum, o que contribui para o aumento da produção hepática de glicose em jejum, via gliconeogênese (175).

Outros órgãos envolvidos na fisiopatologia do DM2 são os rins. Noventa por cento da glicose filtrada é reabsorvida pelo transportador SGLT2 no túbulo contorcido proximal e os restantes dez por cento da glicose filtrada são reabsorvidos pelo transportador SGLT1 no segmento reto do túbulo descendente proximal. Desta maneira, os rins tendem a conservar a glicose para atender, principalmente, às demandas cerebrais. No DM2, há superexpressão destes transportadores e, conseqüentemente, aumento da capacidade renal de reabsorção de glicose (175).

Finalizando, como acontece no fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e pâncreas, existe também resistência à insulina no tecido cerebral. Após a ingestão de glicose, os núcleos hipotalâmicos ventromediais e paraventriculares, que são responsáveis pela regulação do apetite, são inibidos. Porém, em estudo envolvendo avaliação cerebral por ressonância nuclear magnética, foi observado que em obesos resistentes à insulina, mas normoglicêmicos, a magnitude desta resposta inibitória foi reduzida após a ingestão de glicose. Não é conhecido se esta resposta cerebral contribui ou é consequência da resistência à insulina e ganho de peso (175).

#### **2.2.4 Tratamento do DM2**

A otimização do estilo de vida é essencial para todos os pacientes com DM2 e é direcionada a fatores de risco modificáveis, incluindo peso corporal, atividade física, dieta, hábitos de sono, apoio psicossocial e tabagismo (179-181). Dependendo do paciente e do seu alvo glicêmico, a modificação do estilo de vida pode ser a única terapia necessária ou vir associada a medidas farmacológicas, apesar da recomendação atual de início de tratamento farmacológico com metformina na ocasião do diagnóstico do DM2 (179).

Em relação à dieta, a distribuição de macronutrientes deve basear-se em avaliação minuciosa dos padrões alimentares, com base em preferências individuais e metas metabólicas (179, 180). A ênfase deve ser em padrões de alimentação saudável, com o consumo de vegetais, frutas, leguminosas, laticínios com baixo teor de gordura, carnes magras, sementes e grãos integrais, substituindo gorduras saturadas por monoinsaturadas e poli-insaturadas e evitando gorduras trans e açúcar refinado (179, 180). As abordagens dietéticas com base na dieta do Mediterrâneo para controle de hipertensão (DASH) e aquelas baseadas em plantas são exemplos de alimentação saudável (180). A quantidade ideal de carboidratos a ser ingerida por indivíduos diabéticos não é conhecida. Os resultados dos estudos que avaliaram índice glicêmico e carga glicêmica foram mistos e inconclusivos (180). O mesmo foi observado em relação à dieta com baixo ou muito baixo teor de carboidrato (cetogênica); neste caso, porém, haveria benefício somente em curto prazo (3 a 4 meses) (180). Para indivíduos com DM e usuários de insulina em dose plena, seria interessante a contagem de carboidrato objetivando o melhor controle glicêmico (179, 180).

Não há também consenso na literatura sobre a quantidade ideal de gordura alimentar a ser consumida por indivíduos diabéticos, embora o mais importante seja a qualidade da gordura ingerida, ao invés da quantidade, no intuito de melhora do perfil metabólico e do risco cardiovascular (180). No geral, seria uma ingestão de gorduras entre 20-35% do total de calorias. Em relação ao consumo de proteínas, não existem evidências de que o ajuste da quantidade diária da ingestão desse macronutriente, além de 1–1,5 g/kg de peso corporal por dia ou 15-20% do total de calorias, irá melhorar a saúde de indivíduos sem doença renal diabética. E, neste caso específico, o ideal seria até 0,8 g/kg/peso (180).

O tratamento farmacológico é considerado na ocasião do diagnóstico (182). Se o paciente apresentar A1c < 7,0-7,5% na ocasião do diagnóstico de DM2 e grande motivação no sentido de mudança de estilo de vida, é possível tentativa de tratamento inicial somente com dieta e exercícios físicos (179, 181). Quando, na ocasião do diagnóstico, a A1c estiver >7,5%, inicia-se de

preferência a metformina, se não houver contraindicação. No caso de A1c > 8,5-9,0%, é sugerido o início de uma terapia medicamentosa combinada, com ou sem insulina (179, 181). No entanto, metas menos rigorosas podem ser consideradas para alguns grupos de pacientes, como idosos e/ou pacientes com estado de saúde deteriorado por comorbidades (179, 181). Em pacientes sintomáticos (perda de peso, poliúria, polifagia, polidipsia) ou com hiperglicemia grave (glicemia de jejum > 250 mg/dL, glicemia aleatória > 300 mg/dL, A1c > 9,5%) ou com cetonúria, o tratamento ideal é a insulino-terapia (181). Além da metformina, há vários outros medicamentos orais e subcutâneos, bem como vários tipos de insulinas aprovados para o uso em pacientes DM2 (Quadro 3).

Quadro 3. Anti-hiperglicemiantes utilizados no tratamento do DM2.

Classe	Composto (s)	Mecanismo de ação	Efeitos farmacológicos primários	Vantagens	Desvantagens	Custo
Biguanidas	Metformina	Ativa a AMP-quinase	↓ Produção hepática de glicose	Extensa experiência ↔ ganho de peso ↔ hipoglicemia Possivelmente, ↓ eventos CV (UKPDS)	Efeitos adversos comuns: gastrointestinais (diarreia, dor abdominal etc.) Muito raro: acidose láctica Raro: deficiência de vitamina B12 Múltiplas contra-indicações: IRC, acidose, desidratação, hipóxia etc.	Baixo
Sulfonilureias	Gliclazida MR Glimepirida Glibenclamida Glipizida Clorpropamida	Fechamento dos canais de $K_{ATP}$ na membrana plasmática das células $\beta$	Secreção (sem produção) de insulina	Extensa experiência ↓ risco microvascular (UKPDS)	Hipoglicemia ↑ Peso Possíveis efeitos adversos cardiovasculares	Baixo
Meglitinidas (glinidas)	Repaglinida Nateglinida	Fechamento dos canais de $K_{ATP}$ na membrana plasmática das	Secreção de insulina	↓ Excursões glicêmicas pós-prandiais ↓ Baixo risco de	Hipoglicemia ↑ Peso Uso antes de cada	Moderado



		células $\beta$		hipoglicemia	refeição	
Tiazolidinedionas (glitazonas)	Pioglitazona	Ativam fator de transcrição nuclear PPAR-gama	$\uparrow$ Sensibilidade à insulina	Não induzem hipoglicemia  Durabilidade do efeito hipoglicêmico  $\uparrow$ HDLc  $\downarrow$ TG  $\downarrow$ Eventos CV (ProACTIVE)	Edema  $\uparrow$ Peso  $\uparrow$ Risco de ICC e fraturas ósseas  $\uparrow$ Risco de câncer de bexiga (?)	Moderado
Inibidores da alfa-glicosidase	Acarbose	Inibem a alfa-glicosidase intestinal	$\downarrow$ Absorção de carboidratos intestinal	Não induzem hipoglicemias  $\downarrow$ Excursões glicêmicas pós-prandiais  $\downarrow$ Eventos CV (STOP-NIDDM)	Discreta $\downarrow$ da A1c  Efeitos gastrointestinais (flatulência, diarreia)	Moderado
Inibidores da DPP-4	Vidagliptina Sitagliptina Linagliptina Saxagliptina Alogliptina	Inibem atividade da DPP-4,  $\uparrow$ Concentração pós-prandial de incretinas (GLP-1 e GIP)	$\uparrow$ secreção de insulina (glicose-dependente)  $\downarrow$ secreção de glucagon (glicose-dependente)	Não induzem hipoglicemia.  Bem tolerados  $\downarrow$ Excursões glicêmicas pós-prandiais	Segurança a longo prazo ainda não estabelecida  $\downarrow$ Modesta da A1c  Urticária, angioedema  Pancreatite (?)  $\uparrow$ Risco de internação por	Alto

					ICC (saxagliptina)	
Agonistas do receptor de GLP-1	Exenatida Liraglutida Exenatida LAR Dulaglutida	Ativam receptores de GLP-1	<p>↑ secreção de insulina (glicose-dependente)</p> <p>↓ secreção de glucagon (glicose-dependente)</p> <p>↓ Produção hepática de glicose</p> <p>↑ Sensibilidade à insulina</p> <p>Lentificam o esvaziamento gástrico</p> <p>↑ Saciedade</p> <p>↓ Appetite</p>	<p>Não induzem hipoglicemia</p> <p>↓ Excursões glicêmicas pós-prandiais</p> <p>↓ Peso</p> <p>Melhoram perfil lipídico e ↓ PCR-as</p> <p>Efeitos protetores CV (?)</p> <p>Potencial para melhora da função/massa célula β</p>	<p>Efeitos adversos comuns: gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia etc.)</p> <p>Pancreatite (?)</p> <p>Hiperplasia de células C/ carcinoma medular de tireoide em animais (liraglutida)</p> <p>Injetáveis</p>	Muito alto
Gliflozinas	Dapagliflozina Canagliflozina Empagliflozina	Inibição do cotransportador 2 de sódio e glicose: SGLT-2	↑ Excreção real de glicose	<p>Não induzem hipoglicemia</p> <p>↓ Peso e PA</p> <p>↓ mortalidade CV (empagliflozina)</p>	<p>↓ Modesta de A1c</p> <p>↑ Risco de ITU inferior e infecções fúngicas dos genitais</p>	Alto
Insulinas	NPH humana	Ativam receptores de insulina	↑ Utilização periférica de glicose	Medicamentos mais potentes na ↓	Hipoglicemias: comum	Variável

	Regular humana Lispro, Aspart, Glulisina Glargina (U-100 e U-300) Detemir Pré-misturas: (NPH + Regular; Lipro bifásica; Aspart bifásica etc.) Degludeca		↓Produção hepática de glicose ↓Lipólise	de A1c ↓ risco microvascular (UKPDS) Melhora do perfil lipídico	↑ Peso Efeitos mitogênicos (?) Serem injetáveis “Estigma” (para os pacientes)	
--	--	--	---	--	---	--

IRC: insuficiência renal crônica.  $K_{ATP}$ : canais de potássio ATP-sensíveis. TG: triglicerídeos. ICC: insuficiência cardíaca. PCR-as: proteína C reativa de alta sensibilidade. ITU: infecção do trato urinário. CV: cardiovascular. UKPDS: estudo prospectivo em diabetes do Reino Unido. PROactive: ensaio clínico prospectivo duplo-cego randomizado que avaliou eventos macrovasculares em pacientes em uso de pioglitazona. STOP-NIDDM (Diabetes Mellitus Não Insulino-Dependente): estudo internacional sobre a eficácia do inibidor da alfa-glucosidase (acarbose) para prevenir DM2 em uma população com intolerância à glicose.

Adaptado de Ruy Lyra ea. Tratamento Farmacológico do Diabetes Melito Tipo 2. Endocrinologia Clínica. 6º ed. Rio de Janeiro: Vilar L.; 2016. p. 1667.(183)

## 2.3 O SISTEMA INCRETÍNICO

### 2.3.1 Fisiologia

Efeito incretina ou incretínico refere-se à maior secreção de insulina após sobrecarga oral de glicose, em relação à resposta desencadeada pela administração de quantidade igual de glicose por via endovenosa. O efeito incretínico é promovido por dois principais hormônios intestinais: GIP e GLP-1 (33-38). Esses hormônios liberados pelas células enteroendócrinas intestinais em resposta à absorção de nutrientes são sinais endócrinos para as ilhotas de Langerhans no pâncreas, aumentando a secreção de insulina e modulando a secreção de glucagon sempre que as concentrações de glicose no plasma estiverem acima de um valor limite de aproximadamente 66 mg/dL (38).

Em conjunto, os efeitos insulíntrópicos do GIP e do GLP-1 respondem por até 25-70% do total de secreção de insulina em resposta à ingestão de uma refeição ou de glicose em indivíduos saudáveis, a depender da quantidade de glicose ingerida (35-38), sendo o GIP o incretínico mais potente (38). Dessa forma, a contribuição fisiológica dos incretínicos, em relação aos outros estímulos para secreção de insulina, como a glicemia sérica e sinais neurais advindos do sistema nervoso autônomo, é de importância substancial para a manutenção da homeostase da glicose (38).

O GIP é um peptídeo de 42 aminoácidos produzido pelas células K localizadas no intestino delgado proximal (duodeno e jejuno superior), sendo a primeira incretina isolada da mucosa intestinal (33-38). A concentração sérica de GIP é baixa no jejum e se eleva em poucos minutos após a ingestão de uma refeição mista (33-35), atingindo pico em aproximadamente 1 hora, com retorno à concentração basal algumas horas após a ingestão (38). Assim, o principal estímulo para a sua secreção é a ingestão alimentar (33-35). O GIP também foi localizado no sistema nervoso central, onde poderia desempenhar papel no controle de sobrevivência celular (33). O GIP é sintetizado como um pró-peptídeo precursor (pró-GIP), que é então clivado em GIP por processamento pós-traducional (38). O GIP ativo (constituído pelos primeiros 42 aminoácidos e

descrito como GIP 1–42) é rapidamente convertido em GIP bioinativo pela clivagem dos dois primeiros aminoácidos (convertido em GIP 3–42), minutos após a secreção, pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP4). Dessa forma, o GIP imunorreativo circulante representa uma mistura do GIP ativo (1–42) e do GIP inativo (3–42) (33), sendo que o GIP biologicamente ativo e intacto representa aproximadamente 40-60 % do total de GIP plasmático (38).

O GLP-1 é um peptídeo de 29 aminoácidos, produzido em células L enteroendócrinas no jejuno distal, íleo, cólon (33-35, 37) e reto (38). A secreção de GLP-1 é estimulada por refeições mistas, contendo carboidratos, fibras alimentares, triglicerídeos, alguns aminoácidos, bem como proteínas, sendo estas últimas um estímulo fraco (36-38). A secreção de GLP-1 ocorre em padrão bifásico e é resultado do estímulo das células L do intestino distal pelo contato direto com os nutrientes. A primeira fase ocorre entre 10 e 15 minutos após a ingestão oral e a segunda fase ocorre entre 30 e 60 minutos após a ingestão (36, 37). Como a maioria das células L está localizada na região distal do intestino delgado, a primeira fase de secreção parece ser mediada por neurotransmissores (como acetilcolina) e pelo nervo vago, além de fatores endócrinos não totalmente conhecidos (como peptídeo liberador de gastrina), ao invés de estimulação direta das células L intestinais distais (33, 34, 36). Além disso, existem células L localizadas mais proximalmente no duodeno e no jejuno proximal que também poderiam desencadear a elevação precoce do GLP-1 no plasma, após contato direto do alimento com essas células (34, 36, 38). A concentração plasmática de GLP-1 é baixa no estado de jejum, na faixa de 5-10 pmol/L, e aumenta rapidamente após a ingestão oral, atingindo 15-50 pmol/L em aproximadamente 1 hora, (34, 35, 37) retornando à concentração basal em algumas horas (38).

O GLP-1 foi identificado como parte da sequência gênica que codifica o proglucagon (38). O gene que codifica o proglucagon é expresso em células L enteroendócrinas no intestino delgado e grosso, nas células alfa pancreáticas, nas papilas gustativas e em alguns neurônios no tronco cerebral caudal e no hipotálamo (36). O proglucagon contém a região codificante para o glucagon pancreático e para duas sequências semelhantes ao glucagon, GLP-1 e GLP-2

(38). As primeiras suposições relativas ao processamento pós-traducional não foram confirmadas, que descreviam que o GLP-1 seria um dos produtos de clivagem pós-traducional do gene do proglucagon (38).

O mesmo gene do proglucagon é processado de maneira diferente nas células  $\alpha$  do pâncreas endócrino, produzindo glucagon “pancreático” e “fragmento de proglucagon”, que não é processado posteriormente em GLP-1 e GLP-2 (38). A sinalização molecular para secreção de GLP-1 envolve processos de detecção de glicose, determinado pela ação da glicoquinase, canal de potássio dependente de ATP e co-transportador de sódio/glicose-1. Além disso, o receptor para o sabor doce estaria envolvido na secreção de GLP-1 (36).

O GLP-1 bioativo é gerado a partir do GLP-1 (1–37) e GLP-1 (1-36) amida, que ocorrem em quantidades não substanciais no plasma e são desprovidos de efeitos insulíntricos (38). Eles se convertem em duas formas moleculares bioativas equipotentes, GLP-1 (7–37) e GLP-1 (7–36) amida, respectivamente, sendo que esta última molécula representa a maior parte do GLP-1 ativo circulante no plasma humano (33, 34, 36, 38).

Tanto o GLP-1 como o GIP contêm uma alanina na posição 2, sendo rapidamente degradados pela enzima DPP4, com posterior eliminação renal e hepática (33, 34, 36). Como resultado da atividade da DPP4, a meia-vida plasmática do GLP-1 é de apenas 1-2 minutos (36, 37) e as frações ativas GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36) amida são convertidos nas formas inativas GLP-1 (9-37) e GLP-1 (9–36) amida, respectivamente, logo após sua liberação pelas células L do intestino distal (33-35). Assim, o GLP-1 biologicamente ativo e intacto representa apenas 15 a 25% do total de GLP-1 plasmático (34, 38). Há evidências de que o GLP-1 (9-36) amida teria papel na depuração de glicose e na regulação da função cardiovascular (33).

Na maioria das circunstâncias fisiológicas, as concentrações biologicamente ativas do GIP e do GLP-1 são substancialmente inferiores às concentrações totais, que englobam as frações ativas e formas inativas (38).

Tanto o GIP como o GLP-1 exercem suas ações por meio de receptores acoplados à proteína G estruturalmente distintos (GPCRs) (33, 34, 36, 37). Existem duas isoformas do receptor do GIP, de 466 e 493 aminoácidos, sendo predominantemente expressos nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e, em menor quantidade, no tecido adiposo, no coração e no sistema nervoso central (33). O receptor de GLP-1 (GLP-1R) possui 463 aminoácidos (33), sendo expresso nas células  $\alpha$  e  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e nos tecidos periféricos, incluindo os sistemas nervoso central (hipotálamo, hipocampo, hipófise e córtex) e periférico, coração, rim, pulmão, trato gastrointestinal (estômago e duodeno) (33, 34, 37), pele, células imunes (36) e endotélio (37). A expressão no fígado (36, 38), tecido adiposo e músculo é controversa; entretanto, a observação de que o GLP-1 tem efeitos sobre esses tecidos sugere a presença de receptores ainda não identificados (36).

A ativação dos receptores de GIP e GLP-1 nas células  $\beta$  pancreáticas pelos hormônios incretínicos leva a um rápido aumento dos níveis de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico), fechamento de canais de potássio, despolarização e influxo de cálcio intracelular, seguidos por exocitose de insulina, de forma dependente de glicose. A sinalização sustentada desses receptores está associada à ativação da proteína quinase A (PKA), indução da transcrição gênica, aumento da biossíntese de insulina e estimulação da proliferação das células  $\beta$  (33, 34, 36-38). Portanto, as ações insulínótropas dos hormônios incretínicos sempre exigem um certo grau permissivo de hiperglicemia, sendo seu papel aumentar as respostas de secreção de insulina iniciadas pela hiperglicemia (38). O limiar glicêmico absoluto abaixo do qual o GLP-1 não pode estimular a secreção de insulina foi identificado como aproximadamente de 66 mg/dL. Por outro lado, quanto maiores as concentrações de glicose, maior o grau de resposta incretínica, visando uma concentração plasmática de glicose quase uniforme (38).

O GLP-1 também aumenta a expressão de GLUT-2 e glucoquinase, que são sensores de glicose nas células beta, aumentando a eficácia da secreção de insulina em resposta à ingestão oral de glicose (36). Os estoques de insulina podem ser repostos por ação do GLP-1 via estímulo da expressão do gene da

pró-insulina (33, 36, 37). Nesse contexto, o fator de transcrição Pdx-1 é um importante alvo para as ações do GLP-1 na expressão do gene da insulina (33, 36). A ativação da sinalização de GLP-1R em linhagens de células exócrinas pancreáticas de roedores e de humanos pode iniciar uma diferenciação em direção a um fenótipo mais endócrino, em associação com expressão aumentada de genes como Pdx-1, glicoquinase e GLUT-2 (33). Tanto a ativação do GLP-1R quanto do receptor do GIP promovem resistência à apoptose e aumentam a sobrevivência das células  $\beta$ , em ilhotas de roedores e humanas (33, 34). O GLP-1 também reduziu a apoptose em ilhotas humanas, induzida por concentrações elevadas de glicose ou palmitato, isoladamente ou em combinação (33). Assim, estudos em animais e em humanos *in vitro* demonstraram que o GLP-1 foi capaz de estimular a preservação de células beta, incluindo a sua proliferação e neogênese, bem como a supressão de apoptose mediada por citocinas, com isso aumentando significativamente a sua massa funcional (36, 37).

A importância da ação das incretinas endógenas foi avaliada em estudos que empregam antagonistas peptídicos de receptores de incretinas ou em camundongos com deleção (*knockout*) dos genes que codificam os receptores de incretinas (33, 34, 36). Um dos antagonistas do GLP-1R usados nestes estudos é a exendina (9-39), que se liga ao receptor de GLP-1 e, assim, demonstra o papel fisiológico do GLP-1 endógeno na homeostase da glicose em roedores e humanos (33, 36). A exendina (9-39) aumenta a glicemia em jejum e pós-prandial e reduz secreção de insulina estimulada por glicose (33, 34, 36), podendo suprimir o efeito incretínico em 50-70 % (36). Além disso, aumenta a concentração sérica de glucagon em humanos quando a glicemia está normal ou elevada, bem como melhora o esvaziamento gástrico após a administração oral de glicose em roedores e aumenta a motilidade antropilórica-duodenal em humanos (33, 34). Em relação ao GIP, os estudos utilizaram antagonistas peptídicos ou anti-soros contra o receptor do GIP para avaliar sua função na homeostase glicêmica em roedores (33). O papel do GIP endógeno, diferentemente do GLP-1, seria somente no controle da glicemia pós-prandial, sem interferência na glicemia de jejum (33, 34). O antagonismo do GIP ou GLP-1 reduz a secreção de insulina e aumenta a glicose sérica após



teste oral de estimulação de glicose em roedores. Da mesma forma, roedores com mutações inativadoras nos receptores GIP ou GLP-1 também têm falha na secreção de insulina estimulada por glicose e intolerância à glicose (34).

A distribuição da expressão dos receptores de GLP-1 e de GIP não se restringe somente às células beta pancreáticas (34, 36, 37). Há muitas evidências de que os hormônios incretínicos têm vários efeitos biológicos adicionais, sendo isso particularmente verdadeiro no caso do GLP-1 (38). O GLP-1 também inibe a secreção de glucagon (34, 36, 37), o esvaziamento gástrico e a ingestão de alimentos (34, 36, 37); promove absorção de glicose por meio de mecanismos neurais (34, 36); melhora da sensibilidade à insulina periférica (36) e da função cardiovascular (33, 36, 37), renal e pulmonar (36).

A inibição da secreção de glucagon pode ser por via direta, em receptores de GLP-1 expressos em células alfa (33, 36-38), ou indiretamente via estimulação da secreção de insulina e da somatostatina (33, 36). A supressão do glucagon ocorre particularmente quando há hiperglicemia, levando a redução da produção hepática de glicose (38). Notavelmente, os efeitos sobre a secreção de glucagon, bem como aqueles sobre a secreção insulínica, são dependentes de glicose. Com isso, não há interferência com os mecanismos contra-regulatórios, sendo o risco de hipoglicemia reduzido, pois, quando a glicemia cai para concentrações abaixo da normalidade, a inibição sobre a célula alfa é bloqueada (33, 34, 36, 37). O GIP, por sua vez, estimula a secreção de glucagon, principalmente quando a concentração de glicose está baixa (38).

A desaceleração da taxa de esvaziamento gástrico é um determinante importante da ação do GLP-1 no controle da glicemia pós-prandial (33, 37, 38). O mecanismo responsável por essa ação do GLP-1 envolve a comunicação com o sistema nervoso central e periférico, com contribuição essencial dos aferentes vagais ascendentes que controlam a motilidade gastrointestinal dependente do GLP-1R (33, 37). A distensão gástrica estimula neurônios do tronco encefálico produtores de GLP-1 (33). Os receptores de GLP-1 também são expressos em células parietais gástricas, onde o GLP-1 pode regular diretamente a secreção de ácido gástrico. Outra ação do GLP-1 seria a

redução da secreção pancreática exócrina (37). Com a redução da motilidade e das secreções gastrointestinais, ocorre desaceleração da entrada de nutrientes na circulação sanguínea e consequente prevenção de excursões exageradas de glicose e triglicerídeos plasmáticos (37, 38). Desta forma, a inervação vagal, dependente de GLP-1R, controla a secreção e motilidade gastrointestinais (33, 37), pois devido à lentificação da motilidade gastrointestinal, as secreções gástricas e pancreáticas exócrinas são reduzidas (38). Entretanto, foi evidenciado que o esvaziamento gástrico também pode ser regulado via mecanismos intestinais diretos e específicos, pois em estudos de modelos animais com desnervação vagal o GLP-1 foi capaz de inibir em parte a motilidade gástrica (37).

O GLP-1 é um regulador chave da homeostase energética em curto e longo prazos, considerando que o GLP-1R é abundantemente expresso em áreas do tronco encefálico e hipotalâmicas que regulam o apetite e a ingestão de alimentos (33, 37, 38). O efeito anorexígeno induzido pela infusão de GLP-1 em indivíduos em jejum sugere que o GLP-1 pode afetar a saciedade, independentemente do retardo do esvaziamento gástrico (37). Tanto a ação central quanto periférica do GLP-1 desempenha papel sinérgico na regulação da ingestão de alimentos (37, 38). A ingestão promove a liberação de GLP-1 pelas células L intestinais que, em conjunto com a distensão gástrica, estimula os nervos aferentes vagais. Estes, por sua vez, ativam os neurônios do núcleo do trato solitário no tronco cerebral caudal produtores de GLP-1, que se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo (37). Nessa região hipotalâmica, ocorre a ativação do GLP-1R, que promove anorexia e saciedade. A estimulação crônica desses receptores está associada a redução da ingestão de alimentos e perda de peso (37, 38). Em contraste, o GIP tem pouco efeito sobre o esvaziamento gástrico ou o controle da ingestão de alimentos (33, 38). Outro efeito clinicamente relevante das incretinas no sistema nervoso central consiste na melhora cognitiva e neuroproteção em roedores conferida pelo GLP-1 e sobrevivência celular pelo GIP (33, 37).

O GLP-1 também pode mediar seus efeitos no controle da glicose por meio da ativação de sensores periféricos que favorecem a depuração de

glicose. O GLP-1 intraportal, mas não o GIP, aumenta a estimulação dos aferentes vagais hepáticos e eferentes vagais pancreáticos (33). Assim, os nervos aferentes vagais se comunicam com o SNC e, em seguida, os eferentes vagais se comunicam com o pâncreas a fim de promover secreção de insulina (33, 36). As vias vagais induzidas pelo GLP-1 desencadeiam efeitos insulíntricos acentuados mediados por neurônios, atuando como um efeito neuroincretínico na secreção de insulina (36). Desse modo, a liberação coordenada de nutrientes digeridos e de GLP-1 na circulação portal pode aumentar a depuração de glicose, independentemente das ações periféricas do GLP-1 circulante (33).

Os GLP-1R são expressos no sistema cardiovascular de roedores e de humanos (33) sendo que, provavelmente, os análogos de GLP-1 e o GLP-1 nativo exercem efeitos benéficos sobre esse sistema independentemente do seu potencial na redução de peso e de glicemia (37). Em modelos experimentais, demonstrou-se que o GLP-1 exerce ampla gama de efeitos cardiovasculares, como modulação da frequência cardíaca, pressão arterial, contratilidade miocárdica, tônus vascular e proteção contra lesão por reperfusão de isquemia ou por insuficiência cardíaca (33, 37). No sistema cardiovascular humano, o GLP-1R é expresso em cardiomiócitos, células endoteliais coronárias e células musculares lisas vasculares (37). Além disso, exerceria efeitos benéficos sobre a função cardíaca em seres humanos após infarto do miocárdio e angioplastia e na recuperação do quadro de insuficiência cardíaca (33, 37). Na maioria dos casos, entretanto, esses efeitos foram mostrados somente com altas doses ou concentrações de GLP-1. Assim, o papel fisiológico do GLP-1 no sistema cardiovascular não é totalmente conhecido (38).

O GLP-1 pode tanto aumentar a síntese de glicogênio hepático, quanto suprimir a produção hepática de glicose (gliconeogênese) via inibição da secreção de glucagon (36, 37) ou por meio do sistema nervoso autônomo (38). Porém, até o momento, não foram identificados receptores de GLP-1 no fígado (38). O GLP-1 também teria papel na diminuição da lipogênese e esteatose hepática (37). No tecido muscular, o GLP-1 melhoraria a sensibilidade

insulínica e a captação de glicose, enquanto que no tecido adiposo, reduziria a lipogênese, inflamação e favoreceria a termogênese (36).

O GIP pode promover o armazenamento de gordura no tecido adiposo subcutâneo em animais e permanece incerto se isso ocorre em humanos. A explicação para essa situação reside no fato de o GIP estimular a enzima lipase lipoproteica, a qual remove os ácidos graxos dos triglicerídeos associados aos quilomícrons, a fim de promover armazenamento dos ácidos graxos no tecido adiposo após re-esterificação. Os camundongos com deleção (*knockout*) do gene que codifica o receptor de GIP e que são submetidos a dieta hipercalórica não desenvolvem obesidade (38).

Ambos hormônios incretínicos possuem ação no metabolismo ósseo em roedores, na medida em que promovem redução da reabsorção óssea ao limitar a função e número de osteoclastos, bem como estimulam a formação e manutenção da massa óssea ao estimular os osteoblastos, especialmente em conjunto com a ingestão alimentar de cálcio (38). Entretanto, estudos de polimorfismos do gene que codifica o receptor de GIP em humanos demonstraram uma significativa heterogeneidade na massa óssea e risco de fratura (38).

A inibição da isoforma tubular renal do transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pelo GLP-1 aumenta a excreção urinária de sódio, exercendo efeitos natriuréticos e diuréticos, o que poderia contribuir para a redução da pressão arterial observada com os análogos humanos do GLP-1 (37). Outra ação renoprotetora esperada deste incretínico seria a redução da hiperfiltração glomerular (37).

Foi descrito a presença do RNA-m de GLP-1R em pneumócitos do tipo 2 de roedores, bem como a indução pelo GLP-1 da secreção de fosfatidilcolina, um componente importante do surfactante pulmonar (37).

### **2.3.2 Papel do sistema incretínico no DM2**

Como o GIP e o GLP-1 possuem a capacidade de aumentar a secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática, bem como o GLP-1 de suprimir a

secreção de glucagon, há um interesse considerável a fim de elucidar o papel desses hormônios incretínicos na fisiopatologia do DM2 (38, 184). Estudos iniciais demonstravam secreção levemente aumentada de GIP em diabéticos e secreção de GLP-1 reduzida após refeição mista (35, 38). Além disso, a resposta ao GLP-1 de indivíduos intolerantes à glicose foi descrita como sendo intermediária, comparada à de diabéticos (38, 184). Desta forma, foi aventado uma possível redução progressiva de secreção de GLP-1 com o avançar do DM2 (38).

Vários estudos observaram que a secreção do GIP é maior em pacientes DM2 do que em controles saudáveis. No entanto, as diferenças globais entre os sujeitos com DM2 e indivíduos saudáveis foram discretas e outros estudos mais recentes não detectaram diferenças significativas entre controles saudáveis e pacientes com DM2 (35). Uma discreta redução das respostas ao GLP-1 foi encontrada em comparação com indivíduos não diabéticos, especialmente durante a segunda hora após o estímulo nutricional (35).

Apesar do que foi exposto anteriormente, atualmente não há consenso na literatura sobre como se comporta a secreção de incretínicos em diabéticos, com alguns estudos demonstrando leve redução da secreção em resposta a uma refeição mista ou à sobrecarga oral de glicose, enquanto que outros indicando inalteração (35, 38, 184). Dados de metanálises sugerem não haver diferenças significativas entre diabéticos e indivíduos saudáveis. Além disso, a contribuição percentual do GLP-1 intacto em relação ao GLP-1 total foi semelhante em pacientes com diabetes tipo 2 e indivíduos controles saudáveis (35). Assim, é possível que a secreção dos incretínicos nos indivíduos com DM2 ocorra da mesma forma em indivíduos não diabéticos, obesos ou saudáveis (38).

Diferentemente, a atividade insulínica dos incretínicos encontra-se prejudicada nos diabéticos (38). Estudos com animais e em humanos confirmaram a incapacidade do GIP de produzir resposta insulínica em modelos animais ou sujeitos com DM2 (35, 38, 184). Parece haver pequena resposta inicial com duração de 30 minutos (primeira fase de secreção de

insulina) mas, mesmo quando são administradas doses supra-fisiológicas de GIP, não ocorre estímulo significativo da secreção de insulina (35, 38, 184). Além disso, não é observado nenhum efeito na secreção de insulina de segunda fase, independentemente da dose de GIP administrada. Assim, o maior defeito na resposta insulínica do GIP acontece na secreção de insulina da segunda fase (184). Diferentemente, o GLP-1 promove aumento da secreção de insulina em diabéticos, porém não da mesma magnitude que em indivíduos saudáveis (38). A resposta do GLP-1 na primeira fase de secreção de insulina foi reduzida na mesma extensão em que foi a resposta do GIP. (184). Em conjunto com esse defeito no estímulo à secreção de insulina, há falha do GLP-1 em suprimir a concentração sérica de glucagon, promovendo, assim, maior elevação da glicemia (38).

O efeito incretínico, que contribui para cerca de 2/3 da resposta insulínica normal, está reduzido em mais de 50 %, ou mesmo ausente, em indivíduos com DM2 (38, 185). Uma possível causa para essa alteração incretínica no DM2 seria um prejuízo na ativação de vias de sinalização relevantes (185). Nesse contexto, a incapacidade de resposta ao GIP teria papel relevante, sendo a contribuição do GLP-1 de menor importância, mesmo em indivíduos saudáveis (35, 38, 184).

As justificativas para uma menor resposta ao GIP seriam mutações com perda de função ou redução da expressão de receptores de GIP nas células  $\beta$  pancreáticas, descrita somente em animais (35, 38, 184, 185), além de redução da massa e função de células  $\beta$  (35, 38). Vários grupos relataram polimorfismos na região codificadora do gene do receptor de GIP, mas estes não foram associados com diabetes nem à sinalização defeituosa do receptor (184). Estudos em parentes de primeiro grau de pacientes diabéticos tipo 2 tolerantes à glicose mostraram redução da resposta insulínica do GIP em 50%, em comparação com controles sem histórico familiar de DM, indicando que o defeito do GIP poderia ser um defeito geneticamente determinado e possivelmente primário no DM2 (35, 184). Entretanto, a contribuição global do efeito incretínico nestes sujeitos foi considerada normal. Além disso, as respostas de secreção de insulina a um bôlus de GIP intravenoso administrado

em condições de jejum euglicêmico foram normais em uma grande coorte de parentes de primeiro grau de diabéticos tipo 2 (35). Conjuntamente com este achado, o acompanhamento dos parentes de primeiro grau de pacientes previamente estudados com DM2 não conseguiu estabelecer uma ligação entre a responsividade da secreção de insulina à estimulação do GIP e o subsequente risco de deterioração na homeostase da glicose (35).

Assim, está bem estabelecido que a resposta reduzida às incretinas não seria um evento primário no desenvolvimento do DM2, mas sim uma consequência do estado diabético (35, 38, 184, 185). Isso é reforçado pelo fato de que em pacientes com outras formas de diabetes, como DM1, LADA, MODY ou diabetes secundário a pancreatite, há ausência de resposta tardia ao GIP, da mesma forma que em indivíduos com DM2 (35, 184). Dessa forma, o defeito da resposta insulínica do GIP seria consequência do DM2 e não um defeito primário (35, 184, 185). Além disso, estudos em que pacientes diabéticos foram tratados intensivamente com insulina, objetivando controle glicêmico ideal, observaram melhora da atividade insulínica do GIP e GLP-1 (38, 184, 185).

Como a maquinaria intracelular da célula  $\beta$  do pâncreas diabético funciona normalmente quando testada com o GLP-1, cujo mecanismo de ação é idêntico ao do GIP (35, 184), especula-se se a falha de secreção de insulina em fases tardias no DM2 poderia resultar de uma dessensibilização e/ou internalização aumentada de um número normal ou reduzido de receptores de GIP (35, 184, 185), podendo essa insensibilidade dos receptores de GIP piorar com a hiperglicemia crônica e justificar a hipersecreção de GIP (35). Além disso, uma possível explicação para esse fenômeno é que o GLP-1 mobiliza as vesículas de insulina dentro das células  $\beta$  (*pool* de reserva) que não são alvo de estímulo do GIP ou da glicose. Alternativamente, o GLP-1 pode aumentar a secreção de insulina através do recrutamento de células  $\beta$  que eram anteriormente inativas (35).

Desta maneira, o defeito incretínico no DM2 tem duas causas principais: (i) a secreção pós-prandial levemente diminuída de GLP-1, de aproximadamente 15% (35) e (ii) a perda quase total da atividade

insulinotrópica do GIP (35, 184). Além disso, é descrito que uma reduzida sensibilidade das células  $\beta$  ao GLP-1 também poderia contribuir para esse defeito (184).

É provável que a perda desse importante mecanismo fisiológico de estímulo de secreção de insulina venha a deteriorar ainda mais a homeostase glicêmica, na medida em que a hiperglicemia crônica levaria a um ciclo vicioso pelo agravamento da glicotoxicidade, que promove maior perda de massa funcional de célula  $\beta$  e a diminuição da expressão de receptores de GIP, com consequente redução progressiva do efeito incretínico (38).



### 3 JUSTIFICATIVA

Estudos observacionais sugerem que o consumo regular de café está associado a redução do risco de DM2. Os mecanismos subjacentes a este efeito não são completamente compreendidos, mas podem envolver o aumento da secreção dos hormônios incretínicos, como o GLP-1 e o GIP, bem como melhora da resposta insulínica promovida por esses hormônios. Entretanto, poucos estudos exploraram este aspecto. Não está definido se o efeito do café sobre o sistema incretínico depende do tipo de café consumido (cafeinado ou descafeinado), do método utilizado para o seu preparo, ou se esses efeitos dependem de fatores metabólicos individuais, como glicemia e peso corporal. Considerando essa lacuna na literatura, esse estudo investigou o efeito de diferentes preparações de café sobre a concentração sérica de hormônios incretínicos e peptídeo C.

## 4 OBJETIVO

Investigar, em homens jovens e saudáveis, o efeito do consumo de café com e sem açúcar e do café descafeinado, em condições basais e durante o teste de estimulação intravenosa com glicose marcada (*Oral Dose Intravenous Label Experiment*, ODILE), sobre a concentração sérica de GLP-1, GIP e peptídeo C.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Nutrição do Núcleo de Nutrição e no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, com a colaboração do *Human Nutrition Research*<sup>11</sup>, *Medical Research Council* (Cambridge, Inglaterra), de forma sequencial a um estudo mais amplo abreviado por Glicafé, desenvolvido pelo grupo de pesquisa (186).

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, registro do projeto 005/2012 (**Anexo 1**). Todos os voluntários foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do início do estudo (**Apêndice 1**).

### 5.2 SUJEITOS DO ESTUDO

Os sujeitos do estudo foram recrutados através de cartazes e panfletos de divulgação da pesquisa na Universidade de Brasília, Brasil, de fevereiro de 2013 a junho de 2014.

Foram selecionados voluntários do sexo masculino, saudáveis, com idade entre 18 a 40 anos e índice de massa corporal (IMC) entre 18 a 24,9 g/m<sup>2</sup>.

#### 5.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos voluntários que se enquadrassem nos seguintes critérios:

---

<sup>1</sup> O *Human Nutrition Research* se denomina atualmente de *Elsie Wilddowson Laboratory* após a reforma dos centros de pesquisa realizado pelo *Medical Research Council* do Reino Unido a partir de 2016.

- Eutróficos definidos pelo percentual de gordura, avaliado pela bioimpedância.
- Não utilizar medicamentos que alterassem o metabolismo dos carboidratos.
- Não apresentar distúrbios do sono.
- Não ter doado sangue nos últimos 3 meses e não planejar doar nos próximos 3 meses.
- Apresentar consumo regular de desjejum ( $\geq 100$  kcal ingeridas no máximo 2 horas após acordar em mais de 4 dias por semana).
- Ser consumidor regular e moderado de café ( $\geq 100$  mL pelo menos 5 vezes por semana).

### 5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os voluntários portadores das seguintes comorbidades e/ou condições:

- *Diabetes mellitus* tipo 2.
- Dislipidemia.
- Hipertensão arterial.
- Cardiopatia.
- Hipotireoidismo não tratado.
- Anemia.
- Etilismo e tabagismo.
- História de evento prévio de desmaio ou convulsão.
- Consumo superior a 4,5 xícaras de café por dia.

O cálculo do número amostral foi realizado com base na sensibilidade à insulina, dada a importância do efeito do café no metabolismo glicídico. Apesar

da escassez de dados na literatura contendo a informação necessária para realizar o cálculo do tamanho da amostra (187-189), obtivemos esse dado que correlaciona a sensibilidade à insulina e o tamanho do efeito esperado que queríamos detectar a partir de um estudo prévio de um colaborador do nosso grupo de pesquisa (187). Foi utilizado G \* Power v 3.1.9.2 (<http://www.gpower.hhu.de/en.html>) para calcular o tamanho da amostra que resultaria em poder de pelo menos 80% para detectar uma diferença de tratamento de 0,01 L. pmol-1.h-1 com 95% de confiança, em que o desvio padrão da diferença (SD) entre os tratamentos é de 0,0126. O SD é calculado como a raiz quadrada da soma da variância entre pessoas igual a 0,004 L.pmol-1.h-1<sup>2</sup> menos o dobro da covariância entre os tratamentos, para explicar o fato de que as comparações foram realizadas no mesmo indivíduo. Assumiu-se uma correlação de 0,8 para as medidas obtidas na mesma pessoa. Com esses parâmetros de entrada, G \* Power estimou um tamanho de efeito de 0,8 e um tamanho de amostra igual a 15 pessoas.

Após a divulgação do estudo para recrutamento dos participantes, 78 pessoas fizeram contato inicial com o pesquisador por e-mail ou telefone. Destes, 26 completaram a primeira visita de triagem (entrevista), dos quais 20 completaram a segunda visita de triagem (avaliação clínica) e foram elegíveis. Dezesete participantes preencheram todos os critérios de triagem e completaram o protocolo de estudo. (Figura 1). As perdas de seguimento foram compensadas por novo recrutamento, e os novos sujeitos foram alocados às sessões experimentais de acordo com a sequência de quadrado de Williams, descrito com detalhes posteriormente.

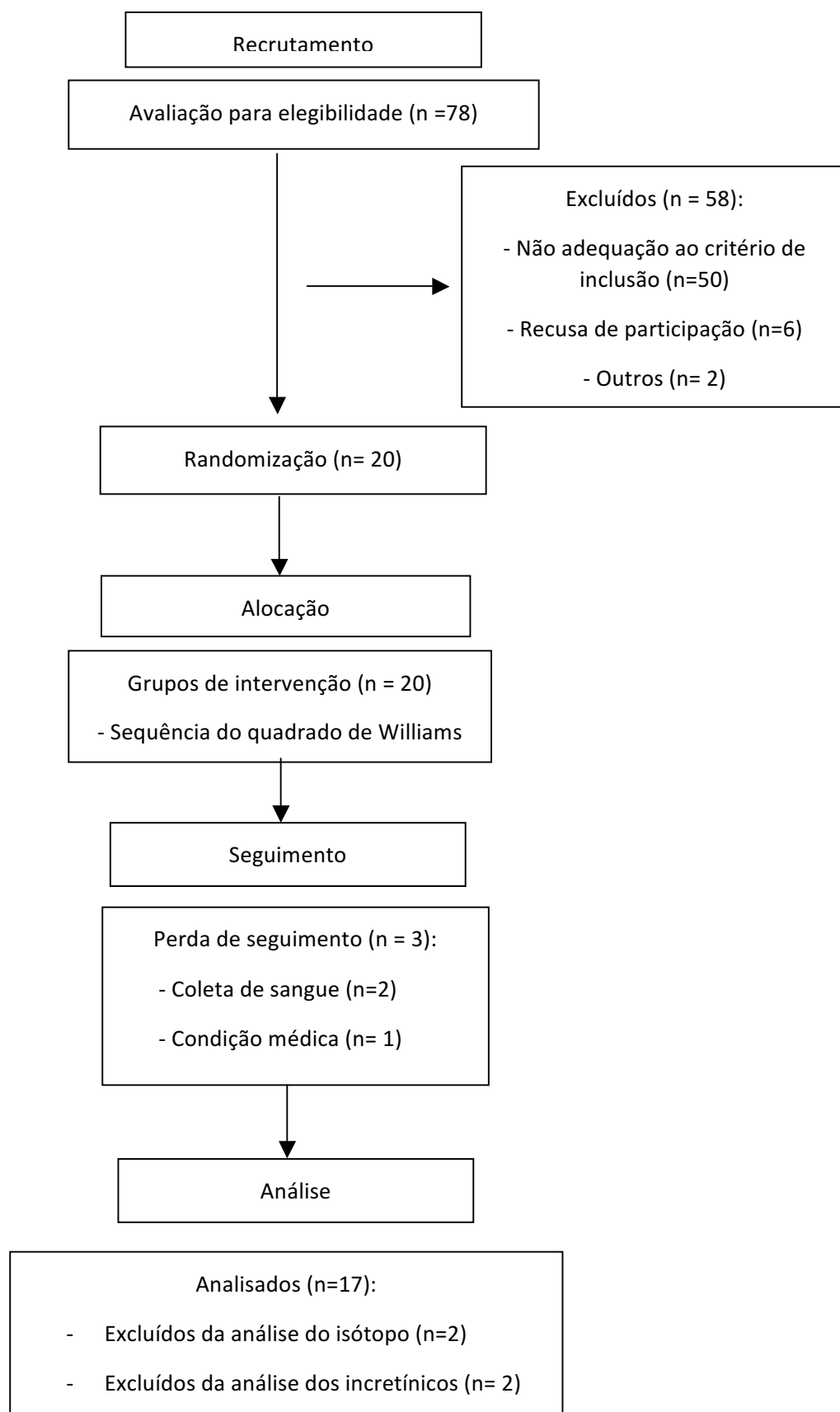


Figura 1. Fluxograma do estudo

### 5.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi conduzido um ensaio clínico randomizado, cruzado, monocego (pesquisadores) em que todos os voluntários participavam das 5 cinco intervenções propostas: café cafeinado com açúcar (CS), café cafeinado sem açúcar (CC), café descafeinado (DC), e 2 controles - água com açúcar (WS) e água sem açúcar (W).

Os sujeitos do estudo foram distribuídos de forma randomizada nos cinco tratamentos sequenciais, determinados pelo delineamento de quadrado de Williams. Nesse delineamento, a cada 10 sujeitos recrutados, eles eram alocados sequencialmente de modo que cada um dos tratamentos seguiu o próximo tratamento uma vez, até completar-se dez sequencias e reiniciar uma nova sequência. O primeiro sujeito foi aleatorizado na sequência de tratamentos, seguindo a sequência proposta no delineamento descrito abaixo (190):

A B E C D; B C A D E; C D B E A; D E C A B; E A D B C; D C E B A;  
E D A C B; A E B D C; B A C E D; C B D A E;

Em que A: café com açúcar; B: café sem açúcar; C: café descafeinado sem açúcar; D: água com açúcar; E: água sem açúcar.

Um único pesquisador foi responsável por atribuir a cada participante a respectiva sequência de tratamento e a supervisão da preparação das bebidas.

Os participantes foram orientados a não consumir café, cafeína, álcool ou realizar qualquer atividade física não habitual no período de 24 horas antes das sessões, e consumir uma refeição à noite com baixo teor de carboidratos antes de cada experimento (cerca de 38-40% de energia sob a forma de carboidratos). A duração total de cada visita foi de aproximadamente 6 horas, com um período de separação entre os tratamentos de acordo com o esquema apresentado na Figura 2. O período de separação foi proposto visando garantir plena hematopoese dos participantes antes de nova coleta de sangue.

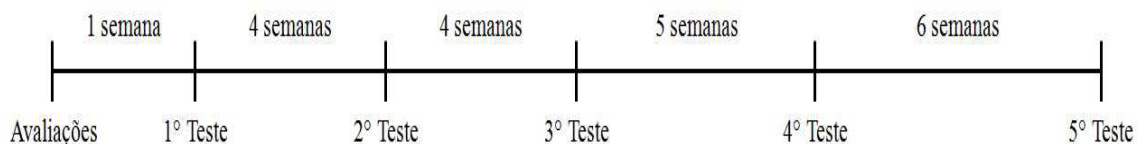


Figura 2. Esquema de periodicidade das coletas de dados do estudo Glicafé.

#### 5.4 PROCEDIMENTOS

Os voluntários eram orientados a comparecer ao Laboratório de Bioquímica da Nutrição (Núcleo de Nutrição, Universidade de Brasília) entre 07h00 e 09h00 (manhã), após um jejum de 12h.

Antes do início do experimento, agendava-se uma visita para confirmar os dados relativos aos critérios de inclusão e exclusão e o preenchimento do questionário de triagem (**Apêndice 2**), que consistia em avaliar os dados demográficos, a história médica pessoal e familiar, o consumo de café, a anamnese alimentar (recordatório de 24h), avaliação do nível de atividade física e do gasto energético, além da avaliação antropométrica e composição corporal, da aferição de pressão arterial e dosagem de glicemia sérica e hemograma

Antes do início de cada experimento, foram mensurados o peso corporal, pressão arterial e a glicemia capilar de jejum (Accu-Check Performa, Roche Diagnostics, Alemanha) para avaliar se os sujeitos do estudo estavam em jejum (glicemia < 99 mg/dL). Além disso, foi preenchido uma ficha de acompanhamento diário, em que era registrado o número de horas de sono na noite anterior, medicações em uso, intercorrências, uso de álcool, café ou bebidas cafeinadas, prática de atividade física, o horário da última refeição, o tipo e quantidade de alimentos ingeridos.

Em cada dia de experimento, durante o teste de ODILE (*Oral Dosing Intravenous Labeled Experiment*) (191), foram colocadas amostras de sangue dos voluntários para dosagens de glicose, insulina e glicose marcada, descrito no estudo Reis CEG (186), bem como amostras de sangue para dosagens de hormônios incretínicos (GLP-1 e GIP) e peptídeo C.

Após 10 minutos de repouso do voluntário, as amostras basais de sangue foram coletadas 10 minutos antes e imediatamente antes da

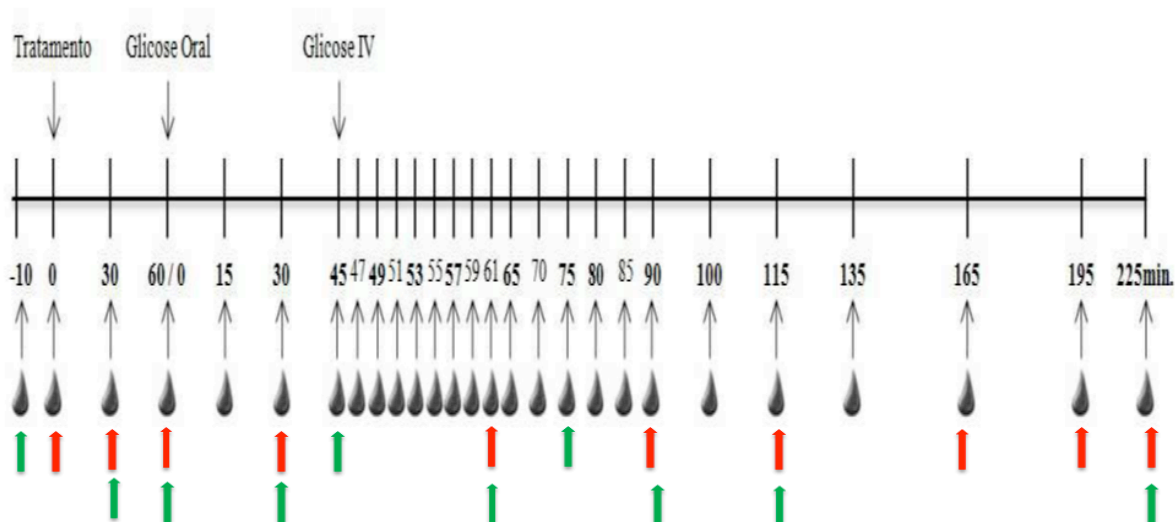


administração da bebida teste (-10 e 0 minutos) para as determinações bioquímicas. Em seguida, os voluntários ingeriram cada uma das bebidas teste, de acordo com a sequência do delineamento de quadrado de Williams, e amostras de sangue foram obtidas 30 e 60 minutos após. Neste momento (imediatamente após a amostra colhida em 60 minutos), a solução de 75g de glicose dissolvida em 300 mL de água (Glic UP 75, NewProv, Brasil) foi fornecida aos voluntários.

Assim, foram obtidas amostras de sangue em duplicada, de 1 mL cada, nos tempos 0 (logo antes da administração bebida teste), 30 e 60 minutos após a bebida teste, 30 min após a sobrecarga oral de glicose 75g, e nos tempos 61, 90, 115, 165, 195, 225 para dosagem dos hormônios GLP-1 (peptídeo semelhante a glucagon 1) e GIP (peptídeo insulínico dependente de glicose), conforme apresentado na Figura 3. As amostras de plasma foram colocadas em tubos siliconizados resfriados, do tipo Vacutainer®, contendo EDTA, em no máximo 30 segundos após a coleta.

Previamente ao experimento, eram adicionados 10 µL de inibidor da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-IV) a esses tubos, os quais eram mantidos resfriados, a fim de que não houvesse degradação, pela DPP-IV, dos hormônios estudados. Em condições fisiológicas, a meia vida dos mesmos é muito curta devido à ação desta enzima (GLP-1: 2 minutos e GIP 5-7 minutos).

Além do GLP-1 e GIP, foi dosado, nas amostras de soro, o peptídeo C, nos tempos -10, 30 e 60 min após ingestão da bebida teste, 30 min após a sobrecarga oral de glicose 75g, e nos tempos, 45, 61, 75, 90, 115 e 225 minutos (Figura 3).



Tratamento: Ingestão da bebida teste      Glicose IV: infusão do isótopo

▲ : Coleta sanguínea

Tempos 15, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 65, 70, 80, 85, 100, 135: parte do projeto Glicafé

→ : dosagem de GLP-1 e GIP

→ : dosagem peptídeo C

Figura 3: Esquema de coleta dos hormônios incretínicos GLP-1, GIP e do Peptídeo C durante o procedimento de ODILE

Durante o experimento, não foi permitido aos voluntários comer ou beber (exceto água) e assistir ou conversar sobre temas que pudessem influenciar as variáveis avaliadas (temas que gerassem excitação, que envolvessem comidas e alimentos, ou sobre o tipo de bebida recebida, de modo a manter o caráter monocego do experimento aos investigadores que aplicaram o tratamento e acompanharam as coletas de sangue). Foi permitido ler, ouvir música, assistir televisão, usar computador e utilizar o banheiro. Os voluntários foram monitorados durante todo o período do experimento por membros da equipe da pesquisa.

## 5.5 PROCEDIMENTOS EM CASO DE EMERGÊNCIA

Caso os sujeitos do estudo referissem algum mal-estar durante o experimento, era avaliado a presença de hipoglicemia por meio do glicosímetro digital (Accu-Check Performa, Roche Diagnostics, Alemanha) e de hipotensão por meio da medida da pressão arterial. Quatro sujeitos do estudo apresentaram síncope durante um experimento, sendo que tanto a glicemia capilar como a pressão arterial sistêmica estavam dentro da normalidade. Nesses casos, o experimento foi remarcado para um dia posterior.

Os procedimentos adotados em caso de hipoglicemia, perda de consciência e obstrução da cânula de acesso venoso estão descritos no Apêndice 3: “Procedimentos Padronizados em casos de Emergência”.

## 5.6 PREPARAÇÃO DAS BEBIDAS TESTE

O café torrado e moído em pó do tipo Arábica (*Coffea arabica* L. Arbusto) foi o utilizado nesse estudo. O modo de preparo das bebidas teste foi realizado da seguinte forma: ferveu-se 300 mL de água mineral em jarra pirex por 2,5 minutos em micro-ondas na potência alta. Pesou-se 30 gramas de pó de café torrado e moído no coador de papel filtro, espalhando de forma uniforme e encaixando-o no filtro. Logo antes da fervura (90°C), a água foi colocada sobre o pó umedecendo-o uniformemente; primeiramente, o pó de café era molhado da extremidade para o centro do coador; após, a água era despejada em até 5 minutos bem no centro do filtro sem misturar com a colher. Para o preparo do café adoçado, pesou-se 30g de açúcar e foi colocado no copo, despejou-se o café no copo sobre o açúcar, com homogeneização adequada. Para os controles (água com e sem açúcar), foi mensurado o volume de água (300 mL), adoçado ou não, também bem homogeneizado quando adoçado. O peso do copo antes e depois da ingestão das bebidas foi mensurado e essa diferença forneceu a quantidade de bebida consumida em gramas.

Dessa forma, o método para preparação do café, pelo coador de papel filtro, sempre foi realizado da mesma forma (30 g de café moído e 300 mL de

água), com 30g de açúcar ou sem açúcar. O café foi servido imediatamente após o preparo, em canecas idênticas opacas com tampa, utilizando um canudo da cor preta para a ingestão da bebida. Havia duas canecas idênticas, uma sempre utilizada para o descafeinado e a outra para o café cafeinado. Água (300 mL) com ou sem açúcar (30 g) foi servida à temperatura ambiente no mesmo tipo de caneca utilizada para servir o café.

Assim, tanto os pesquisadores foram cegos para os tratamentos, bem como os voluntários para os tipos de café ofertado (descafeinado ou não). Não foi servido leite nem outro ingrediente ou alimento com as bebidas teste.

## 5.7 ANÁLISE DO CAFÉ

A quantidade (mg / g) de cafeína, das frações 3-, 4-, 5- dos ácidos cafeoilquínicos (3-, 4-, 5- CQA) e dos ácidos cafeoilquínicos totais (CQA) foi analisada em quatro marcas comerciais de café, duas cafeinadas e duas descafeinadas, por cromatografia líquida de alta eficiência no Laboratório de Bioquímica Nutricional e Alimentar de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. A decisão de quais marcas comerciais que seriam utilizadas no estudo baseou-se na menor quantidade de cafeína para o café descafeinado e a maior proporção de CQA total em relação à cafeína para o café cafeinado (0,56 mg de CQA total versus 0,95 mg de cafeína). As quantidades de cafeína, das frações 3-, 4-, 5 de CQA e de CQA totais em mg/g nas marcas de café cafeinado (Café do Ponto Araulto, Coffea arabica L., São Paulo, Brasil) e descafeinado (Mellita descafeinado Clássico, São Paulo, Brasil) escolhidas para uso no estudo foram:

Quando 4. Quantidades em mg/g de cafeína, das frações 3-, 4-, 5 e totais dos ACG.

	Café cafeinado	Café descafeinado
Cafeína	19,93	3,40
3-CQA	4,22	2,80
4-CQA	5,14	3,39
5-CQA	9,63	6,15
CQA totais	18,99	12,35

O café torrado e moído preparado com o coador de papel filtro perde parcialmente alguns dos seus componentes (192). Considerando uma perda de 50 a 70% após o preparo (193), a faixa estimada de cafeína fornecida aos participantes (mg / kg de peso corporal) foi de 1,4 - 2,0 e 0,24 - 0,33 para o café cafeinado e descafeinado, respectivamente. Isto é considerado uma quantidade moderada em comparação aos níveis oferecidos em ensaios clínicos que investigaram o café e metabolismo de glicose (isto é, 5-6 mg / kg de peso corporal) (194, 195).

## 5.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA INGESTÃO ALIMENTAR

Foram avaliadas características antropométricas (peso, altura, índice de massa corporal, circunferência abdominal, pressão arterial e composição corporal por bioimpedância, bem como avaliação da ingestão alimentar antes de cada experimento, porém esses dados foram objeto de outro trabalho (186).

## 5.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue coletado foi centrifugado (4.000 rpm por 15 minutos) e aliqotado em microtubos de 1,5 mL, congelado e armazenado a -80°C para posterior análise. Ressaltando que o plasma coletado para análise dos incretínicos foi colocado em tubos com EDTA, contendo 10 µL do inibidor da enzima DPP-IV e o soro coletado para análise do peptídeo C foi colocado em tubos sem EDTA. Foi utilizado kits comerciais de ensaio imunoenzimático, ELISA (Millipore, Merck, Alemanha), conforme instrução do fabricante. As características dos ensaios utilizados estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Métodos utilizados para determinação das variáveis bioquímicas e suas características

Variável	Método de dosagem	Sensibilidade	CV		
			intra-ensaio	inter-ensaio	
GLP-1	Ensaio (ELISA)	imunoenzimático	2 pmol/L	7,4%	<1 a13%
GIP	Ensaio (ELISA)	imunoenzimático	4,2 pmol/L	6,45%	3,38%
Peptídeo C	Ensaio (ELISA)	imunoenzimático	0,05 ng/mL	3,1%	6,86%

### 5.9.1 Procedimentos do ensaio

O GLP-1 foi dosado com a utilização de kit de ELISA (Millipore, Merck, Alemanha), em placa de 96 poços. O ensaio foi realizado em duplicada, num

volume total de 200  $\mu\text{L}$  e executado em 2 dias diferentes. No primeiro dia, era adicionado 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem a cada poço da placa. Logo em seguida, a placa era incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Após, a placa era decantada e o excesso de tampão era descartado em papel toalha absorvente. Eram então adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio nos poços NSB (ligação não específica) A1 e A2, e 100  $\mu\text{L}$  aos poços restantes. Na etapa seguinte, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  dos padrões (2, 5, 10, 20, 50 e 100 pM), em ordem crescente, ao restante dos poços da fileira A (A3, A4, etc), e nos poços da próxima fileira (B) foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do controle de qualidade 1 (poços B3 e B4) e do controle de qualidade 2 (B5 e B6). Em seguida, foi colocado 100  $\mu\text{L}$  das amostras aos poços restantes. Por fim, a placa foi movida gentilmente para mistura apropriada, coberta com o selador e incubada por 24 horas a 4° C. No segundo dia, o líquido da placa era decantado e o excesso era descartado em papel toalha absorvente. Em seguida, lavava-se a placa 5 vezes com 300  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem por poço. Na quarta lavagem, a placa era incubada com o tampão de lavagem durante 5 min à temperatura ambiente. Após a quinta lavagem, removeu-se o excesso de tampão em papel toalha absorvente. Imediatamente após, era adicionado 200  $\mu\text{L}$  do conjugado de detecção em cada poço, e mantido em incubação durante 2 horas a temperatura ambiente. Na próxima etapa, a placa era decantada, lavada 3 vezes com tampão de lavagem e o excesso de tampão, removido em toalha absorvente. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de substrato diluído a cada poço, e depois, a placa era incubada por pelo menos 20 min à temperatura ambiente, no escuro. Assim, era avaliado se havia relação significativa de sinal: ruído no menor ponto da curva-padrão (ex 2 pM), e o maior ponto da curva padrão (ex 100 pM) na leitura máxima das unidades relativas de fluorescência do leitor. Se necessário, a placa era incubada por mais tempo. Quando se tivesse gerado fluorocromo em quantidade suficiente, era adicionado 50  $\mu\text{L}$  da solução stop (de interrupção da reação) a cada poço na mesma ordem em que o substrato havia sido adicionado. Depois disso, a placa era incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente no escuro para interromper a atividade da fosfatase alcalina. Por fim, era feito a leitura da placa num leitor de

fluorescência com um comprimento de onda de excitação/emissão de 355/460 nm.

O GIP foi dosado com a utilização de kit de ELISA (Millipore, Merck, Alemanha), em placa de 96 poços. Inicialmente, cada poço da placa era preenchido com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem diluído e incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após esse procedimento, a placa era decantada e removia-se a quantidade residual de todos os poços. Em seguida, 80  $\mu$ L de tampão de ensaio era adicionado, em duplicata, aos poços da placa relativo ao branco e aos poços das amostras. Além disso, 60  $\mu$ L do tampão de ensaio, também em duplicata, era adicionado aos poços da placa relativo ao padrão, ao controle de qualidade 1 e ao controle de qualidade 2. Na sequência, adicionou-se 20  $\mu$ L da solução matrix aos poços da placa relativo ao branco, padrão e controles de qualidade 1 e 2. Depois, foi adicionado, em duplicata, 20  $\mu$ L dos padrões na ordem de concentração ascendente (2000, 666,66, 222,22, 74,07, 24,69, 8,23 pmol/L) nos poços apropriados, bem como 20  $\mu$ L do controle de qualidade 1 e 20  $\mu$ L do controle de qualidade 2 aos poços apropriados. Após, adicionou-se 20  $\mu$ L das amostras desconhecidas, em duplicata, nos poços restantes. Para o melhor resultado, todas as adições devem ser concluídas em 30 minutos. Na etapa seguinte, a placa foi coberta com selador e incubada à temperatura ambiente durante 1,5 horas em um *shaker* de placa de microtitulação orbital, configurado para se movimentar em uma velocidade moderada, entre 400 a 500 rpm. Na sequência, foram removidos o selador e as soluções de decantação da placa. Depois, cada poço da placa foi lavado 3 vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem diluído, e procedia-se a decantação da placa após cada lavagem para remover o tampão residual. Após esse procedimento, adicionou-se 100  $\mu$ L do anticorpo de detecção a todos os poços, e logo em seguida, a placa era coberta com o selador e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora no *shaker* de placa de microtitulação orbital, numa velocidade moderada. Em seguida, o selador de placa era removido e as soluções da placa decantadas. Na sequência, os poços da placa eram lavados 3 vezes com 300  $\mu$ L do tampão de lavagem diluído, e após cada lavagem, a placa era decantada. Na próxima etapa, foi adicionado 100  $\mu$ L da solução enzimática em cada poço da placa, e logo após,



a placa era coberta com o selador e incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos nos *shaker* de placa de microtitulação na velocidade moderada. Em seguida, o selador foi removido e as soluções da placa decantadas. Na sequência, lavou-se os poços 3 vezes com 300  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem diluído, e após cada lavagem, era realizada a decantação da placa para remover o tampão residual. Na etapa seguinte, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução de substrato a cada poço, sendo a placa coberta pelo selador e incubada no *shaker* de placas durante 5 a 20 minutos. Era esperado a formação da cor azul nos poços relativo aos padrões, sendo que a intensidade da coloração era proporcional às concentrações crescentes de GIP. Por fim, o selador foi removido e 100  $\mu\text{L}$  da solução de parada foi adicionada à placa, sendo essa agitada manualmente para garantir uma mistura completa da solução em todos os poços. Esperava-se a transformação da cor azul em amarelo após a reação de acidificação. Assim, em um leitor de placas, foi avaliado a absorvância 450 nm e 590nm dentro de 5 minutos e assegurado de que não havia bolhas de ar em qualquer poço. Feito isso, era registrado a diferença de unidades de absorvância. A absorvância do padrão GIP mais alto deve ser aproximadamente 2.0-3.2 ou não exceder a capacidade do leitor de placas usado.

O peptídeo C foi dosado com a utilização de kit de ELISA (Millipore, Merck, Alemanha), em placa de 96 poços. Inicialmente, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem 1 vez a cada poço da placa, que foi em seguida incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Depois deste período, o tampão foi removido por decantação e os poços foram lavados, mais duas vezes, do mesmo modo. Após esta etapa, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  do tampão de ensaio em cada poço da placa relativo ao branco, padrão e controle de qualidade. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do tampão de ensaio em cada poço da placa relativo às amostras, e 10  $\mu\text{L}$  do tampão de ensaio aos poços da placa relativo ao branco. Na sequência, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  da solução matrix aos poços da placa relativo ao branco, padrão e controle de qualidade. Após isso, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  do controle de qualidade 1 e do controle de qualidade 2 em duplicata aos poços apropriados, bem como 10  $\mu\text{L}$  do soro das amostras dos voluntários em duplicata aos poços apropriados. Depois, foi adicionado 20

$\mu\text{L}$  do anticorpo de detecção a cada poço da placa, sendo ela coberta com selador e incubada em temperatura ambiente (20 a 25° C) durante 2 horas no *shaker* de microplacas. Após essa incubação, o selador da placa era removido e procedia-se a decantação, batendo a placa contra o papel absorvente para remover o excesso de soluções nos poços. Na etapa seguinte, cada poço da placa era lavado com 300 $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem 5 vezes, sendo a placa decantada após cada lavagem. Após esse procedimento, 80  $\mu\text{L}$  de solução enzimática foi adicionada em cada poço da placa, sendo ela coberta com o selador e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos no *shaker* de microplacas. Na próxima etapa, cada poço da placa era lavado novamente com 300  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem 5 vezes, e a placa era decantada após cada lavagem do mesmo modo. Na sequência, adicionou-se 80  $\mu\text{L}$  da solução de substrato a cada poço, a placa foi coberta com o selador e colocada no *shaker* de microplacas por 12 a 19 minutos. Após esse período, era esperado uma coloração azul nos poços relativo ao padrão com intensidade proporcional à concentração do peptídeo C. Em seguida, o selador foi removido e a reação era interrompida com a adição de 80  $\mu\text{L}$  da solução de parada em cada poço, além disso, a placa era agitada manualmente para assegurar a mistura completa da solução em todos os poços. Assim, era esperado que a coloração azul se tornasse amarela após a acidificação. Por fim, procedeu-se a leitura da absorbância a 450 nm em um leitor de placas em 5 minutos, assegurando-se que não havia nenhuma bolha de ar em nenhum poço. A absorbância do padrão mais concentrado deve ser de 2,4 a 2,8.

### **5.9.2 Cálculo da concentração dos hormônios incretínicos e peptídeo C**

As análises e cálculos da concentração dos hormônios incretínicos e peptídeo C foram realizados pelo site [myassays.com](http://myassays.com).

GLP-1: Para o cálculo da concentração da amostra utilizou-se a curva linear-linear spline. Como este é um ensaio direto de ELISA, a RFU (relative fluorescence unit) é diretamente proporcional à concentração de GLP-1 na amostra e pode, então, ser transformada em concentração.

GIP: A curva dose-resposta deste ensaio foi realizada por meio de uma equação logística 5-paramétrica.

Peptídeo C: A curva dose-resposta deste ensaio foi realizada por meio de uma equação logística sigmoide 5-paramétrica.

Para descrição dos resultados, a concentração dos peptídeos obtidas após a administração da bebida teste e antes da administração da sobrecarga oral de glicose foi considerada a “concentração basal” e a concentração dos peptídeos obtidas após a sobrecarga oral de glicose foi considerada a “concentração pós sobrecarga de glicose”.

## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o teste de Lavele para avaliar a homogeneidade da variância e o teste de Shapiro-Wilk para avaliação de normalidade. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi utilizada para detectar diferenças nas características basais e para avaliar a ingestão alimentar e, quando apropriado, o teste de Tukey para comparações post hoc. Com a utilização do programa SAS®, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), foi implementada análise de dados de medidas repetidas com procedimento misto (PROC MIXED), que considera a estrutura de covariância dos dados (196). O protocolo definido no PROC MIXED utilizou a opção REML; com o sujeito como efeito aleatório, tempo como medida repetida, opção de matriz de covariância ARh (autoregressiva heterogênea) e interação tempo tratamento para cada medida de concentração sérica hormonal e glicose. A matriz de covariância ARh foi utilizada porque o período de tempo entre as sessões de tratamento variou durante o protocolo (Figura 2). O modelo foi elaborado considerando os valores basais e o delineamento experimental (quadrado de Williams). Para avaliação da concentração sérica de GLP-1, o modelo também incluiu a ingestão de gordura no jantar da noite anterior à do experimento. A avaliação da composição desta refeição identificou maior ingestão de gordura anteriormente ao tratamento com água entre os voluntários. A média do quadrado mínimo do SAS PROC MIXED foi utilizada e comparada entre os tratamentos e, para cada

tratamento, entre os diferentes tempos analisados. O teste t para comparação das médias dos mínimos quadrados (LS means) foi implementado para comparar as médias das variáveis relativas a cada tratamento em cada ponto de tempo. Foi adotado como critério de significância estatística o valor  $p < 0.05$ . Os valores basais são apresentados como média e desvio padrão (SD), enquanto que os parâmetros de metabolismo da glicose (glicose, insulina, peptídeo C, GLP-1 e GIP) como as médias dos mínimos quadrados obtidas da análise de medidas repetidas e como erro padrão da média (SEM).

Utilizou-se uma comparação planejada contra as condições de controle, água ou água com açúcar, para reduzir o risco do erro de tipo I devido a comparações múltiplas e para responder às hipóteses levantadas. Um método B-Y (método Benjamin-Yekutieli) (197) foi aplicado ao valor p para comparações entre a água, e os tratamentos com café cafeinado e descafeinado, com um valor crítico de  $p < 0,02727$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS DO ESTUDO

Dezessete participantes completaram o protocolo do estudo e suas características basais estão apresentadas na Tabela 2. Todos os participantes eram consumidores habituais de café (1-3 xícaras/dia) e atendiam a exigência de glicemia em jejum menor que 70-99 mg/dL antes de cada sessão experimental.

Não houve diferenças significativas no peso corporal ( $p = 0,99$ ), glicemia capilar ( $p = 0,97$ ), ou número de horas de sono ( $p = 0,66$ ) no início de cada sessão experimental. Além disso, não houve diferenças significativas na ingestão de alimentos (energia, macronutrientes, consumo de fibra e cafeína, índice glicêmico, carga glicêmica;  $p > 0,08$ ) na refeição noturna antes de cada sessão experimental, com exceção da ingestão de gordura, significativamente maior na véspera da sessão que envolveu a administração de água (W) ( $p < 0,05$ ). A média de ingestão de gordura alimentar (SD) (g) para os grupos foi: café cafeinado com açúcar 32,5 (17,8) e água com açúcar 23,5 (12,9); café cafeinado sem açúcar 30,1 (19,3); café descafeinado 32,0 (20,7); e água 50,5 (18,7).

**Tabela 2.** Características basais dos sujeitos do estudo (n= 17).

<b>Variável</b>	<b>Média</b>	<b>SD</b>	<b>Varição</b>
Idade (anos)	26	4,4	20–35
Peso (kg)	72,2	5,7	61,1–80,9
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	23,4	2,0	20,0–27,7
Circunferência abdominal (cm)	84,1	4,4	77,0–92,0
Gordura corporal (%)	18,6	5,6	8,8–25,2
Pressão arterial sistólica (mmHg)	115	7,3	100–128
Pressão arterial diastólica (mmHg)	74	6,1	60–84
Glicemia de jejum (mg/dL)	88,2	7,2	73,8–97,2
Consumo de café (mL/dia)	247	121,8	100–500
Tempo de ingestão de café (anos)	8	5,1	2–20

## 6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS BEBIDAS ADOÇADAS E DAS BEBIDAS SEM AÇÚCAR SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLICOSE, INSULINA, PEPTÍDEO C, GLP-1 E GIP

Foram realizadas duas análises separadas em relação às respostas da concentração sérica de glicose, insulina, peptídeo C, GLP-1 e GIP às bebidas adoçadas, comparadas entre si, e entre as bebidas sem açúcar, também comparadas entre si.

Os dados foram analisados usando modelo Proc Mixed e são apresentados como média dos mínimos quadrados com erro padrão omitido para maior clareza. Valores médios foram comparados utilizando o teste t de Student.

Foi observado que a comparação dos resultados obtidos em resposta à ingestão do café cafeinado com açúcar com os da água com açúcar permitiram determinar o efeito do café sobre as diferentes variáveis analisadas. O efeito das diferentes preparações de bebida (café cafeinado sem açúcar e café descafeinado) sobre estas variáveis foi observado comparando-se os efeitos destas preparações com o efeito da água pura.

Estes efeitos também foram analisados em condições basais (somente em resposta à administração da bebida teste) e após a administração de glicose (via oral seguida pela administração via intravenosa). Sendo que os resultados relacionados a glicose marcada intravenosa foram discutidos em 2 outros trabalhos desse grupo de pesquisa (39, 186) e não representam o foco do presente estudo.

### **6.2.1 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica de glicose e insulina**

Esses resultados também não foram escopo desse trabalho, porém, serão descritos de forma resumida. Para maiores detalhes vide os estudos publicados previamente (39, 186).

Os resultados referentes aos experimentos com as bebidas teste adoçadas (café cafeinado com açúcar e água com açúcar) foram os seguintes: as concentrações séricas de glicemia e de insulina aumentaram após 30 minutos do consumo de água com açúcar, quando comparado ao café cafeinado com açúcar ( $p < 0,05$ ). Além disso, após 90 minutos ou 30 minutos depois da ingestão de 75 g de dextrosol, o café cafeinado com açúcar

proporcionou maior elevação da concentração sérica de insulina, quando comparado à água com açúcar ( $p < 0,05$ ).

### **6.2.2 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica de peptídeo C**

Após 30 minutos, a concentração sérica de peptídeo C foi superior em resposta à ingestão de água com açúcar, quando comparada ao café cafeinado com açúcar (Figura 4).

Após 90 minutos, ou 30 minutos depois da ingestão de 75g de dextrosol, foi observado aumento da concentração sérica de peptídeo C, maior em resposta ao café cafeinado com açúcar, quando comparado à água com açúcar. Após 105 minutos (45 minutos depois da ingestão de 75g de dextrosol), foi observado maior concentração de peptídeo C em resposta à água com açúcar, quando comparado ao café cafeinado com açúcar (Figura 4).

Após 121 minutos, ou 61 minutos depois da ingestão de 75g de dextrosol, foi observada maior concentração do peptídeo C em resposta à água com açúcar, quando comparada ao café cafeinado com açúcar. Ao final do experimento, aos 285 minutos, a concentração de peptídeo C foi superior em resposta à água com açúcar, quando comparado com o café cafeinado com açúcar (Figura 4).



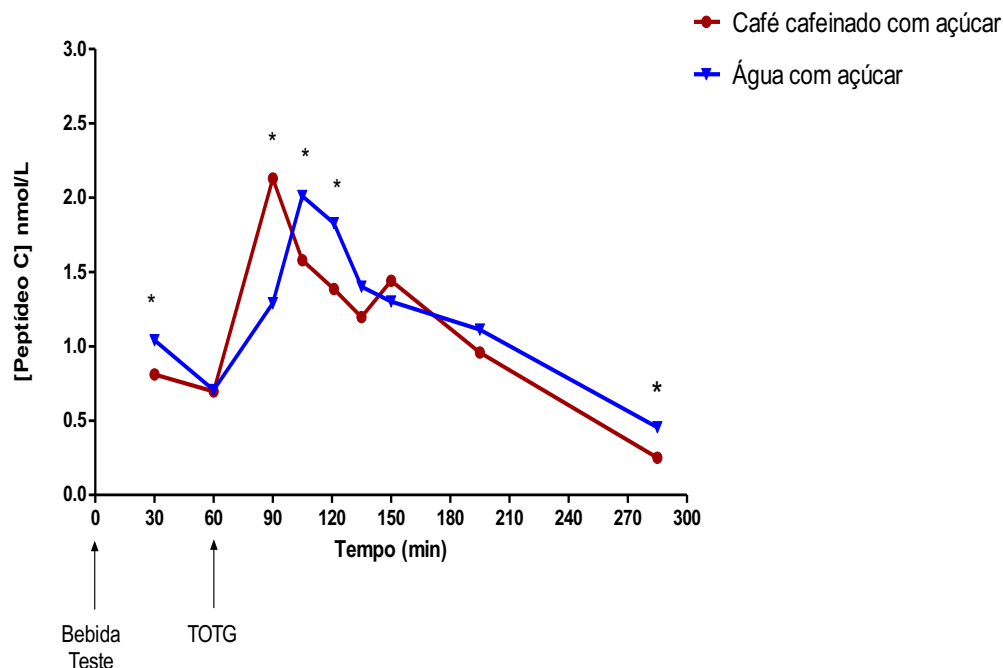


Figura 4. Concentração sérica de peptídeo C após a administração de café cafeinado com açúcar e água com açúcar. Foi usado o teste t para comparações entre os dois grupos e os valores médios foram estatisticamente significantes se  $p < 0,05$ . (\*)

### 6.2.3 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GLP-1

Observou-se que 30 e 60 minutos após a ingestão das bebidas teste, houve elevação significativa da concentração sérica de GLP-1 em resposta ao café cafeinado com açúcar, quando comparado à água com açúcar (Figura 5).

Nos demais períodos de tempo analisados, incluindo após a ingestão de 75g de dextrosol no tempo 60 minutos, não foi observada diferença da concentração sérica de GLP-1, quando se comparou o café cafeinado com açúcar e a água com açúcar (Figura 5).

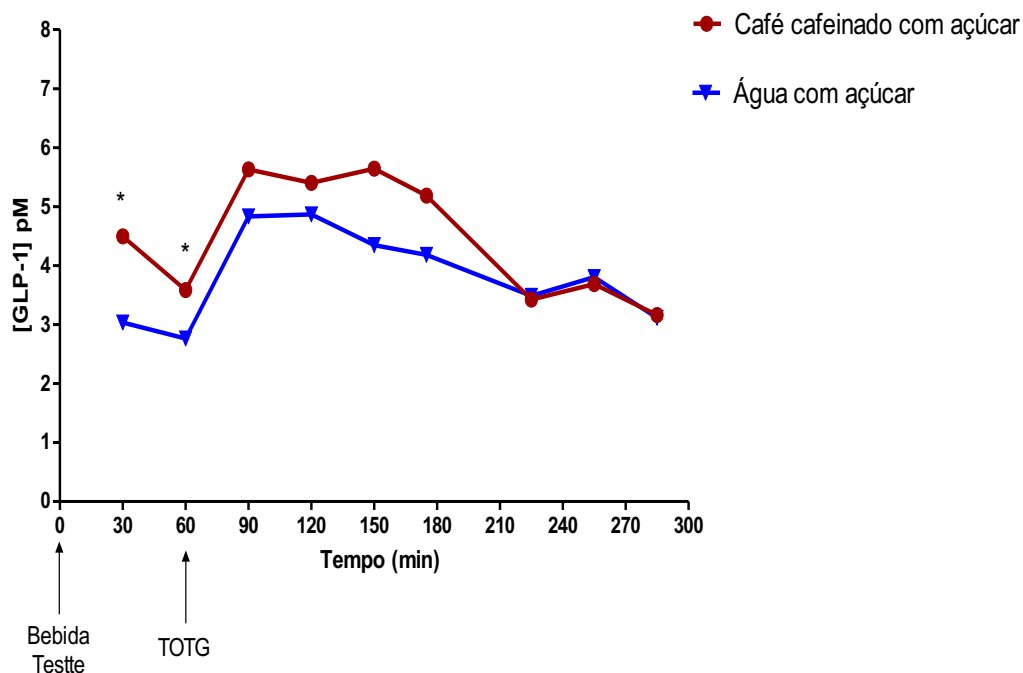


Figura 5. Concentração sérica de GLP-1 após a administração de café cafeinado com açúcar e água com açúcar. Foi usado o teste t para comparações entre os dois grupos e os valores médios foram estatisticamente significantes se  $p < 0,05$ . (\*)

#### 6.2.4 Avaliação do efeito das bebidas adoçadas sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GIP

A concentração sérica de GIP elevou-se com maior magnitude 30 e 60 minutos após a ingestão da água com açúcar, em relação ao café cafeinado com açúcar. (Figura 6). Entretanto, 90 e 120 minutos após ingestão do café cafeinado com açúcar (30 e 60 minutos após 75 g de dextrosol), houve maior aumento do GIP, quando comparado à água com açúcar (Figura 6).

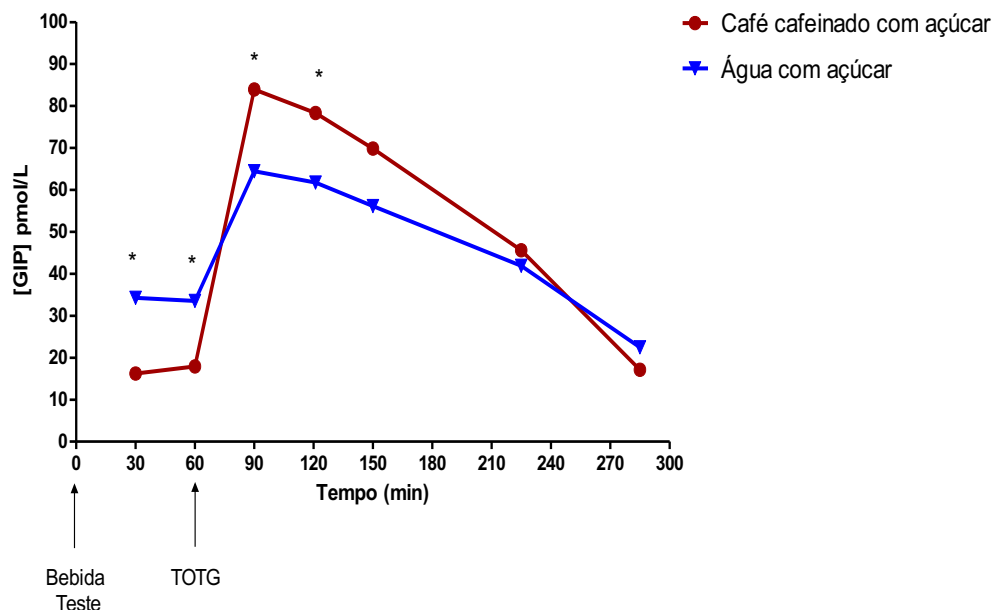


Figura 6. Concentração sérica de GIP após a administração de café cafeinado com açúcar e água com açúcar. Foi usado o teste t para comparações entre os dois grupos e os valores médios foram estatisticamente significantes se  $p < 0,05$ . (\*)

### 6.2.5 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica de glicose e insulina

Esses resultados também não foram escopo desse trabalho, porém, serão descritos de forma resumida. Para maiores detalhes vide os estudos (39, 186).

Os resultados referentes aos experimentos com as bebidas teste não adoçadas (café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água) foram os seguintes: após 90 minutos, ou 30 minutos depois da ingestão de 75g de dextrosol, foi observado aumento da concentração sérica de glicose em resposta ao café cafeinado sem açúcar, quando comparado ao café descafeinado ( $p < 0,027$ ). Nos demais períodos de tempo analisados, não foi observada diferença da concentração sérica de glicemia, quando se comparou as 3 bebidas teste não adoçadas. O mesmo ocorreu em relação a

concentração sérica de insulina, não houve significância estatística da concentração desse hormônio após a ingestão do café cafeinado sem açúcar, do café descafeinado e da água.

### 6.2.6 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica de peptídeo C

Foi observado que 135 minutos após a ingestão de café cafeinado sem açúcar, a concentração de peptídeo C foi superior, em relação ao café descafeinado (Figura 7). Nos demais períodos de tempo analisados, não foi observada diferença da concentração sérica de peptídeo C, quando os diferentes tratamentos não adoçados foram comparados (Figura 7).

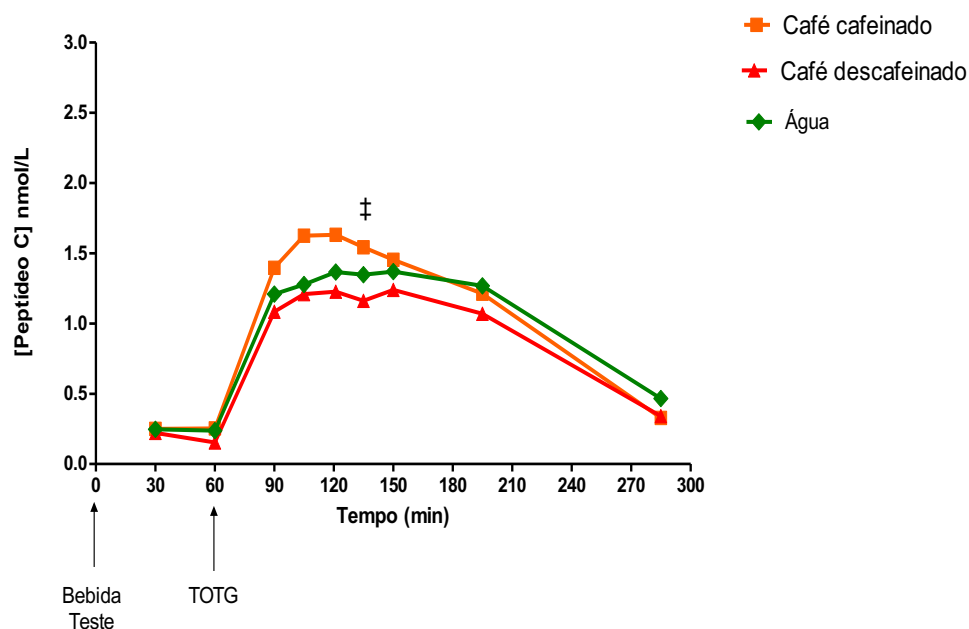


Figura 7. Concentração sérica de peptídeo C após a administração de café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água. Diferença significativa: ‡ café cafeinado sem açúcar vs café descafeinado. Uma correção de valor crítico para a comparação múltipla foi aplicada com Método B-Y ( $p < 0,02727$ ).

### 6.2.7 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GLP-1

Após 30 minutos da ingestão do café cafeinado sem açúcar, a concentração sérica de GLP-1 foi superior em relação ao café descafeinado, não sendo observada diferença na concentração sérica do GLP-1 nos demais períodos de tempo analisados, quando os diferentes tratamentos não adoçados foram comparados (Figura 8).

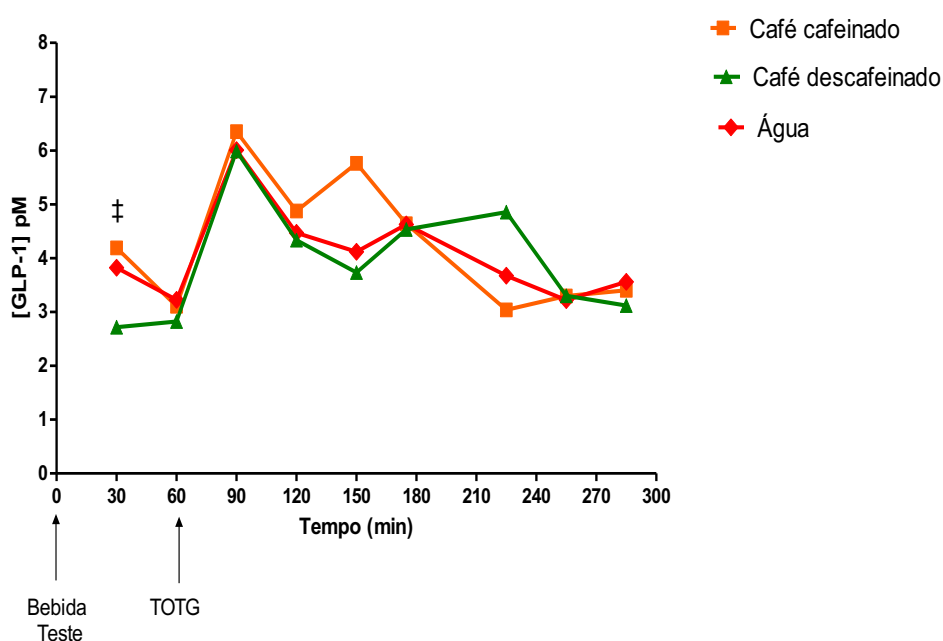


Figura 8. Concentração de GLP-1 após a administração de café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água. Diferença significativa: ‡ café cafeinado sem açúcar vs café descafeinado. Uma correção de valor crítico para a comparação múltipla foi aplicada com Método B-Y ( $p < 0,02727$ ).

### 6.2.8 Avaliação do efeito das bebidas sem açúcar sobre a concentração sérica do hormônio incretínico GIP

Em relação a concentração sérica de GIP, não houve diferença estatística em todos os períodos de tempo avaliados, tanto após a ingestão das

bebidas testes não adoçadas, como após a ingestão de 75g de dextrosol (Figura 9).

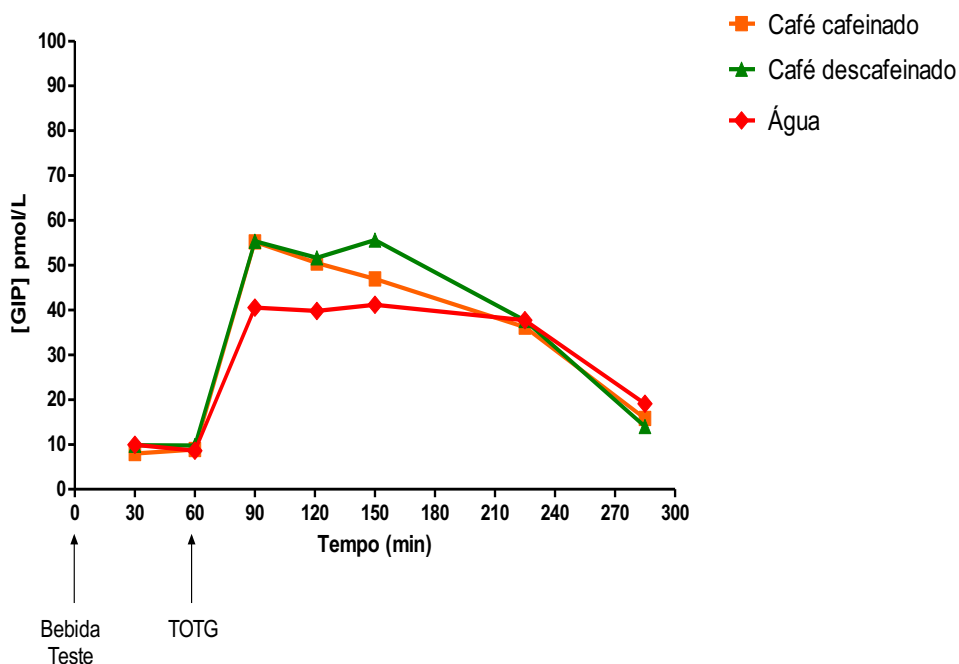


Figura 9. Concentração sérica de GIP após a administração de café cafeinado sem açúcar, café descafeinado e água.

Assim, essa avaliação subdividida dos efeitos das bebidas adoçadas entre si (café cafeinado com açúcar e água com açúcar) e das bebidas sem açúcar (café cafeinado sem açúcar, café descafeinado, e água) sobre as variáveis estudadas nos permitiu verificar que a concentração sérica pós-absortiva de peptídeo C aumentou nos dois tratamentos que contêm açúcar 30 e 60 minutos após a ingestão das bebidas testes. Após a sobrecarga oral de glicose, houve um pico na concentração sérica de peptídeo C 90 minutos após a ingestão da bebida teste (30 minutos após a sobrecarga oral de glicose). A ingestão do café cafeinado com açúcar promoveu maior elevação da concentração sérica de peptídeo C e GIP em comparação com água com

açúcar no tempo 90 (Figura 4 e 6). A concentração sérica de peptídeo C foi significativamente maior após 135 minutos da ingestão do café cafeinado sem açúcar, comparado ao café descafeinado. (Figura 7). A concentração sérica de GLP-1 foi superior após 30 minutos da ingestão de café cafeinado sem açúcar em relação ao café descafeinado (Figura8).

A Tabela 3 mostra os resultados da análise do modelo misto com os parâmetros metabólicos para cada tratamento, descritos como média LS  $\pm$  SEM. Não foram observadas diferenças significativas na concentração sérica de GLP-1 ( $p = 0,43$ ) entre os tratamentos durante os experimentos de 285 minutos. As concentrações séricas de peptídeo C e de GIP mostraram diferença significativa entre os tratamentos, porém foram atribuídas à presença de açúcar. Observando-se os grupos analisados, não foram detectadas diferenças estatísticas. Por exemplo, na comparação entre o café descafeinado e o café cafeinado sem açúcar para a avaliação do peptídeo C, o valor de  $p$  calculado foi de 0,0292, mas após a correção do método B-Y, ele não alcançou significância estatística.

Tabela 3. Média dos mínimos quadrados dos parâmetros metabólicos em cada grupo de tratamento.

Tratamento	Peptídeo-C		GLP-1		GIP	
	(nmol/L)		(pM)		(pmol/L)	
	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
Café cafeinado com açúcar	1,16	0,08	4,47	0,27	47,00	2,80
Água com açúcar	1,24	0,08	3,83	0,27	44,92	3,00
Café cafeinado	1,08	0,07	4,30	0,28	31,63	2,98
Café descafeinado	0,86	0,07	3,93	0,28	33,42	2,88
Água	0,98	0,07	4,08	0,29	28,10	3,02
Valor de <i>p</i>	0,002		0,43		<0,0001	

GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon-1; GIP: peptídeo inibidor gástrico. N=17

O valor de *p* refere-se ao procedimento de modelo misto (PROC MIXED) com sujeito como efeito aleatório e tempo como medida repetida para comparar os efeitos das bebidas. Nenhuma diferença significativa foi detectada para comparação planejada entre as bebidas contendo açúcar. Também não foi detectada diferença significativa para comparações entre as bebidas sem açúcar.



## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do café com e sem açúcar e do café descafeinado sobre a concentração sérica do GLP-1, GIP e peptídeo C em homens jovens e saudáveis. A água adoçada foi o controle do café cafeinado adoçado e a água pura, do café cafeinado não adoçado e do café descafeinado. Estes efeitos foram analisados em condições basais (somente em resposta à administração da bebida teste) e após a administração de glicose por via oral.

Houve maior ingestão de gordura na refeição noturna antes de cada sessão experimental no grupo controle água (W) ( $P < 0,05$ ). Apesar disso, não há descrição na literatura do efeito da distribuição de macronutrientes sobre a ação do café na glicemia ou hormônios incretínicos.

Os resultados foram separados considerando as bebidas adoçadas (café cafeinado adoçado e água com açúcar) e não adoçadas (café cafeinado, café descafeinado e água), para se avaliarem os efeitos de cada bebida com seu controle mais facilmente.

Na análise das bebidas adoçadas, a concentração sérica de peptídeo C basal foi menor após a ingestão de café cafeinado com açúcar, em relação à água com açúcar. Porém, após a sobrecarga de glicose, a concentração sérica de peptídeo C elevou-se de forma mais rápida, como também caiu mais precocemente, após a ingestão de café cafeinado com açúcar em relação à água com açúcar. Estes dados apontam para possível efeito do café em aumentar a função secretória da célula beta pancreática em resposta à sobrecarga oral de glicose.

A análise dos hormônios incretínicos evidenciou respostas diferentes quando foi avaliada a ingestão das bebidas adoçadas. A concentração sérica de GLP-1 basal foi maior em resposta ao café cafeinado com açúcar, comparado à água com açúcar. Entretanto, o café cafeinado não modificou a concentração sérica deste hormônio após a administração de glicose via oral. Estes resultados sugerem que o café possa apresentar efeito discreto sobre a secreção de GLP-1, não mais observado em cenário de exposição a sobrecarga de glicose, um potente estímulo para a secreção deste hormônio (35-38).

A concentração sérica basal de GIP, por sua vez, foi menor após a ingestão de café cafeinado com açúcar, comparado à água com açúcar. Quando se administrou a glicose oral, sua concentração sérica aumentou de forma mais significativa após a ingestão de café cafeinado com açúcar, comparado à água com açúcar. A quantidade de açúcar presente no café adoçado era de 30 gramas, enquanto que a quantidade de glicose administrada durante o teste de sobrecarga oral era de 75g. Dessa forma, foi necessária uma maior carga glicêmica associada ao café cafeinado para se observar aumento da secreção de GIP.

O efeito das preparações de café não adoçados (café cafeinado sem açúcar e café descafeinado) sobre as variáveis analisadas foi comparado com o efeito da água pura. Nesta análise das bebidas não adoçadas, após a sobrecarga oral de glicose, a elevação da concentração sérica do peptídeo C foi menor após a ingestão de café descafeinado, em relação à de café cafeinado. Não houve alterações significativas quando se avaliou o efeito destas bebidas teste sobre as concentrações basais do peptídeo C. Este achado sugere que a cafeína contribuiria para maior secreção de insulina em resposta à sobrecarga de glicose.

Em relação aos hormônios incretínicos, a concentração sérica basal de GLP-1 foi menor após a ingestão de café descafeinado sem açúcar, comparado ao café cafeinado sem açúcar. Entretanto, estas bebidas testes não promoveram mudanças significativas da concentração sérica de GLP-1 após a sobrecarga oral de glicose, bem como sobre a concentração sérica de GIP basal ou após a administração oral de glicose. Considerando-se que (i) o café cafeinado com açúcar aumentou a concentração sérica de GLP-1 em relação à água com açúcar, (ii) o café cafeinado sem açúcar não modificou a concentração sérica de GLP-1 em relação à água e (iii) o café descafeinado sem açúcar resultou em menor concentração sérica de GLP-1 em comparação com o café cafeinado sem açúcar, é possível que a cafeína antagonize a ação de algum composto, presente no café, que reduz a concentração de GLP-1 e que a cafeína potencialize o efeito de carga menor de glicose (30g, como a presente na bebida teste), mas não de carga maior (75g) sobre a secreção de GLP-1. A primeira possibilidade explicaria o efeito do café descafeinado em reduzir a concentração basal de GLP-1, ao passo que o segundo explicaria o efeito do café cafeinado com açúcar aumentar a concentração desta incretina.

No estudo de Johnston et al (2003) (198), foi observado redução da concentração de GIP durante todo o experimento, com duração de 180 min, após a ingestão de café cafeinado e descafeinado adoçados, comparado ao controle (água com açúcar). Estes achados são similares aos do presente estudo, pois a concentração de GIP basal foi menor após a ingestão de café cafeinado com açúcar, em relação à água adoçada. Entretanto, neste estudo, após a sobrecarga glicêmica de 75 gramas, a concentração do GIP foi maior após o consumo de café adoçado, comparado a água com açúcar, provavelmente devido à maior carga glicêmica. No estudo de Johnston et al (2003) (198), não foi avaliada a resposta incretínica após esta sobrecarga glicêmica. Em relação ao GLP-1, Johnston et al (2003) (198) observou aumento da concentração sérica de GLP-1 após a ingestão de café descafeinado adoçado em relação à água adoçada, entre o tempo 0 e o tempo 120 minutos (incremento da área sobre a curva). Porém, o café descafeinado adoçado não foi avaliado no presente estudo.

No estudo de Greenberg et al (2010) (195), foi observado que o café descafeinado sem açúcar suscitou menor concentração sérica de GIP comparado à bebida teste contendo cafeína e ao placebo contendo água pura, 60 minutos após a ingestão das bebidas teste e antes da sobrecarga oral de glicose. No presente estudo, as bebidas não adoçadas (café cafeinado, café descafeinado e água pura) não levaram a modificação significativa da concentração sérica de GIP basal e pós estímulo por sobrecarga oral de glicose. Isso pode ser justificado pelo fato no estudo de Greenberg et al (2010) (195) terem sido fornecidos 57 gramas de café descafeinado, enquanto no presente estudo a quantidade foi de apenas 30 gramas. Além disso, o presente estudo não avaliou uma bebida teste contendo somente cafeína.

Similarmente ao presente estudo, Olthof et al (2011) (199) evidenciaram que 12 gramas de café descafeinado não adoçado não alteraram significativamente a concentração global (área sob a curva) do GLP-1 ou do GIP em relação ao placebo (1 grama de manitol) durante o teste de sobrecarga oral.

No estudo de Beaudoin et al (2011) (200), o café cafeinado e descafeinado sem açúcar desencadearam uma maior concentração sérica de GLP-1 após a sobrecarga de glicose oral de 75 gramas, comparado ao controle água. O café

cafeinado sem açúcar, isoladamente, promoveu aumento do GIP neste mesmo tempo, em relação ao café descafeinado sem açúcar e ao controle. Estes achados não foram confirmados no presente estudo, pois após a sobrecarga de glicose tanto a concentração de GLP-1 como a de GIP não se alteraram de forma significativa, quando foram avaliadas as bebidas teste não adoçadas. Uma explicação possível para estas diferenças é que o estudo de Beaudoin et al (2011) (200) avaliou o comportamento dos hormônios incretínicos após o consumo inicial de uma bebida teste, com conteúdo lipídico, previamente às bebidas teste contendo café e ao teste oral de tolerância à glicose, diferentemente do presente estudo, em que não houve esta análise prévia com a bebida de conteúdo lipídico. Sabe-se que além da glicose e dos carboidratos, os lipídios também estimulam a secreção de GLP-1 e GIP (38).

Ainda em relação ao estudo de Beaudoin et al (2011) (200), a concentração basal de peptídeo C não se modificou após a ingestão de café cafeinado ou descafeinado não adoçados, comparado ao controle água não adoçada, o que está em concordância com os achados do presente estudo. Após a sobrecarga de glicose oral, também não houve alteração da concentração de peptídeo C quando foi avaliada a ingestão de café cafeinado ou descafeinado não adoçados comparados entre si ou ao controle água. Entretanto, no presente estudo, a concentração de peptídeo C foi reduzida após a ingestão do café descafeinado sem açúcar, comparado ao café cafeinado sem açúcar, após a sobrecarga de glicose. Ambos os estudos analisaram o café filtrado, porém a quantidade de café em gramas, bem como a quantidade de cafeína presente no café cafeinado administrado, foram maiores no presente estudo. Apesar disso, o estudo de Beaudoin et al (2011) (200) não menciona a quantidade de cafeína presente no café descafeinado utilizado. Com isso, se for considerado que a quantidade de cafeína do café descafeinado utilizado no estudo de Beaudoin et al (2011) (200) foi maior que a do presente estudo, este aspecto poderia justificar a diferença encontrada entre os estudos.

No estudo de Fernemark et al (2013) (201), foi avaliado o efeito de três tipos de dieta, incluindo somente café da manhã e almoço, na concentração sérica de glicose, insulina e GIP. A dieta com baixo teor de gordura foi considerada o controle, sendo comparada com a dieta de baixo teor de carboidrato e com a dieta Mediterrânea. O café cafeinado não adoçado era fornecido aos participantes no café

da manhã dos três tipos de dieta, porém, na dieta Mediterrânea, o café cafeinado não adoçado era o único alimento fornecido. Após o consumo do café da manhã correspondente às dietas com baixo teor de gordura e de carboidrato, em que estava incluído o café cafeinado sem açúcar, além de outros carboidratos, lipídios e proteínas, a concentração de GIP elevou-se de forma mais pronunciada em ambas as dietas, comparadas à dieta Mediterrânea. No presente estudo, a concentração de GIP não se modificou após a sobrecarga de glicose, quando era administrado previamente o café cafeinado não adoçado. Contudo, a comparação deste aspecto entre os dois estudos fica prejudicada, pois no estudo de Fernemark et al (2013) (201) foi fornecido café da manhã completo (a dieta com baixo teor de gordura forneceu 13,7 gramas de proteínas, 34,5 gramas de carboidratos, 11,95 gramas de gorduras, e a dieta com baixo teor de carboidratos forneceu 26,9 gramas de proteínas, 17,3 gramas de carboidratos, 29,1 gramas de gorduras), enquanto no presente estudo, somente 75 gramas de glicose.

No estudo de Ochiai et al (2014) (202), foi avaliado o efeito de uma bebida teste contendo polifenóis do café (600 mg de ACG, sem cafeína), concomitantemente a uma sobrecarga oral de glicose de 75 gramas, comparado à sobrecarga oral de glicose isoladamente. Dessa forma, não houve diferença significativa entre esses tratamentos sobre a concentração de GLP-1 e GIP, resultados concordantes com o presente estudo.

No estudo de Jokura et al (2015) (203), foi observado aumento da concentração de GLP-1, principalmente nos indivíduos com menor índice insulinogênico, após a ingestão de bebida teste contendo extrato de polifenóis provenientes do café (355 mg de CQA e 54,9 mg de cafeína), associado a refeição teste de 115 gramas (75 gramas de carboidratos; 28,5 gramas de gorduras; 8 gramas de proteínas) em relação ao placebo (bebida teste com 54,9 mg de cafeína, associada à mesma refeição teste com 115 gramas). Este achado foi discordante do observado no presente estudo, em que a concentração de GLP-1 não se modificou após consumo de café não adoçado e posterior administração de 75 gramas de glicose, comparado às outras bebidas teste não adoçadas. Isso pode ser justificado pelo fato de Jokura et al (2015) (203) terem avaliado a concentração de GLP-1 após uma refeição completa, em conjunto com a bebida teste contendo ácidos

clorogênicos e baixa quantidade de cafeína, não sendo analisado, assim, o café propriamente dito. Jokura et al (2015) (203) também não evidenciaram alteração da concentração de GIP em relação ao placebo, concordante o presente estudo.

No estudo de Girolamo et al, 2016 (204), avaliou-se o efeito do café cafeinado sem açúcar com baixa concentração de cafeína (197 mg/dia), variedade Arábica Laurina. Foi comparada a torrefação leve com a torrefação escura e a diferença dos dois tipos de torrefação com seus respectivos *washouts*. O café do tipo expresso era ingerido 4x/dia, durante 1 semana. Neste cenário, houve elevação significativa da concentração de GLP-1 30 min após a sobrecarga de glicose oral de 75 gramas, tanto quando se avaliou o efeito dos dois tipos de café, em relação aos seus respectivos *washouts*, quanto o efeito do café de torrefação escura, comparado ao café de torrefação leve. Diferentemente do presente estudo, em que a concentração sérica de GLP-1 não se modificou após a sobrecarga de glicose. As variáveis que poderiam explicar as diferenças encontradas entre os estudos seriam: (i) tipos de café utilizados, (ii) a comparação de torras de café entre si e com seus respectivos *washout*, (iii) a maior quantidade de cafeína no café do presente estudo, bem como (iv) o delineamento experimental, em que foi avaliada a concentração de GLP-1 após o consumo de 4 xícaras de café por dia durante 1 semana.

Há grande variabilidade nos métodos empregados pelos estudos intervencionistas que exploraram o efeito do café associado ou não a uma sobrecarga de glicose sobre a concentração plasmática de incretínicos, dificultando, assim, a interpretação e comparação de seus dados com os do presente estudo.

Em relação ao café e água adoçados, o estudo de Johnston et al (2003) (198) foi o único que avaliou bebidas teste com açúcar, apresentando resultados semelhantes aos do presente estudo. Entretanto, os seus resultados não foram totalmente concordantes por conta da análise do café descafeinado adoçado e da não realização da sobrecarga oral pelo estudo de Johnston et al (2003) (198).

A maioria dos estudos utilizou as bebidas teste não adoçadas, incluindo o café cafeinado, café descafeinado e água pura. Os estudos de Olthof et al (2011) (199) e Ochiai et al (2014) (202) tiveram resultados semelhantes com o presente estudo. Jokura et al (2015) (203) e Beaudoin et al (2011) (200) apresentaram resultados parcialmente concordantes com o do presente estudo. Jokura et al (2015)

(203) demonstraram que a resposta da concentração de GIP se comportou de forma similar, porém o mesmo não ocorreu o com a resposta da concentração de GLP-1. Este estudo avaliou uma bebida teste com polifenóis do café associado a uma refeição, diferentemente do presente estudo, que analisou o café e a sobrecarga de glicose. Beaudoin et al (2011) (200) observaram que a concentração basal de peptídeo C foi semelhante à encontrada no presente estudo. Entretanto, neste estudo, os autores forneceram aos participantes lipídios previamente à bebida teste e à sobrecarga de glicose, o que certamente levaria a uma maior resposta incretínica. Além disso, a concentração de peptídeo C não se modificou após a sobrecarga de glicose, diferentemente do presente estudo, em que a quantidade de café em gramas, bem como a quantidade de cafeína presente no café cafeinado administrado, foram maiores.

Greenberg et al (2010) (195), Fernemark et al (2013) (201) e Girolamo et al (2016) (204) obtiveram resultados discordantes em comparação ao presente estudo. No primeiro, 57 gramas de café descafeinado foram utilizados, enquanto que no presente estudo, a quantidade foi de apenas 30 gramas. Além disso, o presente estudo não avaliou uma bebida teste contendo somente cafeína. No segundo estudo, os autores forneceram o café cafeinado conjuntamente com uma refeição (café da manhã). E, no último estudo, foi comparado dois tipos de café cafeinados com torrefação diferente entre si, bem como cada torrefação com seu *washout* precedente, dificultando a comparação com o presente estudo.

No presente estudo, a resposta basal da concentração de GLP-1 e de GIP após a ingestão das bebidas adoçadas se comportaram de forma fisiológica, pois houve aumento do GLP-1 após consumo de café cafeinado com açúcar, comparado à água com açúcar e houve diminuição da concentração de GIP nessa mesma situação. Isso ocorre por conta dos ácidos clorogênicos presentes no café, os quais promovem um retardo da absorção de glicose, desviando-a para porções mais distais do intestino, onde há células L produtoras de GLP-1 (198, 205). Além disso, a secreção de GIP é mediada pela absorção de glicose para o interior células K, enquanto que a secreção de GLP-1 pela presença de glicose na proximidade da célula L (198, 206). Desta maneira, como os ACG reduzem a absorção de glicose no

intestino proximal, a concentração sérica de GIP será menor e a de GLP-1 maior após o consumo de café com açúcar, comparado à água com açúcar (198, 205).

Após a sobrecarga de glicose oral, a concentração de GIP foi maior em resposta à ingestão de café cafeinado adoçado, comparado à de água adoçada, enquanto que a concentração de GLP-1 não se alterou nessa mesma condição. Com isso, pode-se inferir que maior sobrecarga de glicose desencadeou maior absorção de glicose e, conseqüentemente, maior secreção de GIP, a resposta esperada (38). Ainda em relação à resposta dos hormônios incretínicos após a sobrecarga de glicose, a concentração de GLP-1 foi maior após ingestão de café cafeinado adoçado, comparado à água adoçada, porém de forma não significativa. Assim, a partir desses dados, observou-se que uma maior carga glicêmica não promoveu um maior estímulo da secreção de GLP-1. Este fato poderia ser explicado pelo fato de que o GIP estimula uma maior resposta incretínica, comparado ao GLP-1 (38).

A concentração de peptídeo C basal foi menor após a ingestão de café cafeinado com açúcar, comparado à água com açúcar. Mas, após a sobrecarga de glicose, o café cafeinado adoçado promoveu elevação significativa da concentração de peptídeo C, em relação à água adoçada. Estes resultados são esperados e foram concordantes tanto com a concentração de insulina do estudo precedente de Reis et al 2018 (39), como com a concentração de GIP do presente estudo. Após este período de sobrecarga oral de glicose, a queda da concentração de peptídeo C ocorreu de forma mais precoce, em relação à observada após a ingestão de água com açúcar.

As bebidas não adoçadas não promoveram mudança significativa da concentração de GLP-1 e GIP basal e após sobrecarga de glicose, quando se compararam o café cafeinado sem açúcar e o café descafeinado sem açúcar com a água pura. Desta forma, é provável que o efeito do café sobre a concentração dos hormônios incretínicos dependa da presença de maior quantidade de glicose, associada ou não de outro nutriente, como gorduras ou proteínas (38, 206). Apesar disso, houve redução da concentração de GLP-1 basal após a ingestão do café descafeinado não adoçado, em relação ao café cafeinado não adoçado, sugerindo que a cafeína seria a responsável por esse fato. A cafeína, isoladamente, não teria



este efeito, já que o café cafeinado sem açúcar não modificou a concentração dos hormônios incretínicos, porém poderia potencializar o efeito do açúcar. Isso foi verificado quando se observou que a concentração basal de GLP-1 foi elevada após a ingestão de café cafeinado adoçado, comparado à água com açúcar. Além disso, pode-se especular que a cafeína inibiria algum outro componente do café que seria responsável pela redução da concentração de GLP-1.

A concentração de peptídeo C basal não se modificou quando foram comparadas as bebidas não adoçadas (café cafeinado e café descafeinado) com o controle água pura. Após sobrecarga de glicose, o café cafeinado sem açúcar promoveu aumento discreto e não significativo da concentração de peptídeo C precocemente, sendo este resultado concordante com a concentração de insulina do estudo precedente de Reis et al (2018) (39), bem como com a concentração dos hormônios incretínicos, que não se modificaram significativamente nesta mesma situação. Contudo, após sobrecarga de glicose, a concentração de peptídeo C foi reduzida quando se administrou o café descafeinado sem açúcar, comparado ao café cafeinado sem açúcar. Este achado sugere que a cafeína contribuiria para maior secreção de insulina em resposta à sobrecarga de glicose.

Esses resultados são esperados e foram concordantes com a concentração de insulina encontrada no estudo precedente de Caio et al, 2018(39). Esses autores observaram aumento mais acentuado da concentração sérica de insulina após a administração de glicose quando os sujeitos receberam o café cafeinado com açúcar. O aumento da concentração de GIP em resposta a esta bebida também pode estar relacionado à maior resposta insulínica, considerando a ação fisiológica deste hormônio.

Vale ressaltar que a análise de dados de medidas repetidas com procedimento misto não mostrou efeito das diferentes preparações de café sobre a concentração sérica de GLP-1, GIP e peptídeo C, diferentemente do que foi observado na análise considerando os períodos de tempo específicos. A observação de efeito em períodos de tempo restritos pode ser relevante do ponto de vista fisiológico em relação ao GLP-1 e GIP, considerando a meia vida curta destes peptídeos.

Esse estudo apresenta algumas limitações. O efeito da ingestão do café foi avaliado no cenário do teste de tolerância a glicose e a administração da sobrecarga oral de glicose ocorreu 60 minutos após a administração da bebida teste. Esse período de tempo corresponde ao da concentração plasmática máxima de cafeína observada após o consumo do café (207). Entretanto, não é possível descartar que, como os compostos fenólicos podem sofrer extensa modificação e metabolização em um curto período de tempo, seu efeito sobre a resposta à sobrecarga oral de glicose não tenha sido observado com o protocolo experimental empregado. Destaca-se ainda que os sujeitos do estudo foram consumidores habituais de café orientados a se abster da bebida nas 24 horas que antecederam cada intervenção, para que consumo recente de café não afetasse os efeitos das bebidas teste nos desfechos do estudo. No entanto, a adesão à abstinência do café foi testada apenas por entrevista e não por instrumentos mais sensíveis. Assim, não é possível excluir que tenha sido homogênea entre os sujeitos do estudo e nos diferentes dias das intervenções. Outro ponto é que, embora o tamanho amostral tenha sido determinado por ferramenta estatística validada o número de sujeitos incluídos foi pequeno em comparação com outros estudos clínicos envolvendo café. Além disso, os resultados do presente estudo dizem respeito a um grupo muito restrito de sujeitos (homens jovens, saudáveis e consumidores habituais de café) e não podem, portanto, ser generalizados para outros grupos populacionais, como diabéticos, mulheres ou consumidores não habituais de café.

## 8 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observado efeito discreto do café sobre a secreção de GLP-1 e GIP, o que sugere que os benefícios do consumo desta bebida sobre a homeostase da glicose não tenham contribuição significativa de modificações da liberação de hormônios incretínicos.

Foi observado, também, efeito discreto do café descafeinado sem açúcar de reduzir a concentração sérica de peptídeo C em resposta a sobrecarga oral de glicose, quando comparado ao café cafeinado sem açúcar, o que sugere que esta preparação de café possa melhorar a sensibilidade à insulina, em consistência com dados de estudos prévios.

## 9 REFERÊNCIAS

1. Lopez-Garcia E, Guallar-Castillon P, Leon-Munoz L, Graciani A, Rodriguez-Artalejo F. Coffee consumption and health-related quality of life. *Clin Nutr.* 2014;33(1):143-9.
2. Ding M, Satija A, Bhupathiraju SN, Hu Y, Sun Q, Han J, et al. Association of Coffee Consumption With Total and Cause-Specific Mortality in 3 Large Prospective Cohorts. *Circulation.* 2015;132(24):2305-15.
3. Cornelis MC. Toward systems epidemiology of coffee and health. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(1):20-9.
4. Zhao Y, Wu K, Zheng J, Zuo R, Li D. Association of coffee drinking with all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr.* 2015;18(7):1282-91.
5. Freedman ND, Park Y, Abnet CC, Hollenbeck AR, Sinha R. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *N Engl J Med.* 2012;366(20):1891-904.
6. Gonzalez de Mejia E R-MM. Impact of caffeine and coffee on our health *Trends Endocrinol Metab* 2014;10:489-92.
7. Kempf K, Herder C, Erlund I, Kolb H, Martin S, Carstensen M, et al. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(4):950-7.
8. Sartorelli DS, Fagherazzi G, Balkau B, Touillaud MS, Boutron-Ruault MC, de Lauzon-Guillain B, et al. Differential effects of coffee on the risk of type 2 diabetes according to meal consumption in a French cohort of women: the E3N/EPIC cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(4):1002-12.
9. Wedick NM, Brennan AM, Sun Q, Hu FB, Mantzoros CS, van Dam RM. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Nutr J.* 2011;10:93.
10. Bakuradze T, Parra GAM, Riedel A, Somoza V, Lang R, Dieminger N, et al. Four-week coffee consumption affects energy intake, satiety regulation, body fat, and protects DNA integrity. *Food Research International.* 2014;63:420-7.
11. Akash MS, Rehman K, Chen S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition.* 2014;30(7-8):755-63.
12. Santos RM, Lima DR. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. *Eur J Nutr.* 2016;55(4):1345-58.
13. Correa TA, Rogero MM, Mito BM, Tarasoutchi D, Tuda VL, Cesar LA, et al. Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: a clinical trial. *Nutrition.* 2013;29(7-8):977-81.
14. Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(4):862-7.
15. Schulze MB, Hoffmann K, Manson JE, Willett WC, Meigs JB, Weikert C, et al. Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(3):675-84; quiz 714-5.
16. Gavrieli A, Yannakoulia M, Fragopoulou E, Margaritopoulos D, Chamberland JP, Kaisari P, et al. Caffeinated coffee does not acutely affect energy intake, appetite, or inflammation but prevents serum cortisol concentrations from falling in healthy men. *J Nutr.* 2011;141(4):703-7.
17. Bryan Bordeaux MRL. Benefits and risks of caffeine and caffeinated beverages. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) [Internet]. 2018 february, 2018.
18. Yu X, Bao Z, Zou J, Dong J. Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer.* 2011;11:96.

19. Wang A, Wang S, Zhu C, Huang H, Wu L, Wan X, et al. Coffee and cancer risk: A meta-analysis of prospective observational studies. *Sci Rep*. 2016;6:33711.
20. Grosso G, Micek A, Godos J, Sciacca S, Pajak A, Martinez-Gonzalez MA, et al. Coffee consumption and risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in smokers and non-smokers: a dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2016;31(12):1191-205.
21. Malerba S, Turati F, Galeone C, Pelucchi C, Verga F, La Vecchia C, et al. A meta-analysis of prospective studies of coffee consumption and mortality for all causes, cancers and cardiovascular diseases. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(7):527-39.
22. Ding M, Bhupathiraju SN, Chen M, van Dam RM, Hu FB. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care*. 2014;37(2):569-86.
23. Riedel A, Dieminger N, Bakuradze T, Lang R, Montoya Parra GA, Hochkogler CM, et al. A 4-week consumption of medium roast and dark roast coffees affects parameters of energy status in healthy subjects. *Food Research International*. 2014;63:409-19.
24. Shang F, Li X, Jiang X. Coffee consumption and risk of the metabolic syndrome: A meta-analysis. *Diabetes Metab*. 2016;42(2):80-7.
25. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285(19):2486-97.
26. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo Ed. Clannad.
27. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama*. 2002;287(3):356-9.
28. Marcondes JAM. Diabete Melito: fisiopatologia e tratamento. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2003; v. 5: p. 18-26.
29. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11(2):191-8.
30. Ruy Lyra ea. Diabetes Melito: Classificação e Diagnóstico. *Endocrinologia clínica 6ª ed*. Rio de Janeiro: Vilar L; 2016. p. 1667.
31. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(3):937-43.
32. Balon TW, Gu JL, Tokuyama Y, Jasman AP, Nadler JL. Magnesium supplementation reduces development of diabetes in a rat model of spontaneous NIDDM. *Am J Physiol*. 1995;269(4 Pt 1):E745-52.
33. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*. 2006;3(3):153-65.
34. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.
35. Meier JJ, Nauck MA. Incretins and the development of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2006;6(3):194-201.
36. Lee YS, Jun HS. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism*. 2014;63(1):9-19.
37. Koliaki C, Doupis J. Incretin-based therapy: a powerful and promising weapon in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Ther*. 2011;2(2):101-21.
38. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20 Suppl 1:5-21.
39. Reis CEG, Paiva C, Amato AA, Lofrano-Porto A, Wassell S, Bluck LJC, et al. Decaffeinated coffee improves insulin sensitivity in healthy men. *Br J Nutr*. 2018;119(9):1029-38.
40. Paiva C, Beserra B, Reis C, Dorea JG, Da Costa T, Amato AA. Consumption of coffee or caffeine and serum concentration of inflammatory markers: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017:1-12.

41. Cano-Marquina A, Tarin JJ, Cano A. The impact of coffee on health. *Maturitas*. 2013;75(1):7-21.
42. Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *Bmj*. 2017;359:j5024.
43. Ludwig IA, Clifford MN, Lean ME, Ashihara H, Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct*. 2014;5(8):1695-717.
44. Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*. 2006;27(2):269-77.
45. Cavin C, Marin-Kuan M, Langouet S, Bezencon C, Guignard G, Verguet C, et al. Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(4):1239-48.
46. Olthof MR, Hollman PC, Zock PL, Katan MB. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(3):532-8.
47. Cornelis MC, El-Sohemy A, Kabagambe EK, Campos H. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *Jama*. 2006;295(10):1135-41.
48. Giardina E-G. Cardiovascular effects of caffeine and caffeinated beverages. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) [Internet]. 2018 february, 2018. .
49. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*. 1999;51(1):83-133.
50. Childs E, de Wit H. Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;185(4):514-23.
51. Andrew S, Wendy S, John G. Effects of a low dose of caffeine given in different drinks on mood and performance. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 1999;14(7):473-82.
52. Hwang YP, Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett*. 2008;582(17):2655-62.
53. Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2012;72(6):893-901.
54. Qi H, Li S. Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease. *Geriatr Gerontol Int*. 2014;14(2):430-9.
55. Abbott RD, Ross GW, White LR, Sanderson WT, Burchfiel CM, Kashon M, et al. Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurol*. 2003;250 Suppl 3:l1130-9.
56. Ragonese P, Salemi G, Morgante L, Aridon P, Epifanio A, Buffa D, et al. A case-control study on cigarette, alcohol, and coffee consumption preceding Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*. 2003;22(5):297-304.
57. Hernan MA, Takkouche B, Caamano-Isorna F, Gestal-Otero JJ. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2002;52(3):276-84.
58. Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Rodriguez C, et al. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *Am J Epidemiol*. 2004;160(10):977-84.
59. Ascherio A, Chen H, Schwarzschild MA, Zhang SM, Colditz GA, Speizer FE. Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 2003;60(5):790-5.
60. Barranco Quintana JL, Allam MF, Serrano Del Castillo A, Fernandez-Crehuet Navajas R. Alzheimer's disease and coffee: a quantitative review. *Neurol Res*. 2007;29(1):91-5.

61. Liu QP, Wu YF, Cheng HY, Xia T, Ding H, Wang H, et al. Habitual coffee consumption and risk of cognitive decline/dementia: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutrition*. 2016;32(6):628-36.
62. Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*. 2006;142(4):941-52.
63. Bruce M, Scott N, Shine P, Lader M. Anxiogenic effects of caffeine in patients with anxiety disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49(11):867-9.
64. Kendler KS, Myers J, C OG. Caffeine intake, toxicity and dependence and lifetime risk for psychiatric and substance use disorders: an epidemiologic and co-twin control analysis. *Psychol Med*. 2006;36(12):1717-25.
65. Lucas M, Mirzaei F, Pan A, Okereke OI, Willett WC, O'Reilly EJ, et al. Coffee, caffeine, and risk of depression among women. *Arch Intern Med*. 2011;171(17):1571-8.
66. Grosso G, Micek A, Castellano S, Pajak A, Galvano F. Coffee, tea, caffeine and risk of depression: A systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(1):223-34.
67. Lucas M, O'Reilly EJ, Pan A, Mirzaei F, Willett WC, Okereke OI, et al. Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: results from three prospective cohorts of American adults. *World J Biol Psychiatry*. 2014;15(5):377-86.
68. Cheng M, Hu Z, Lu X, Huang J, Gu D. Caffeine intake and atrial fibrillation incidence: dose response meta-analysis of prospective cohort studies. *Can J Cardiol*. 2014;30(4):448-54.
69. Chelsky LB, Cutler JE, Griffith K, Kron J, McClelland JH, McAnulty JH. Caffeine and ventricular arrhythmias. An electrophysiological approach. *Jama*. 1990;264(17):2236-40.
70. Newcombe PF, Renton KW, Rautaharju PM, Spencer CA, Montague TJ. High-dose caffeine and cardiac rate and rhythm in normal subjects. *Chest*. 1988;94(1):90-4.
71. Graboys TB, Blatt CM, Lown B. The effect of caffeine on ventricular ectopic activity in patients with malignant ventricular arrhythmia. *Arch Intern Med*. 1989;149(3):637-9.
72. Caldeira D, Martins C, Alves LB, Pereira H, Ferreira JJ, Costa J. Caffeine does not increase the risk of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Heart*. 2013;99(19):1383-9.
73. Klatsky AL, Hasan AS, Armstrong MA, Udaltsova N, Morton C. Coffee, caffeine, and risk of hospitalization for arrhythmias. *Perm J*. 2011;15(3):19-25.
74. Dixit S, Stein PK, Dewland TA, Dukes JW, Vittinghoff E, Heckbert SR, et al. Consumption of Caffeinated Products and Cardiac Ectopy. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(1).
75. Newby DE, Neilson JM, Jarvie DR, Boon NA. Caffeine restriction has no role in the management of patients with symptomatic idiopathic ventricular premature beats. *Heart*. 1996;76(4):355-7.
76. Zuchinali P, Souza GC, Pimentel M, Chemello D, Zimmerman A, Giarretta V, et al. Short-term Effects of High-Dose Caffeine on Cardiac Arrhythmias in Patients With Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2016;176(12):1752-9.
77. Corti R, Binggeli C, Sudano I, Spieker L, Hanseler E, Ruschitzka F, et al. Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content: role of habitual versus nonhabitual drinking. *Circulation*. 2002;106(23):2935-40.
78. Freestone S, Ramsay LE. Effect of coffee and cigarette smoking on the blood pressure of untreated and diuretic-treated hypertensive patients. *Am J Med*. 1982;73(3):348-53.
79. Sharp DS, Benowitz NL. Pharmacoevidence of the effect of caffeine on blood pressure. *Clin Pharmacol Ther*. 1990;47(1):57-60.
80. Hartley TR, Sung BH, Pincomb GA, Whitsett TL, Wilson MF, Lavallo WR. Hypertension risk status and effect of caffeine on blood pressure. *Hypertension*. 2000;36(1):137-41.
81. Rakic V, Burke V, Beilin LJ. Effects of coffee on ambulatory blood pressure in older men and women: A randomized controlled trial. *Hypertension*. 1999;33(3):869-73.

82. Steffen M, Kuhle C, Hensrud D, Erwin PJ, Murad MH. The effect of coffee consumption on blood pressure and the development of hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens.* 2012;30(12):2245-54.
83. Noordzij M, Uiterwaal CS, Arends LR, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens.* 2005;23(5):921-8.
84. James JE. Chronic effects of habitual caffeine consumption on laboratory and ambulatory blood pressure levels. *J Cardiovasc Risk.* 1994;1(2):159-64.
85. Maughan RJ, Griffin J. Caffeine ingestion and fluid balance: a review. *J Hum Nutr Diet.* 2003;16(6):411-20.
86. Vlachopoulos C, Kosmopoulou F, Panagiotakos D, Ioakeimidis N, Alexopoulos N, Pitsavos C, et al. Smoking and caffeine have a synergistic detrimental effect on aortic stiffness and wave reflections. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(9):1911-7.
87. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and coronary heart disease in men and women: a prospective cohort study. *Circulation.* 2006;113(17):2045-53.
88. Bak AA, Grobbee DE. The effect on serum cholesterol levels of coffee brewed by filtering or boiling. *N Engl J Med.* 1989;321(21):1432-7.
89. Wei M, Macera CA, Hornung CA, Blair SN. The impact of changes in coffee consumption on serum cholesterol. *J Clin Epidemiol.* 1995;48(10):1189-96.
90. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Mosc).* 2004;69(1):70-4.
91. Jee SH, He J, Appel LJ, Whelton PK, Suh I, Klag MJ. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Am J Epidemiol.* 2001;153(4):353-62.
92. de Roos B, Katan MB. Possible mechanisms underlying the cholesterol-raising effect of the coffee diterpene cafestol. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10(1):41-5.
93. Murakami K, Okubo H, Sasaki S. Dietary intake in relation to self-reported constipation among Japanese women aged 18-20 years. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60(5):650-7.
94. Zhang YP, Li WQ, Sun YL, Zhu RT, Wang WJ. Systematic review with meta-analysis: coffee consumption and the risk of gallstone disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;42(6):637-48.
95. Wijarnpreecha K, Thongprayoon C, Ungprasert P. Coffee consumption and risk of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017;29(2):e8-e12.
96. Liu F, Wang X, Wu G, Chen L, Hu P, Ren H, et al. Coffee Consumption Decreases Risks for Hepatic Fibrosis and Cirrhosis: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142457.
97. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2010;51(1):201-9.
98. Freedman ND, Everhart JE, Lindsay KL, Ghany MG, Curto TM, Shiffman ML, et al. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009;50(5):1360-9.
99. Kim J, Oh SW, Myung SK, Kwon H, Lee C, Yun JM, et al. Association between coffee intake and gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis. *Dis Esophagus.* 2014;27(4):311-7.
100. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 1995;332(12):767-73.
101. Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(5):694-700.



102. Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;60(4):573-8.
103. Korpelainen R, Korpelainen J, Heikkinen J, Vaananen K, Keinanen-Kiukaanniemi S. Lifestyle factors are associated with osteoporosis in lean women but not in normal and overweight women: a population-based cohort study of 1222 women. *Osteoporos Int.* 2003;14(1):34-43.
104. Barrett-Connor E, Chang JC, Edelstein SL. Coffee-associated osteoporosis offset by daily milk consumption. The Rancho Bernardo Study. *Jama.* 1994;271(4):280-3.
105. Hallstrom H, Wolk A, Glynn A, Michaelsson K. Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women. *Osteoporos Int.* 2006;17(7):1055-64.
106. Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Merlino L, Mudano AS, Burma M, et al. Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 2002;46(1):83-91.
107. Pedersen M, Stripp C, Klarlund M, Olsen SF, Tjonneland AM, Frisch M. Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort. *J Rheumatol.* 2005;32(7):1249-52.
108. Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Grodstein F. Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(11):3055-60.
109. Choi HK, Curhan G. Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum.* 2007;57(5):816-21.
110. Choi HK, Willett W, Curhan G. Coffee consumption and risk of incident gout in men: a prospective study. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):2049-55.
111. Bird ET, Parker BD, Kim HS, Coffield KS. Caffeine ingestion and lower urinary tract symptoms in healthy volunteers. *Neurourol Urodyn.* 2005;24(7):611-5.
112. Armstrong LE, Pumerantz AC, Roti MW, Judelson DA, Watson G, Dias JC, et al. Fluid, electrolyte, and renal indices of hydration during 11 days of controlled caffeine consumption. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2005;15(3):252-65.
113. Jura YH, Townsend MK, Curhan GC, Resnick NM, Grodstein F. Caffeine intake, and the risk of stress, urgency and mixed urinary incontinence. *J Urol.* 2011;185(5):1775-80.
114. Bryant CM, Dowell CJ, Fairbrother G. Caffeine reduction education to improve urinary symptoms. *Br J Nurs.* 2002;11(8):560-5.
115. Rhee J, Kim R, Kim Y, Tam M, Lai Y, Keum N, et al. Maternal Caffeine Consumption during Pregnancy and Risk of Low Birth Weight: A Dose-Response Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132334.
116. Jahanfar S, Jaafar SH. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcomes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(6):Cd006965.
117. Maslova E, Bhattacharya S, Lin SW, Michels KB. Caffeine consumption during pregnancy and risk of preterm birth: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1120-32.
118. Li J, Zhao H, Song JM, Zhang J, Tang YL, Xin CM. A meta-analysis of risk of pregnancy loss and caffeine and coffee consumption during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015;130(2):116-22.
119. Li ZX, Gao ZL, Wang JN, Guo QH. Maternal Coffee Consumption During Pregnancy and Neural Tube Defects in Offspring: A Meta-Analysis. *Fetal Pediatr Pathol.* 2016;35(1):1-9.
120. Browne ML. Maternal exposure to caffeine and risk of congenital anomalies: a systematic review. *Epidemiology.* 2006;17(3):324-31.
121. Thomopoulos TP, Ntouvelis E, Diamantaras AA, Tzanoudaki M, Baka M, Hatzipantelis E, et al. Maternal and childhood consumption of coffee, tea and cola beverages in association with childhood leukemia: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(6):1047-59.

122. Nkondjock A, Ghadirian P, Kotsopoulos J, Lubinski J, Lynch H, Kim-Sing C, et al. Coffee consumption and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Cancer*. 2006;118(1):103-7.
123. Baker JA, Beehler GP, Sawant AC, Jayaprakash V, McCann SE, Moysich KB. Consumption of coffee, but not black tea, is associated with decreased risk of premenopausal breast cancer. *J Nutr*. 2006;136(1):166-71.
124. Hirvonen T, Mennen LI, de Bree A, Castetbon K, Galan P, Bertrais S, et al. Consumption of antioxidant-rich beverages and risk for breast cancer in French women. *Ann Epidemiol*. 2006;16(7):503-8.
125. Ishitani K, Lin J, Manson JE, Buring JE, Zhang SM. Caffeine consumption and the risk of breast cancer in a large prospective cohort of women. *Arch Intern Med*. 2008;168(18):2022-31.
126. Yang TO, Crowe F, Cairns BJ, Reeves GK, Beral V. Tea and coffee and risk of endometrial cancer: cohort study and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(3):570-8.
127. Bravi F, Scotti L, Bosetti C, Gallus S, Negri E, La Vecchia C, et al. Coffee drinking and endometrial cancer risk: a metaanalysis of observational studies. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(2):130-5.
128. Braem MG, Onland-Moret NC, Schouten LJ, Tjonneland A, Hansen L, Dahm CC, et al. Coffee and tea consumption and the risk of ovarian cancer: a prospective cohort study and updated meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(5):1172-81.
129. Tang N, Wu Y, Ma J, Wang B, Yu R. Coffee consumption and risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2010;67(1):17-22.
130. Turati F, Galeone C, La Vecchia C, Garavello W, Tavani A. Coffee and cancers of the upper digestive and respiratory tracts: meta-analyses of observational studies. *Ann Oncol*. 2011;22(3):536-44.
131. Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Gallus S, La Vecchia C. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(11):1413-21.e1.
132. Setiawan VW, Wilkens LR, Lu SC, Hernandez BY, Le Marchand L, Henderson BE. Association of coffee intake with reduced incidence of liver cancer and death from chronic liver disease in the US multiethnic cohort. *Gastroenterology*. 2015;148(1):118-25; quiz e15.
133. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) [Internet]. 2018 february, 2018].
134. Zeegers MP, Tan FE, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Are coffee and tea consumption associated with urinary tract cancer risk? A systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2001;30(2):353-62.
135. Pelucchi C, La Vecchia C. Alcohol, coffee, and bladder cancer risk: a review of epidemiological studies. *Eur J Cancer Prev*. 2009;18(1):62-8.
136. Severson RK, Nomura AM, Grove JS, Stemmermann GN. A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res*. 1989;49(7):1857-60.
137. Wilson KM, Kasperzyk JL, Rider JR, Kenfield S, van Dam RM, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):876-84.
138. Arnlov J, Vessby B, Riserus U. Coffee consumption and insulin sensitivity. *Jama*. 2004;291(10):1199-201.
139. van Dam RM, Feskens EJ. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2002;360(9344):1477-8.
140. Rosengren A, Dotevall A, Wilhelmsen L, Thelle D, Johansson S. Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. *J Intern Med*. 2004;255(1):89-95.

141. van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Coffee, caffeine, and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study in younger and middle-aged U.S. women. *Diabetes Care*. 2006;29(2):398-403.
142. Pereira MA, Parker ED, Folsom AR. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: an 11-year prospective study of 28 812 postmenopausal women. *Arch Intern Med*. 2006;166(12):1311-6.
143. Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med*. 2006;144(8):554-62.
144. Salazar-Martinez E, Willett WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann MF, Stampfer MJ, et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 2004;140(1):1-8.
145. van Dam RM, Pasman WJ, Verhoef P. Effects of coffee consumption on fasting blood glucose and insulin concentrations: randomized controlled trials in healthy volunteers. *Diabetes Care*. 2004;27(12):2990-2.
146. Keijzers GB, De Galan BE, Tack CJ, Smits P. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*. 2002;25(2):364-9.
147. Lane JD, Feinglos MN, Surwit RS. Caffeine increases ambulatory glucose and postprandial responses in coffee drinkers with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31(2):221-2.
148. MacKenzie T, Comi R, Sluss P, Keisari R, Manwar S, Kim J, et al. Metabolic and hormonal effects of caffeine: randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Metabolism*. 2007;56(12):1694-8.
149. Williams CJ, Fargnoli JL, Hwang JJ, van Dam RM, Blackburn GL, Hu FB, et al. Coffee consumption is associated with higher plasma adiponectin concentrations in women with or without type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Diabetes Care*. 2008;31(3):504-7.
150. Zhang WL, Lopez-Garcia E, Li TY, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and risk of cardiovascular events and all-cause mortality among women with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(5):810-7.
151. Huxley R, Lee CM, Barzi F, Timmermeister L, Czernichow S, Perkovic V, et al. Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2009;169(22):2053-63.
152. Balon TW, Jasman A, Scott S, Meehan WP, Rude RK, Nadler JL. Dietary magnesium prevents fructose-induced insulin insensitivity in rats. *Hypertension*. 1994;23(6 Pt 2):1036-9.
153. Da Costa THM ea. Coffee intake and diabetes. In: Preedy VR, editor. *Coffee in health and disease prevention*. London: Elsevier 2015. p. 1080.
154. Egawa T, Hamada T, Kameda N, Karaike K, Ma X, Masuda S, et al. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism*. 2009;58(11):1609-17.
155. Park S, Jang JS, Hong SM. Long-term consumption of caffeine improves glucose homeostasis by enhancing insulinotropic action through islet insulin/insulin-like growth factor 1 signaling in diabetic rats. *Metabolism*. 2007;56(5):599-607.
156. Cardenas C, Quesada AR, Medina MA. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PLoS One*. 2011;6(8):e23407.
157. Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoroso DC, Ribocco MT, Romano A, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology*. 2010;52(5):1652-61.
158. Lee KW, Im JY, Woo JM, Grosso H, Kim YS, Cristovao AC, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a coffee component in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2013;10(1):143-53.

159. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Qi L, Hu FB. Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(4):888-93.
160. Ohnaka K, Ikeda M, Maki T, Okada T, Shimazoe T, Adachi M, et al. Effects of 16-week consumption of caffeinated and decaffeinated instant coffee on glucose metabolism in a randomized controlled trial. *J Nutr Metab.* 2012;2012:207426.
161. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8(11):1288-95.
162. Goto A, Song Y, Chen BH, Manson JE, Buring JE, Liu S. Coffee and caffeine consumption in relation to sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *Diabetes.* 2011;60(1):269-75.
163. Ding EL, Song Y, Manson JE, Hunter DJ, Lee CC, Rifai N, et al. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. *N Engl J Med.* 2009;361(12):1152-63.
164. Jiang X, Zhang D, Jiang W. Coffee and caffeine intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Nutr.* 2014;53(1):25-38.
165. Lopez-Garcia E, van Dam RM, Li TY, Rodriguez-Artalejo F, Hu FB. The relationship of coffee consumption with mortality. *Ann Intern Med.* 2008;148(12):904-14.
166. Saito E, Inoue M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, et al. Association of coffee intake with total and cause-specific mortality in a Japanese population: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(5):1029-37.
167. Loftfield E, Freedman ND, Graubard BI, Guertin KA, Black A, Huang WY, et al. Association of Coffee Consumption With Overall and Cause-Specific Mortality in a Large US Prospective Cohort Study. *Am J Epidemiol.* 2015;182(12):1010-22.
168. Park SY, Freedman ND, Haiman CA, Le Marchand L, Wilkens LR, Setiawan VW. Association of Coffee Consumption With Total and Cause-Specific Mortality Among Nonwhite Populations. *Ann Intern Med.* 2017;167(4):228-35.
169. Gunter MJ, Murphy N, Cross AJ, Dossus L, Dartois L, Fagherazzi G, et al. Coffee Drinking and Mortality in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2017;167(4):236-47.
170. Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Li TY, Mukamal KJ, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and mortality in women with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(1):218-24.
171. Liu J, Sui X, Lavie CJ, Hebert JR, Earnest CP, Zhang J, et al. Association of coffee consumption with all-cause and cardiovascular disease mortality. *Mayo Clin Proc.* 2013;88(10):1066-74.
172. IDF Diabetes Atlas <http://www.diabetesatlas.org/> 2018.
173. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2018;41(Suppl. 1):S13–S27: *Diabetes Care* 2018. p. (Suppl. 1):S13–S27.
174. McCulloch DK. Classification of diabetes mellitus and genetic diabetic syndromes. <https://www.uptodate.com/> [Internet]. 2018 february, 2018.
175. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009;58(4):773-95.
176. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365(9467):1333-46.
177. David K McCulloch RPR. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com/) [Internet]. 2018 february, 2018.
178. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2005;36(3):197-209.
179. Dodds S. The How-To for Type 2: An Overview of Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Nurs Clin North Am.* 2017;52(4):513-22.

180. Lifestyle management: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2018; 41:[(Suppl. 1):S38–S50 pp.].
181. McCulloch. DK. Initial management of blood glucose in adults with type 2 diabetes mellitus <https://www.uptodate.com/> [Internet]. 2018 june, 2018.
182. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2018;41:(Suppl. 1):S73–S85.
183. Ruy Lyra ea. Tratamento Farmacológico do Diabetes Mellito Tipo 2. *Endocrinologia Clínica*. 6º ed. Rio de Janeiro: Vilar L.; 2016. p. 1667.
184. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2):E199-206.
185. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Sanlioglu S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30(5):354-71.
186. CEG. R. Café e metabolismo da glicose: Ensaio Clínico Cruzado Randomizado com isótopos estáveis. Brasília: Universidade de Brasília; 2015.
187. Bluck L, Williams R, Jackson S, Salgin B, Acerini C, Dunger D. Insulin sensitivity assessed by stable isotopes with oral glucose administration: validation with euglycaemic clamp. *ISRN Endocrinol*. 2013;2013:189412.
188. Sousa AG, da Costa TH. Usual coffee intake in Brazil: results from the National Dietary Survey 2008-9. *Br J Nutr*. 2015;113(10):1615-20.
189. Aston L BL, Stokes C et al Effect of a low glycemic index diet on insulin sensitivity in overweight women. 15th ECO conference 2007.
190. Wang B-S, Wang X-J, Gong L-K. The Construction of a Williams Design and Randomization in Cross-Over Clinical Trials Using SAS. 2009. 2009;29(Code Snippet 1):10.
191. Bluck LJ, Clapperton AT, Coward WA. A stable isotope minimal model protocol with oral glucose administration. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(3):493-8.
192. F. B. Caffeine in coffee. In: Preedy VR, editor. *Coffee in health and disease prevention*. London: Elsevier; 2015. p. 201–7.
193. A. F. Coffee constituents. In: Chu Y-F, editor. *Coffee: emerging health effects and disease prevention*. New York: John Wiley & Sons 2012. p. 21–58.
194. Moisey LL, Robinson LE, Graham TE. Consumption of caffeinated coffee and a high carbohydrate meal affects postprandial metabolism of a subsequent oral glucose tolerance test in young, healthy males. *Br J Nutr*. 2010;103(6):833-41.
195. Greenberg JA, Owen DR, Geliebter A. Decaffeinated coffee and glucose metabolism in young men. *Diabetes Care*. 2010;33(2):278-80.
196. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci*. 1998;76(4):1216-31.
197. Narum S. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics 2006. 783-7 p.
198. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(4):728-33.
199. Olthof MR, van Dijk AE, Deacon CF, Heine RJ, van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on incretin hormones. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8:10.
200. Beaudoin MS, Robinson LE, Graham TE. An oral lipid challenge and acute intake of caffeinated coffee additively decrease glucose tolerance in healthy men. *J Nutr*. 2011;141(4):574-81.
201. Fernemark H, Jaredsson C, Bunjaku B, Rosenqvist U, Nystrom FH, Guldbbrand H. A randomized cross-over trial of the postprandial effects of three different diets in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(11):e79324.

202. Ochiai R, Sugiura Y, Shioya Y, Otsuka K, Katsuragi Y, Hashiguchi T. Coffee polyphenols improve peripheral endothelial function after glucose loading in healthy male adults. *Nutr Res.* 2014;34(2):155-9.
203. Jokura H, Watanabe I, Umeda M, Hase T, Shimotoyodome A. Coffee polyphenol consumption improves postprandial hyperglycemia associated with impaired vascular endothelial function in healthy male adults. *Nutr Res.* 2015;35(10):873-81.
204. Di Girolamo FG, Mazzucco S, Situlin R, Mohorko N, Jenko-Praznikar Z, Petelin A, et al. Roasting intensity of naturally low-caffeine Laurina coffee modulates glucose metabolism and redox balance in humans. *Nutrition.* 2016;32(9):928-36.
205. McCarty MF. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med Hypotheses.* 2005;64(4):848-53.
206. Tunnicliffe JM, Shearer J. Coffee, glucose homeostasis, and insulin resistance: physiological mechanisms and mediators. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008;33(6):1290-300.
207. Teekachunhatean S, Tosri N, Rojanasthien N, Srichairatanakool S, Sangdee C. Pharmacokinetics of Caffeine following a Single Administration of Coffee Enema versus Oral Coffee Consumption in Healthy Male Subjects. *ISRN Pharmacol.* 2013;2013:147238.

## 10. Apêndice

### 10.1 Apêndice 1



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Núcleo de Nutrição  
Laboratório de Bioquímica da Nutrição

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_, estou sendo convidado a participar de uma pesquisa do Núcleo de Nutrição da Universidade de Brasília que visa estudar os efeitos do café no risco de desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2. Serão realizados cinco testes no Laboratório de Bioquímica da Nutrição no tal você deverá comparecer pela manhã em jejum de 12 horas em cada dia de teste. Os testes ocorrerão em dias previamente agendados, com intervalo de quatro a seis semanas entre eles.

Em cada dia teste você deverá consumir 300 mL de uma das seguintes bebidas: Café cafeinado com açúcar, Café cafeinado sem açúcar, Café descafeinado sem açúcar e água com e sem açúcar. Uma hora após o consumo da bebida teste você deverá consumir 300 mL de água potável contendo 75g de glicose dissolvidos. Uma hora e 45 minutos após isso, será aplicada na veia do seu antebraço 250mg glicose dissolvida em soro. Uma agulha será inserida na veia do seu outro braço para que 20 amostras de 5 mL e 7 amostras de 4 mL de sangue sejam coletadas durante 6 horas de avaliação, totalizando 128 mL de sangue por dia de visita. Desta forma serão coletados no total 640 mL de sangue ao longo de 5 meses de duração do experimento. Nessas amostras serão medidas as quantidades de glicose e insulina a fim de determinar os efeitos do café nos níveis de glicose no seu sangue.

Todos os procedimentos serão realizados minimizando os riscos a sua saúde, entretanto tonturas, vertigens e queda da pressão arterial podem ocorrer. Para se evitar esses riscos, o procedimento será realizado pela Médica Dra. Adriana Lofrano (CRM/DF: 8.093) que assegurará todos os cuidados necessários a sua saúde. Em caso de necessidades você terá assistência médica no Hospital Universitário de Brasília para situações relacionadas aos procedimentos realizados na pesquisa.

Você receberá todos os seus resultados impressos e por meio eletrônico ou correio, sendo explicados os seus significados e dados os aconselhamentos necessários. Seus dados têm caráter confidencial e serão posteriormente apresentados no meio científico da área de saúde, mantendo em sigilo sua identificação. Você receberá uma ajuda de custo (transporte) no valor de 6,00 (seis) reais e um almoço no Restaurante Universitário da Universidade de Brasília após a participação em cada dia de teste. Além disso, você não terá nenhum tipo de vantagem econômica ou material por participar da pesquisa, além de poder abandonar a pesquisa em qualquer etapa de seu desenvolvimento.

Em caso de dúvida, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília pelo telefone 3107-1947, pelo e-mail: cepfs@unb.br ou pessoalmente na sala AT 145/34 da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. O Comitê de ética é um órgão da Universidade de Brasília que tem a finalidade de defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade, contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos vigentes.

Esse termo foi elaborado em duas vias e deverá ser assinado por você (Sujeito de pesquisa) e o Pesquisador Principal, sendo uma cópia retida com o pesquisador e a outra imediatamente entregue ao sujeito de pesquisa.

A pesquisa é coordenada pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Teresa Helena Macedo da Costa, com a colaboração dos pesquisadores: Doutorando Caio Eduardo Gonçalves Reis, Prof<sup>o</sup>. Dr. José Garrofe Dórea, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto, Dr. Leslie John Charles Bluck e o Técnico de Laboratório Werte de Souza Chaves.

Tendo qualquer dúvida sobre o estudo, em qualquer momento, entre em contato pelos seguintes telefones e e-mail:

- Prof<sup>a</sup>. Dra. Teresa Helena Macedo da Costa: 3307-2193

- Caio Eduardo Gonçalves Reis: 8184-6185 / 3307-2193

E-mail: pesquisacafeunb@gmail.com ; caioedureis@gmail.com

Portanto, eu \_\_\_\_\_, estando totalmente ciente sobre a Pesquisa “Café e metabolismo da glicose: ensaio clínico cruzado randomizado com isótopos estáveis” autorizo minha inclusão.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

\_\_\_\_\_  
Sujeito de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Principal



## 10.2 Apêndice 2



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**  
**Laboratório de Bioquímica da Nutrição**

### **Café e Metabolismo da Glicose: ensaio clínico cruzado randomizado com isótopos estáveis**

Coordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Teresa Helena M. da Costa

Pesquisadores: Prof. Dr. José G. Dórea, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana L. A. Porto, Prof<sup>a</sup>. Dra. Angélica A. Amato e Dr. Leslie Bluck

Pós-graduandos: Caio Eduardo Gonçalves Reis (Doutorado) e Círcia Luíza Rocha dos Santos (Mestrado)

Colaborador: Werte de Sousa Chaves e Leandro Faleiros Garcia

#### **QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM**

**I) Dados pessoais:**

Data:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Código:** \_\_\_\_\_

Endereço:

\_\_\_\_\_

Tel. Residencial: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Trabalho: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Celular:  
 (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Estado Civil:

\_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_ Ocupação:

\_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

**II) História médica**

História patológica

pregressa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Problema Gastrointestinais: Sim ( ) Não ( ) Qual(s)?

\_\_\_\_\_

História Familiar de doença metabólica:

Pai: ( ) Obesidade ( ) Diabetes Mellitus ( ) Hipertensão ( )  
Dislipidemia

Mãe: ( ) Obesidade ( ) Diabetes Mellitus ( ) Hipertensão ( )  
Dislipidemia

Irmãos: ( ) Obesidade ( ) Diabetes Mellitus ( ) Hipertensão ( ) Dislipidemia

Avós: ( ) Obesidade ( ) Diabetes Mellitus ( ) Hipertensão ( )  
Dislipidemia

### III) Outras informações

Você tem hábito de tomar café? Sim ( ) Não ( ) Solúvel ( ) Infusão ( )

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Açúcar? Sim ( ) Não ( ) Quanto? \_\_\_\_\_ Adoçante? Sim ( ) Não ( ) Quanto?

\_\_\_\_\_

Qual quantidade por dia?

\_\_\_\_\_

Como é o preparo?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Consome outras bebidas cafeinadas, como coca-cola ou similares, guaraná em pó, bebidas energéticas, medicamentos com cafeína? Sim ( ) Não ( ) Qual(s)?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Você faz uso de algum remédio ou suplemento alimentar (vitaminas, minerais, proteínas...)?

Sim ( ) Não ( ) Qual(s)?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Você tem alguma alergia a remédios, alimentos ou outras substâncias?

Sim ( ) Não ( ) Qual(s)?

\_\_\_\_\_

Sintomas:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Você fuma ou usa outro tipo de fumo?

Sim ( ) Não ( ) Qual(s)? \_\_\_\_\_

Quantos cigarros (ou outro tipo de fumo) por dia? \_\_\_\_\_

Você consome bebida alcoólica?

Sim ( ) Não ( ) Qual(s)? \_\_\_\_\_

Quantidade por semana: \_\_\_\_\_

Você pratica exercícios físicos regulares?

Sim ( ) Não ( ) Qual(s)? \_\_\_\_\_

Tempo por dia: \_\_\_\_\_

Dias por semana: \_\_\_\_\_

Você tem distúrbio do sono ou faz uso de medicação para dormir?

Sim ( ) Não ( ) Qual (s)? \_\_\_\_\_

Você doou sangue nos últimos nos últimos três meses ou planeja doar nos próximos três meses?

Sim ( ) Não ( ) Planeja Doar ( )

Seu peso variou em mais de 5 kg nos últimos 3 meses?

Sim ( ) Não ( )

Faz dieta ou participa de algum programa de controle de peso?

Sim ( ) Não ( )

**IV) Avaliação antropométrica, de composição corporal, de pressão arterial e glicemia capilar.**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Média</b>
Peso (kg)				
Estatura (m)			---	
IMC				
Perímetro da Cintura				
Resistência / Reactância	/		/	
Gordura Corporal (%)				
Pressão Sistólica				
Pressão Diastólica				
Glicemia de jejum				



Coordenadora: Profª. Dra. Teresa Helena Macedo da Costa  
 Pesquisador Responsável: Caio Eduardo Gonçalves Reis (Doutorando)

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Código:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **Dia da semana:** \_\_\_\_\_

**Recordatório 24h**

	<b>ALIMENTOS</b>	<b>QUANTIDADE</b>
<b>Refeição:</b>		
<b>Hora:</b>		
<b>Local:</b>		
<b>Refeição:</b>		
<b>Hora:</b>		
<b>Local:</b>		
<b>Refeição:</b>		
<b>Hora:</b>		
<b>Local:</b>		
<b>Refeição:</b>		
<b>Hora:</b>		
<b>Local:</b>		
<b>Refeição:</b>		
<b>Hora:</b>		

<b>Local:</b>		
---------------	--	--

Dia fora do padrão alimentar: Não ( ) Sim ( ). Se sim como?

\_\_\_\_\_

## 10.3 Apêndice 3

**TESTE INTRAVENOSO DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (IVGTT)**  
**PROCEDIMENTOS PADRONIZADOS EM CASOS DE EMERGÊNCIA**

**- Procedimentos em Situações de Hipoglicemia**

<b>Glicose (mg/dL)</b>	<b>Procedimento</b>
70 – 55	Medir novamente em 5 minutos
54 – 45	Medir novamente em 5 minutos e Comunicar Assistência Médica
44 – 35	Assistência Médica  Assintomático: Observar e Medir novamente em 3 minutos Sintomático: Infundir 20 mL de Glicose (50%) e Medir em 3 minutos Repetir a dose de Glicose se os sintomas continuarem ou a glicemia se manter < 45 mg/dL até a recuperação do paciente
Sintomas de Hipoglicemia	Medir novamente a glicemia e Comunicar Assistência Médica

**- Desobstrução da cânula de acesso venoso**

Havendo dificuldade para coleta de sangue durante o IVGTT, o pesquisador deverá:

- Infundir generosamente solução salina;
- Infundir 0,5 mL de Solução Heparinizada;
- Retirar a Solução Heparinizada antes da próxima coleta.

**- Perda da Consciência**

- A perda de consciência pode ocorrer durante o Teste Intravenoso De Tolerância à Glicose. Os primeiros socorros devem ser imediato, com o contato de uma ambulância se necessário.

- A causa mais comum de perda de consciência é o desmaio simples (episódio vasovagal) e a hipoglicemia. O desmaio é mais comum no momento da realização do acesso venoso, mas deve ser considerado durante todo o teste.

- Todo voluntário que estiver sendo submetido ao IVGTT e tiver perda de consciência deve ter a glicemia determinada através de glicosímetro e mantida em níveis de segurança.

- A perda de consciência pode ocorrer também devido a queda da pressão arterial. Isso pode acontecer devido ao grande retirada de sangue levando a redução do volume sanguíneo ou

devido ao um episódio vasovagal. Se a pressão arterial continuar baixa deverá ser discutido com um médico a necessidade de infusão de solução salina.

- Há outras várias condições clínicas que podem levar a perda de consciência incluindo arritmia e isquemia cardíaca, comprometimento respiratório, eventos neurológicos. Essas possibilidade deverão ter a assistência médica.

#### **TELEFONES DE EMERGÊNCIA**

**Serviço de Atendimento Médico de Urgência: 192**

**Corpo de Bombeiros: 193**

Esse documento deve ser seguido pelos pesquisadores que estiverem realizando o Teste Intravenoso De Tolerância à Glicose no voluntário.



## 11. Anexos

### 11.1 Anexo 1



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/FS

#### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **005/12**

Título do Projeto: "Café e metabolismo da glicose: ensaio clínico cruzado randomizado com isótopos estáveis."

Pesquisadora Responsável: Caio Eduardo Reis

Data de Entrada: 29/02/2012

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **005/12** com o título: "Café e metabolismo da glicose: ensaio clínico cruzado randomizado com isótopos estáveis." analisado na 2ª reunião ordinária realizada no dia 21 de março de 2012.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sumário e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 29 de maio de 2012.

Prof. Nelson Menezes  
Coordenador do CEP-FS/UnB