



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

THARSUS DIAS TAKEUTI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À ALTERAÇÃO DE pH, PALMITATO DE SÓDIO E
GLUTAMINA EM CULTURA DE CÉLULAS INTESTINAIS NA DOSAGEM DE
PEPTÍDEOS INTESTINAIS**

UBERABA-MG

2017

THARSUS DIAS TAKEUTI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À ALTERAÇÃO DE pH, PALMITATO DE SÓDIO E
GLUTAMINA EM CULTURA DE CÉLULAS INTESTINAIS NA DOSAGEM DE
PEPTÍDEOS INTESTINAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e Experimental” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Crema
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Laura
Pinto Rodrigues

UBERABA-MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

T346e Takeuti, Tharsus Dias
 Efeito da exposição à alteração de pH, palmitato de sódio e glutamina em cultura de células intestinais na dosagem de peptídeos intestinais / Tharsus Dias Takeuti. -- 2017.
 75 f. il. : fig., graf., tab.

 Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
 Orientador: Prof. Dr. Eduardo Crema
 Coorientadora: Profa. Dra. Maria Laura Pinto Rodrigues

 1. Fisiologia celular. 2. Células enteroendócrinas. 3. Incretinas. 4. Receptor de GLP-1. 5. Glutamina. 6. Palmitatos. I. Crema, Eduardo. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 576.32/.36

THARSUS DIAS TAKEUTI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À ALTERAÇÃO DE pH, PALMITATO DE SÓDIO E
GLUTAMINA EM CULTURA DE CÉLULAS INTESTINAIS NA DOSAGEM DE
PEPTÍDEOS INTESTINAIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração "Patologia Básica e Experimental" da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em 02 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Eduardo Crema
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Orientador

Dedico

À minha mãe Edna Aparecida Silva Takeuti, meu pai Wilson Akio Takeuti, minha irmã Thayse Dias Takeuti e todos os outros familiares pelo apoio, pela confiança e pelos valores que me fizeram crescer sempre em qualquer situação.

À minha madrinha Tânia Parreira e sua família, que me acolheram e sempre depositaram confiança e entusiasmo em todos os momentos da minha vida.

À minha namorada Márcia Ângela Parolini e sua família, pela paciência e pelo apoio mesmo nos momentos em que estive ausente.

Aos meus amigos e todos companheiros de trabalho que conheci durante esse período de pós-graduação, que foram sempre solidários e compartilharam tanto os momentos de alegria como os momentos mais apreensivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Eduardo Crema pelos ensinamentos, paciência, compreensão e confiança depositados no meu trabalho e pela chance de estar trabalhando com este grupo.

A minha co orientadora, Dr^a. Maria Laura Pinto Rodrigues, que me acolheu em seu laboratório e abriu as portas com o apoio, conhecimento e treinamento para que esse trabalho pudesse se realizar.

Ao Dr. Júverson Alves Terra Junior, Médico cirurgião do aparelho digestivo, que demonstrou interesse e preocupação com o trabalho, instruindo-me para melhorias e correções.

Aos profissionais do Departamento de Cirurgia, em especial ao assistente administrativo Júlio Rossi e a instrumentadora Cristhiene Inácio Fernandes, que sempre me auxiliaram e instruíram em vários momentos.

Ao Departamento de Bioquímica, principalmente à Professora Roseli Aparecida Silva Gomes, que sempre se mostrou receptiva e atenciosa com todos os experimentos realizados no laboratório, e aos técnicos Geraldo Garcia e Rheltheer De Paula Martins, pela atenção depositada durante todos os procedimentos.

A Prof^a. Dr^a. Márcia Benedita de Oliveira Silva, que me cedeu as células para que esse trabalho fosse possível, além da ajuda com os protocolos e dúvidas.

Ao biomédico Lucas Felipe de Oliveira e a técnica de laboratório Ligia Carolina da Silva Prado, que me proporcionaram o treinamento para que pudesse fazer as culturas celulares, me ensinando técnicas e manuseios.

À assistente de laboratório, Livia Alves Martins, que ajudou nos manuseios, técnicas e calibragem dos aparelhos do laboratório.

Ao Prof. Virmondos Rodrigues Junior, que me auxiliou com dúvidas técnicas durante o trabalho e a análise dos resultados.

Ao grupo que foi formado através da pós-graduação, que ajudou a me tornar uma pessoa e um profissional melhor.

Aos funcionários da pós-graduação que me ajudaram e me instruíram nesse caminho percorrido.

A Deus, por tudo.

Sem essas pessoas esse trabalho não teria sido realizado.

RESUMO

TAKEUTI, Tharsus Dias. **Efeito da exposição à alteração de pH, palmitato de Sódio e glutamina em cultura de células intestinais na dosagem de peptídeos intestinais.** Dissertação (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

INTRODUÇÃO: O estudo das células L vem sendo muito valorizado pelo potencial de produção de incretinas e peptídeos intestinais. O GLP-1 é a principal incretina produzida. **OBJETIVO:** avaliar a secreção de GLP-1 em células intestinais da linhagem HCT-8, quando são expostas às condições de alteração do pH, suplementação de glutamina e palmitato de sódio. **METODOLOGIA:** As células foram expostas às condições de pH 7,2 e estimuladas com glutamina, palmitato de sódio e submetidas a alteração do pH para 4,8, tendo os meios de cultura coletados em 15 (T0), 30 (T2) e 60 (T3) minutos para dosagem de GLP-1 e DHL. **RESULTADOS:** Quando comparados os tempos nas condições de pH observou-se uma concentração maior do hormônio em T2 comparado com o basal ($p=0,02$), podendo ser observado o mesmo comportamento com o estímulo de palmitato de sódio ($p=0,04$). Com o estímulo de glutamina não foram observadas diferenças significativas. **CONCLUSÃO:** Com base nos resultados, pode se sugerir que a alteração do pH assim como o estímulo com palmitato influencia na secreção de GLP-1, nas células HCT-8, observando-se uma concentração maior quando é comparado com o basal. O estímulo da glutamina, na concentração utilizada no trabalho, não se mostrou um potencializador da secreção do hormônio. Mais estudos devem ser realizados para que sejam comprovadas as teorias.

Palavras chaves: Incretina; GLP-1; Glutamina; Palmitato

ABSTRACT

TAKEUTI, Tharsus Dias. **Effect of exposure to change of pH, sodium palmitate and glutamine in culture of intestinal cells in the dosage of intestinal peptide.** Dissertation (Doctorate in Health Science) - Federal University of Triangulo Mineiro

INTRODUCTION: The study of L cells has been highly valued for their potential of production of intestinal incretins and peptides. GLP-1 is the main incretin produced. **OBJECTIVE:** To evaluate GLP-1 secretion in intestinal cells of the HCT-8 strain when exposed to pH alteration conditions, glutamine supplementation and sodium palmitate. **METHODOLOGY:** Cells were exposed to pH 7.2 and stimulated with glutamine, sodium palmitate and pH change for 4,8 and, the culture médium was collected at 15 (T0), 30 (T1) and 60 (T2) minutes for GLP-1 and DHL dosage. **RESULTS:** A higher concentration of the hormone was observed in T2 compared to baseline ($p = 0,02$) when compared to the pH conditions, the same behavior could be observed with the sodium palmitate stimulus ($p = 0,04$). With the glutamine stimulus, no significant differences were observed. **CONCLUSION:** Based on the results, it can be suggested that pH change as well as stimulation with palmitate influences the secretion of GLP-1 in HCT-8 cells, observing a higher concentration when compared to baseline. Glutamine stimulation, at the concentration used in the study, did not prove to be a potentiator of hormone secretion. Further studies must be carried out to prove the theories.

Keywords: Incretin; GLP-1; Glutamine; Palmitate

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração de placa de cultura (transwell) com membrana de inserto.....39
- Figura 2:** Imagem obtida através de microscópio invertido confocal em aumento de 10x demonstrando células HCT-8 após segunda passagem com 5 dias de cultivo em garrafas de 25cm².....41
- Figura 3:** Placa de ELISA para GLP-1, pelo método de competição após a realização dos experimentos45
- Figura 4:** Concentração de GLP-1 em pg/mL expressas por mediana, mínimo e máximo para a condição basal, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos.49
- Figura 5:** Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo com estímulo de glutamina, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) em minutos.50
- Figura 6:** Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo para os testes de estímulo com glutamina, comparando os tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos entre condição basal e estímulo.....51
- Figura 7:** Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo com estímulo de palmitato de sódio, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) em minutos.....52
- Figura 8:** Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo para os testes de estímulo com palmitato de sódio, comparando os tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos entre condição basal e estímulo.53
- Figura 9:** Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo com alteração de pH, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) em minutos.....54

Figura 10: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo para os testes de alteração do pH, comparando os tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos entre condição basal e alteração.56

Figura 11: Gráficos representando medianas, mínimo e máximo de DHL (U/L) total comparando as duas situações de pH.57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Medicamentos orais e injetáveis atualmente aprovados para o tratamento da hiperglicemia no DMT2.....24
- Tabela 2:** Valores de mediana mínimo e máximo da concentração de GLP-1 (pg/mL) de acordo com os estímulos, em relação ao tempo (minutos)48
- Tabela 3:** Valores de mediana, mínimo, máximo e significância da dosagem de DHL após estímulos.57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Diabetes Mellitus
OMS	Organização Mundial de Saúde
ADA	American Diabetes Association
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
β	Beta
IAA	Anticorpo anti insulina
GADA	Descarboxilase de ácido glutâmico
IA2A	Auto Anticorpo Associado ao Insulinoma 2
ZnT8A	Transportador de Zinco 8
SM	Síndrome Metabólica
IMC	Índice de Massa Corpórea
kg/m ²	Quilogramas por metro quadrado
HbA1c	Hemoglobina Glicada
mg/dL	Miligramas por decilitro
\geq	Maior ou igual
%	Porcentagem
g	Gramas
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
DPP4	Dipeptidyl Peptidase-4
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina tri fosfato
K _{ATP}	Canais de Potássio ATP
Ca ⁺⁺	Íons de Cálcio
α	Alfa
SGLT2	<i>Sodium-Glucose Transporter-2</i>
GLP-1	<i>Glucagon Like Peptide 1</i>
PPAR γ	Porproliferadores de Peroxissoma Gama
GIP	<i>Gastric Inibhitory Peptide</i>
PYY	Peptídeo YY
CCK	Colecistoquinina
kda	Quilodaltons

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
HCT-8	Linhagem celular de carcinoma ileocecal colorretal humana
pH	Potencial Hidrogeniônico
CAD	Cirurgia do Aparelho Digestivo
TR	Placas <i>Transwell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
MEM	Aminoácidos não essenciais
CO ₂	Gás Carbônico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido clorídrico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DHL	Desidrogenase Láctica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
KCl	Cloreto de potássio
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	Fosfato de sódio heptahidratado
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L	Litro
°	Grau
C	Celsius
x	Vezes
xg	Aceleração gravitacional
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μL/mL	Microlitros por mililitros
cm ²	centímetro quadrado
céls/cm ²	células por centímetro quadrado
T	Tempo
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nm	nanômetros

pg/mL	Picogramas por mililitro
kg/cm ²	Quilograma por centímetro quadrado
n	Numero
½	Um sobre dois
CO ₂	Gás carbônico
¼	Um sobre quatro
M	Molar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
STC-1	Linhagem celular neuroendócrina tumoral intestinal de camundongos
g/kg	gramas por quilogramas
Glutag	Linhagem celular derivadas de tumor de cólon de ratos
TC1	Linhagem celular derivada de pâncreas de camundongos
N	Normal
TGR5	Receptor acoplado a proteína G
CV	Coeficiente de Variação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS	17
1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1	18
1.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2	19
1.3.1 Epidemiologia do DMT2	20
1.3.2 Estresse oxidativo e DMT2	20
1.3.3 Síndrome metabólica no DMT2	21
1.3.4 Diagnóstico do DMT2	22
1.3.5 Prevenção do DMT2	22
1.3.6 Tratamento do DMT2	23
1.3.6.1 Tratamento Cirúrgico para o DMT2	25
1.4 CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS	26
1.5 INCRETINAS E PEPTÍDEOS INTESTINAIS	26
1.5.1 Polipeptídeo Inibitório Gástrico (GIP)	27
1.5.2 Peptídeo tipo glucagon 1 (GLP-1)	27
1.5.3 Peptídeo YY (PYY)	28
1.6 GLUTAMINA	29
1.7 PALMITATO	30
2 OBJETIVO GERAL	32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 HIPÓTESE	34
4 DELINEAMENTO DO TRABALHO	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 MATERIAIS	38
5.2 METODOLOGIA	39
5.2.1 Preparo do meio de cultura	39
5.2.2 Preparo do tampão PBS	39

5.2.3 Cultivo celular	40
5.2.4 Descongelamento celular	40
5.2.5 Passagem das células (tripsinização)	41
5.2.6 Congelamento celular	42
5.2.7 Condições experimentais	42
5.2.7.1 <i>Preparo teste com pH</i>	43
5.2.7.2 <i>Preparo do teste com glutamina</i>	43
5.2.7.3 <i>Preparo do teste com palmitato de sódio</i>	43
5.2.8 Dosagens laboratoriais	44
5.2.8.1 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para GLP-1</i>	44
5.2.8.2 <i>Quantificação da Desidrogenase Láctica (DHL)</i>	45
5.2.9 Análises dos resultados	46
6 RESULTADOS	48
6.1 RESULTADOS GLP-1	48
6.1.1 Resultados do estímulo da glutamina	49
6.1.2 Resultados do estímulo do palmitato de sódio	51
6.1.3 Resultados da alteração de pH	54
6.2 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA DESIDROGENASE LÁCTICA.....	57
7 DISCUSSÃO	59
7.1 ESTÍMULO DE GLUTAMINA	59
7.2 ESTIMULO DE PALMITATO DE SÓDIO	61
7.3 ALTERAÇÃO DE pH.....	62
7.4 VIABILIDADE CELULAR	63
8 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM), corresponde a um grupo de doenças heterogêneas que vem desafiando os órgãos de saúde mundiais (YI; HUANG; ZHOU, 2016). São conhecidas como doenças metabólicas que tem como principal característica a hiperglicemia resultada pela falha na secreção da insulina, ou pela deficiência na ação da insulina, ou por ambas as causas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Os sintomas manifestados pela hiperglicemia, incluem, poliúria, polidipsia, perda de peso e polifagia, sendo as complicações agudas consideradas de alto risco, como a cetoacidose diabética (GROSS et al., 2002).

A taxa de pacientes com DM no mundo estava estimada em 415 milhões de pessoas no ano de 2015, tendo expectativa de chegar em 642 milhões em 2040 (SEINO; KUWATA; YABE, 2016). A epidemia de DM afeta cerca de 80% dos países em desenvolvimento e esses números vem aumentando devido ao crescimento e envelhecimento da população em ambientes mais urbanizados, onde ocorre o aumento da prevalência da obesidade e do sedentarismo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

Devido a esse aumento, há uma busca por alternativas e tratamentos para esses distúrbios. Para isso existem diretrizes que classificam as diversas formas de manifestação do DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017), e a classificação da fisiopatologia da doença é muito importante para que se tenha uma terapêutica adequada (SEINO; KUWATA; YABE, 2016).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a *American Diabetes Association* (ADA), o DM deve ser classificado de acordo com 4 classes clínicas; sendo o Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), DM gestacional e outros tipos de DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

O DMT1 é classificado por autoimune, onde ocorre uma progressiva destruição das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, levando a hiperglicemia e a dependência de insulina exógena (DAFOULAS et al., 2017).

O DM gestacional pode ser classificado como um tipo que é diagnosticado durante a gravidez, que não tem uma causa aparente, mas esta correlacionado

diretamente com as comorbidades como obesidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; KOIVUSALO et al., 2016).

O DM2, é caracterizado pela resistência à insulina e a falha progressiva das células β pancreáticas, levando a hiperglicemia e complicações crônicas (KASHYAP et al., 2010).

Os outros tipos de DM, são formas menos comuns, onde podem ocorrer defeitos genéticos tanto na função das células β , como na ação da insulina, ou doenças no pâncreas exócrino dentre outras condições (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1

O DM1 é uma doença autoimune que atinge milhões de pessoas no mundo, representa uma das mais de 80 doenças com etiologia autoimune. Ocorre como uma consequência da destruição imune órgão-específica das células β produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans no pâncreas. Ocorre em pessoas geneticamente predispostas (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010; DIABETES PREVENTION TRIAL--TYPE 1 DIABETES STUDY GROUP, 2002)

Estudos na maioria das populações confirmam um aumento na incidência de DM1 particularmente entre crianças pequenas, com o maior aumento ocorrido nos países de baixa prevalência da Europa Oriental (GILLESPIE, 2006).

São identificadas 2 formas:

- O tipo 1A é resultado de um ataque autoimune mediado por células imunológicas nas células β ,
- O tipo 1B é muito menos frequente, não tem causa conhecida, e ocorre principalmente em indivíduos de descendência asiática ou africana, que têm diferentes graus de deficiência de insulina entre episódios esporádicos de cetoacidose (DANEMAN, 2006).

O DM1 quando diagnosticado possui, um ou mais dos seguintes auto anticorpos no início da doença: aqueles que reagem à insulina (IAA), à descarboxilase de ácido glutâmico (GADA), ao auto anticorpo associado ao insulinoma 2 (IA2A) e ao transportador de zinco 8 (ZnT8A). Estes auto anticorpos podem aparecer tão cedo quanto aos 6 meses de idade, com uma incidência de pico antes dos 2 anos em

indivíduos geneticamente suscetíveis, portanto, estão presentes meses a anos antes do início sintomático (ATKINSON; EISENBARTH; AARON W MICHELS, 2014).

1.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2

O DMT2 é o mais predominante no mundo afetando cerca de 390 milhões de indivíduos, com expectativa de alcançar cerca de 600 milhões em 2030 (JOHANSSON et al., 2016). A incidência do DMT2 é de difícil acompanhamento em grandes populações, pois por ser uma doença crônica, requer um segmento durante anos com dosagens periódicas de glicemia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

É uma doença crônica que consiste na deficiência da regulação de glicose, causada pela resistência à insulina que é prejudicada pela progressiva falha das células β , com o passar dos anos em conjunto com o aumento do hormônio glucagon e a desregulação da produção de glicose pelo fígado (NAUCK, 2016).

Em um organismo saudável ocorre um feedback, entre a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, estimulada pela ingestão de glicose, aminoácidos e ácidos graxos. Em resposta os tecidos sensíveis à ação da insulina retornam ao feedback das ilhotas β pancreáticas informando que precisam de insulina para o metabolismo. Quando a resistência à insulina está presente, como acontece com algumas pessoas com obesidade, as células β aumentam a demanda de insulina para controlar a glicemia, porém com o tempo as células pancreáticas entram em stress e começam a falhar progressivamente, causando assim a hiperglicemia (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014).

A hiperglicemia causada pelo DM leva a complicações sistêmicas, que incluem neuropatias, nefropatias, retinopatias, doenças cardíacas coronarianas, e essas complicações contribuem para morbidade e mortalidade da doença (TANWEER et al., 2016).

É bem explicado que o DMT2, está diretamente correlacionado com as comorbidades e sua prevenção pode ser realizada através dos cuidados com os fatores de risco, como sedentarismo, obesidade, maus hábitos alimentares, tabagismo e ao envelhecimento (PEIXOTO; SILVA, 2011; SELPH et al., 2015).

1.3.1 Epidemiologia do DMT2

O diabetes apresenta números consideráveis de mortalidade prematura e morbidade além dos custos e cuidados de saúde. Dessa forma, o diabetes impõe demandas substanciais sobre os sistemas de saúde, com despesas médicas maiores quando comparadas a pacientes não diabéticos, principalmente por causa de complicações macro vasculares (CLARKE et al., 2010).

Estimativas atuais e futuras de portadores de diabetes são importantes para que se possa ter uma melhor política de saúde, com recursos e tratamentos apropriados (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Das estimativas obtidas em 2010, quando a prevalência de adultos portadores de DMT2 era de 285 milhões, é previsto um aumento para cerca de 439 milhões em 2030. Essas estimativas estão diretamente ligadas ao estilo de vida e à dieta da população (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

O DMT2 nas últimas 2 décadas foi considerado como uma doença prevalente em adultos, porém, os distúrbios metabólicos têm aumentado nas populações constituídas por adolescentes jovens devido ao aumento da obesidade. Embora tenha sido observada uma prevalência muito alta de DMT2 em grupos não caucasianos (afro-americanos, nativos americanos, hispânicos etc.), o DMT2 ocorre em todas as raças. A taxa de incidência (por 100.000 pessoas/ano) entre crianças e adolescentes varia muito por etnia, com as taxas mais elevadas sendo observadas entre jovens de 15 a 19 anos em populações minoritárias (D'ADAMO; CAPRIO, 2011).

1.3.2 Estresse oxidativo e DMT2

Os tecidos adiposo e muscular são os que mais são aplicados na patogênese da resistência à insulina. Quando a ingestão calórica é superior ao gasto de energia, ocorre um aumento da atividade do ciclo do ácido cítrico, induzido pelo substrato, que gera um aumento de NADH mitocondrial e formas reativas de oxigênio que levam ao estresse oxidativo. A resistência à insulina e a hiperglicemia podem gerar estresse oxidativo, acelerando o desenvolvimento do DMT2 (CERIELLO; MOTZ, 2004).

Hiperglicemia crônica aumenta a produção de radicais livres pela glicação não-enzimática e auto-oxidação de glicose (BUDIN et al., 2009). Isso demonstra que o

excesso de estresse oxidativo causa uma redução progressiva de células β , causando deficiência na produção de insulina (BAST et al., 2002).

Agentes antioxidantes, atualmente, são usados no tratamento do DM para auxiliar nas complicações a longo prazo, desenvolvidas pela doença, reduzindo assim o stress oxidativo (BUDIN et al., 2009).

1.3.3 Síndrome metabólica no DMT2

A Síndrome Metabólica (SM) é uma desordem complexa definida por um conjunto de fatores interligados que aumentam diretamente o risco de doença cardiovascular coronariana, doenças ateroscleróticas e DMT2, apresentando como principais manifestações a dislipidemia, a hipertensão e a quebra da homeostase de glicose. A obesidade abdominal e a resistência à insulina atualmente são utilizadas também para avaliar o risco das manifestações da SM (KASSI et al., 2011).

Estudos epidemiológicos mostram uma correlação entre o baixo peso ao nascimento e a SM adulta, mas os mecanismos que explicam essa correlação permanecem obscuros (LOTTENBERG; GLEZER; TURATTI, 2007).

O tratamento da SM visa às diversas manifestações da doença, tratando a dislipidemia, disglucemia, hipertensão entre outras, através de medicamentos. Outra abordagem baseia-se na fisiopatologia da SM como a adiposidade e a resistência à insulina, em que são recomendados tratamentos conservadores não farmacológicos, como atividades físicas e dietas, ocasião em que a diminuição da obesidade causa uma melhora dos fatores metabólicos envolvidos (GELONEZE; PAREJA, 2006).

O índice de massa corporal (IMC) é obtido a partir da divisão da massa em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Resultados de IMC acima de $25,0 \text{ kg}/\text{m}^2$ caracterizam excesso de peso, sendo que, valores de $25,0 \text{ kg}/\text{m}^2$ a $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ correspondem a sobrepeso e valores de $\text{IMC} \geq 30,0 \text{ kg}/\text{m}^2$, à obesidade. Essas definições têm base em evidências que sugerem que esses valores de IMC estão associados ao risco de doenças e morte prematura (AFONSO; SICHIERI, 2002).

De acordo com a OMS, é necessária a constatação da resistência à insulina para o diagnóstico de SM e mais a presença de dois ou mais componentes, porém a *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III*, considera que o diagnóstico SM é formado pela presença de três dentre quaisquer dos cinco componentes adotados. De acordo com a *International Diabetes Federation*, a

obesidade abdominal, associada com dois ou mais componentes, é obrigatória para confirmar o diagnóstico de SM (CARVALHO; RABELO, 2009).

O risco do DMT2 é proporcional ao IMC, sendo que a melhora da obesidade é um objetivo para melhor terapêutica do DMT2. A atividade física é importante ação para que se obtenha esse objetivo, uma vez que o aumento do consumo de glicose por parte do músculo esquelético em atividade contribui para o controle da glicemia (MERCURI; ARRECHEA, 2001).

Algumas evidências, apesar de não consensuais, mostram que mecanismos de inibição do apetite, como a liberação de peptídeos gastrointestinais reguladores do apetite, estão prejudicados em indivíduos obesos, embora esses mecanismos ainda não estejam bem esclarecidos (PEREIRA-LANCHA; CAMPOS-FERRAZ; LANCHA, 2012).

1.3.4 Diagnóstico do DMT2

Para diagnóstico do DMT2, são utilizadas as quantificações de glicose e hemoglobina glicada (HbA1C) no sangue venoso, sendo estes parâmetros considerados o padrão ouro (KERNER; BRÜCKEL, 2010).

De acordo com a ADA em 2017, os critérios diagnósticos para o DMT2 incluem as dosagens de glicemia de jejum, compreendendo um valor de 126 mg/dL após 8 horas de ingestão de alimentos, a quantificação da HbA1c, com valor maior ou igual a 6,5 %, o Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG), onde é realizada uma dosagem de glicose após 2 horas da administração de 75 g de glicose, e o resultado for ≥ 200 mg/dL. Quando o paciente apresenta sintomas da doença, o diagnóstico também pode ser feito através da glicemia aleatória onde o valor deve ser ≥ 200 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017).

1.3.5 Prevenção do DMT2

O fator de risco que é associado ao DMT2 que vem sendo visto como o principal fator para o desenvolvimento da doença é o estilo de vida (DEY; ATTELE; YUAN, 2002).

Com a globalização e o desenvolvimento dos alimentos, com o aumento da ingestão de gorduras hidrogenadas e carboidratos, fez com que a incidência da

doença se elevasse com o passar dos últimos anos, além do sedentarismo da vida moderna. Partindo desse princípio, é aconselhável que sejam realizadas formas de políticas de saúde com o intuito de conscientização da população quanto à alimentação e estilo de vida, além de tornar os alimentos saudáveis mais acessíveis para todas as classes sociais (LEY et al., 2014).

1.3.6 Tratamento do DMT2

O consenso geral para o tratamento do DMT2 é a mudança do estilo de vida do indivíduo visando o controle da glicemia, adicionando exercícios físicos e mudanças na alimentação (DEY; ATTELE; YUAN, 2002). Uma das formas que pode ser utilizada de forma terapêutica é a atividade física, onde são comprovadas melhoras nos níveis de glicose sanguínea e colesterol (BALDUCCI et al., 2014).

O principal alvo do tratamento do DMT2 é a redução da hiperglicemia (INZUCCHI et al., 2015). O objetivo do tratamento medicamentoso do DMT2 é o controle glicêmico desejável através de medicamentos, onde as drogas disponíveis visam corrigir a insuficiência e a resistência insulínica ou diminuir a absorção de glicose (OLIVEIRA; MILECH, 2006).

Também existem medicações que são dependentes da ação de agentes gastrointestinais. Entre essas medicações estão compreendidas drogas que retardam a absorção de glicose atrasando a degradação de carboidratos pelo intestino, drogas que atrasam o esvaziamento gástrico e medicamentos que aumentam a liberação de incretinas (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014). Esses hormônios são peptídeos produzidos e secretados pelo intestino que potencializam a resposta insulínica após um estímulo da ingestão de alimentos (HANSOTIA; DRUCKER, 2005).

Em casos em que o diabético tipo 2 apresenta a doença por muito tempo, ocorre uma progressão da doença, fazendo com que os indivíduos tenham que fazer o uso da insulina injetável com o objetivo de controlar a hiperglicemia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). Na Tabela 1 descrita por Kahn, Cooper e Del Prato em 2014, demonstra as drogas utilizadas no tratamento do DMT2.

Tabela 1: Medicamentos orais e injetáveis atualmente aprovados para o tratamento da hiperglicemia no DMT2

Agentes orais	Agentes injetáveis
<p>Sulfoniluréias Segunda geração</p> <p>Glibenclamida Gliclazida Glimepirida Glipizida</p> <p>Biguaninas</p> <p>Metformina</p> <p>Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARγ) (Tiazolidinedionas)</p> <p>Pioglitazona Rosiglitazona</p> <p>Inibidores de α-Glucosidase</p> <p>Acarbose Miglitol Voglibose</p> <p>Inibidores de Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4)</p> <p>Alogliptina Linagliptina Saxagliptina Sitagliptina Vildagliptina</p>	<p>Polipéptido de Amilóide de Ilhotas / Analímeros de Amilina</p> <p>Pramlintida</p> <p>Agonistas de receptores de GLP-1</p> <p>Exenatina Liraglutina</p> <p>Insulina</p> <p>Ação curta Insulina regular Insulina aspart Insulina glulisina Insulina lispro Prompt insulin zinc (Semilente)</p> <p>Ação Intermediária Insulina Isofana, Neutral Protamine Hagedorn (NPH) Insulina zinica</p> <p>Ação Longa Ultralenta ou insulina zínica Insulina detemir Insulina glargine</p>

Inibidores de Sodium-Glucose Transporter-2 (SGLT2)

Canagliflozina

Dapagliflozina

Fonte: (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014).

1.3.6.1 Tratamento Cirúrgico para o DMT2

A cirurgia bariátrica está emergindo como uma opção de tratamento valiosa para pacientes com DMT2. Este conceito vem se baseando na melhoria da doença após a cirurgia bariátrica e o crescente número de evidências de que as operações gastrointestinais podem afetar diretamente o metabolismo da glicose, independentemente da perda de peso (MINGRONE et al., 2015). Essas melhorias podem ser explicadas por alterações na secreção de hormônios intestinais, mudanças no metabolismo de sais biliares e na microbiota (SALINARI et al., 2014).

A melhora do DMT2 após a cirurgia demonstra a hipótese de que alguns efeitos podem ocorrer independentemente da perda de peso e podem estar relacionados com as alterações das incretinas. A saciedade ainda não é explicada claramente, mas existe uma hipótese de que a alteração na liberação dos peptídeos *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) e Peptídeo YY (PYY) está associada com esse fenômeno (OLIVÁN et al., 2009).

Dois hipóteses foram propostas para explicar o efeito do bypass duodeno jejunal no DMT2. A "hipótese *hindgut*" indica que a chegada precoce de nutrientes para o intestino distal eleva um sinal fisiológico que melhora o metabolismo da glicose, sendo o GLP-1 um potencial mediador desse efeito. Outra hipótese alternativa é que cirurgias bariátricas que dependem da exclusão do duodeno e do jejuno proximal eliminem a passagem de nutrientes por essas regiões e, assim, possivelmente evitam a secreção que promove a resistência à insulina. Essa é chamada de hipótese "hipótese *foregut*" (RUBINO et al., 2006).

1.4 CÉLULAS ENTEROENDÓCRINAS

As células enteroendócrinas são células epiteliais especializadas dispersas entre as células mucosas do trato gastrointestinal que representam menos de 1% da população epitelial de todo intestino. Elas constituem o maior órgão endócrino do corpo humano, que produz e secreta uma variedade de hormônios ou moléculas de sinalização, incluindo gastrina (células G), grelina (células P ou X), somatostatina (células D), colecistoquinina (CCK) (células I), serotonina (células enterocromafins), peptídeo inibitório gástrico (GIP) (células K), peptídeos semelhantes a glucagon (GLPs) e peptídeo YY (PYY) (células L) (STERNINI; ANSELMINI; ROZENGURT, 2008).

São formadas em conjunto com os outros tipos de células epiteliais por divisão contínua de células estaminais nas criptas e têm uma vida útil de 3-5 dias no intestino delgado. A literatura recente sugere que há um alto grau de sobreposição transcricional entre diferentes populações de células enteroendócrinas (GRIBBLE; REIMANN, 2017).

As células enteroendócrinas, também podem ser identificadas como neuroendócrinas, pois são capazes de gerar estímulos neurais. As células L enteroendócrinas podem estar presentes do duodeno ao reto embora sejam raras no íleo proximal. O estudo das células L está sendo muito valorizado pelo potencial de produção de incretinas e peptídeos intestinais (GUNAWARDENE; CORFE; STATON, 2011).

1.5 INCRETINAS E PEPTÍDEOS INTESTINAIS

Estudos demonstram que estas substâncias liberadas em resposta a ingestão de alimentos, são capazes de auxiliar na função do pâncreas endócrino e assim diminuir a concentração de glicose plasmática. Essas substâncias são conhecidas como incretinas, que são hormônios que tem a capacidade de diminuir a glicemia (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

As células L êntero endócrinas secretam uma série de peptídeos fisiologicamente importantes, incluindo GLP-1, GLP-2, o Peptídeo YY (PYY) e a oxintomodulina (REIMANN et al., 2008).

Nos humanos o GIP e o GLP-1 são os 2 hormônios principais secretados pelo intestino após a ingestão de glicose ou nutrientes, que estimulam a secreção de insulina a partir de células β pancreáticas (DEACON, 2005). O GLP-1 é produzido a partir das células L que apresentam maior concentração no jejuno distal, íleo e cólon, enquanto o GIP é secretado de células K localizadas na mucosa proximal intestinal (duodeno e jejuno superior) (TASYUREK et al., 2014).

As incretinas são inativadas pela enzima Dipeptidil Peptidase 4 (DPP4), fazendo com que a meia vida dos hormônios na corrente sanguínea seja curta. Com isso existem medicamentos que atuam como inibidores da DPP4, que se ligam a enzima e impedem que ela degrade o GLP-1 e o GIP (OYAMA; HIGASHI; NODE, 2014).

1.5.1 Polipeptídeo Inibitório Gástrico (GIP)

GIP é um hormônio composto por 42 aminoácidos, secretado a partir de células K do intestino delgado superior. Foi originalmente isolado do intestino de suínos, com base na sua capacidade de inibir a secreção de ácido gástrico, sendo comprovado posteriormente que estimula a secreção de insulina pelas células β pancreáticas (YABE; SEINO, 2011).

A secreção de GIP é estimulada pela ingestão oral de gordura e carboidratos, mas no homem, as proteínas parecem ser menos importantes, embora alguns estudos tenham indicado que os aminoácidos estimulam a liberação de GIP. No cão e no rato, as proteínas são um potente estimulante do GIP (DEACON, 2005).

Os níveis de GIP atingem um pico de 15 a 30 minutos após a ingestão oral de glicose. Os mecanismos pelos quais o GIP estimula a secreção de insulina são semelhantes aos identificados para o GLP-1 e incluem elevação do AMPc, inibição do canal K_{ATP} e aumentos no Ca^{++} intracelular (HANSOTIA; DRUCKER, 2005).

1.5.2 Peptídeo tipo glucagon 1 (GLP-1)

O GLP-1 é um peptídeo constituído por 30 aminoácidos, que é secretado a partir de células L epiteliais intestinais após uma refeição. O principal papel fisiológico deste hormônio endócrino é o estímulo da secreção de insulina (LIM et al., 2009), é derivado do produto de transcrição do gene de proglucagon. As formas

biologicamente ativas de GLP-1 são: GLP-1 (7-37) e GLP-1- (7-36) NH₂. Uma vez na circulação, GLP-1 tem uma meia-vida de menos de 2 min devido à degradação rápida pela enzima DPP4 (PHAM et al., 2016).

O GLP-1 demonstra uma série de efeitos antidiabéticos adicionais, incluindo supressão da liberação de glucagon, atraso no esvaziamento gástrico e aumento do crescimento e sobrevivência das células β pancreáticas. Aproveitando as funções antidiabéticas, os miméticos de GLP-1 e abordagens farmacológicas para aumentar os níveis circulantes de GLP-1 endógeno através da diminuição da degradação estão sendo atualmente utilizados para o tratamento do DMT2 (LIM et al., 2009).

A secreção de GLP-1 é estimulada pela ativação de uma série de sinais intracelulares, que incluem as proteínas quinases A e C, proteínas quinases ativadas por mitógenos e cálcio (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

1.5.3 Peptídeo YY (PYY)

O PYY é um hormônio intestinal composto por 36 aminoácidos, que atua na supressão do apetite. É secretado pelas células L do trato gastrointestinal. Alguns estudos demonstraram que baixos níveis de PYY foram relatados quando associados Índice de Massa Corpórea (IMC) elevados e obesidade. A circulação do PYY na corrente sanguínea aumenta a saciedade e, posteriormente, diminui a ingestão de alimentos. Além disso, documentou-se que o PYY desempenha um papel integral na manutenção da homeostase de energia. No entanto, o envolvimento do PYY no desenvolvimento da obesidade humana ainda não é bem explicado (CAHILL et al., 2014).

No jejum, o PYY apresenta níveis muito baixos, sendo sua liberação para via sanguínea através do estímulo nutricional. Demonstra um rápido aumento em resposta à ingestão de alimentos, atingindo seu limiar entre 1 e 2 horas após a refeição e podendo permanecer elevado por várias horas. Pode apresentar uma elevação dentro de 15 minutos, momento em que o alimento chega ao íleo (KARRA; CHANDARANA; BATTERHAM, 2009).

Existem duas formas endógenas, o PYY₁₋₃₆ e o PYY₃₋₃₆ na circulação, sendo o PYY₁₋₃₆ predominante no jejum e o PYY₃₋₃₆ em maior concentração na circulação no estado pós-prandial. O PYY₃₋₃₆ está proporcionalmente relacionado à ingestão

calórica consumida. Essa forma é considerada um hormônio anorético (CHANDARANA et al., 2011).

O PYY circulante interage com as regiões hipotalâmicas do apetite e com as regiões do tronco cerebral para induzir a saciedade, controlando assim a ingestão de alimentos, que é um dos maiores fatores de risco para o DMT2 (WYNNE; BLOOM, 2006).

Ramracheya *et al.*, em 2016, demonstraram que o PYY também tem a capacidade de aumentar a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas.

1.6 GLUTAMINA

A glutamina é um L- α -aminoácido que pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. Apresenta peso molecular de aproximadamente 146,16 kda. É o aminoácido livre em maior concentração no plasma e no tecido muscular, sendo classificada como um aminoácido não essencial (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

A função da glutamina como fonte de nitrogênio e carbono a torna um nutriente crucial durante a proliferação celular, pois possui o amino e amido nitrogênios, que são transferidos para intermediários metabólicos na síntese de ácidos nucleicos, proteínas e hexosaminas, ou liberados como amônia. A glutamina também ajuda a mitigar os efeitos de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são formadas como resultado do estado metabólico de alto fluxo de crescimento celular rápido. Após a desamidação da glutamina, o glutamato resultante pode se condensar com a cisteína para formar o precursor de glutathione, um importante antioxidante (RAJAGOPALAN; DEBERARDINIS, 2012).

O aminoácido glutamina é abundante na dieta humana e um estimulador particularmente eficaz da liberação de GLP-1 *in vitro*, porque não só gera um sinal elétrico nas células L, mas também eleva os níveis intracelulares de AMPc. A ingestão oral de glutamina em voluntários humanos foi associada ao aumento da secreção de GLP-1 e à melhora da tolerância à glicose (MEEK et al., 2016).

Estudos demonstraram que o tratamento com glutamina antes da ingestão de refeição aumentam a resposta de GLP-1 e glicemia pós-prandial reduzida em pacientes com DMT2, com eficácia comparável à do inibidor de DPP4, sitagliptina (JOO et al., 2015).

1.7 PALMITATO

O palmitato é um ácido graxo saturado, derivado do ácido palmítico, um dos principais componentes do óleo de palma (HAYASHI et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Hayashi *et al.*, em 2014 demonstraram que o estresse do retículo endoplasmático, induzido com doses excessivas de palmitato, aumenta a expressão de marcadores de estresse do retículo endoplasmático, levando a diminuição da secreção de GLP-1 de células GLUTag.

Por outro lado, Diepvens *et al.*, (2007) observaram que a administração de uma emulsão de óleo de palma fracionada (40%) e óleo de aveia fracionada (2,5%) em água auxilia na manutenção do peso, além de ter detectado um aumento nos níveis de GLP-1 circulante.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Verificar se o hormônio GLP-1 é secretado pelas células intestinais in vitro na presença de diferentes estímulos e também após alteração de pH.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar no meio de cultivo de células HCT-8 a concentração de hormônio GLP-1 na presença de glutamina.
- Quantificar no meio de cultivo de células HCT-8 a concentração de hormônio GLP-1 na presença de palmitato de sódio.
- Quantificar no meio de cultivo de células HCT-8 a concentração de hormônio GLP-1, na condição de acidificação do pH, mimetizando o mesmo da região do duodeno com o valor de 4,8.

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

Em trabalho realizado pelo grupo de pesquisa da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo (CAD) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, e publicado em 2014, Takeuti *et al.* avaliaram pacientes submetidos a operação de exclusão duodeno jejunal com interposição ileal sem gastrectomia, e encontraram uma elevação da secreção de GLP-1 no momento em que os pacientes se encontravam em jejum. Partindo deste ponto, onde um segmento do íleo terminal foi interposto entre o estômago e o jejuno, foi se pensado que a alteração do pH de 7,2 (normal) para 4,8 (operado) nas células ileais que estão localizadas em grande parte nessa região do íleo interposto, pode estar influenciando no aumento da secreção do GLP-1.

Para isso foi realizada a condição de pH acidificado *in vitro*, com uma linhagem de células compatíveis com a região ileal, para verificar se ocorre o aumento da secreção da incretina.

Além da alteração do pH, Takeuti *et al.*, 2014 também administraram óleo de palma e glutamina para os pacientes submetidos à cirurgia e tiveram como resultado a diminuição significativa da glicemia duas horas após a administração, que pode estar relacionado à ação das incretinas. Devido à cirurgia, a chegada dos compostos às células ileais também podem ter influenciado a secreção dos peptídeos

DELINEAMENTO

4 DELINEAMENTO DO TRABALHO

Baseado no trabalho de TAKEUTI *et al.*, 2014, foram escolhidas as células HCT-8 (ATCC®), que são linhagens de células tumorais humanas imortalizadas que podem ser adquiridas comercialmente. Essa linhagem foi obtida a partir de adenocarcinoma íleo-cecal e colorretal, que tem características epiteliais aderentes, e são muito utilizadas em experimentos, pois se diferenciam em enterócitos (ZIEGLER *et al.*, 2011).

As células foram colocadas em situações de pH, como se fizessem parte da condição operada, expostas ao pH de 4,8 referente à região duodenal, onde foi interposto o segmento ileal (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002), e da condição fisiológica do organismo de 7,2.

Concomitantemente, foram realizados os estímulos com glutamina e palmitato de sódio, para avaliar se os compostos sozinhos são capazes de melhorar a secreção dos hormônios e peptídeos intestinais.

O trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Triângulo Mineiro sob o parecer 2526.

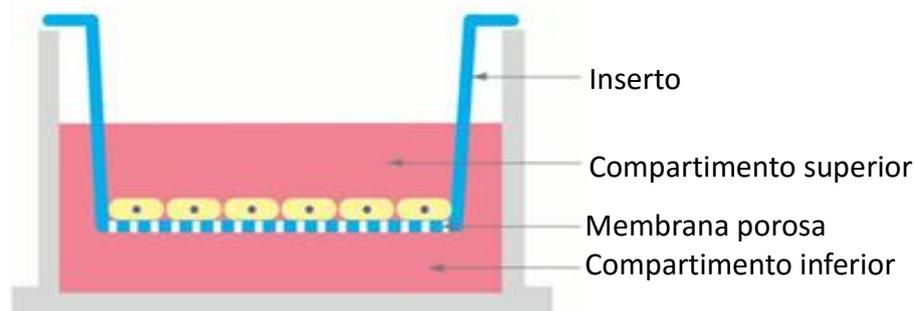
MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

- Células HCT-8
- Placas de cultura de 6 poços com insertos (*transwell*) com poros de 4 μm (TR) ilustradas da Figura 1
- Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)
- Soro Fetal Bovino (SFB)
- Aminoácidos não essenciais (MEM)
- Capela de fluxo laminar
- Estufa de CO₂
- Tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*)
- Tripsina EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- Glutamina
- Palmitato de Sódio
- Ácido clorídrico (HCl)
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃)
- Centrifuga refrigerada
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Kit de Desidrogenase Lactica (DHL)
- Inibidor de Dipeptidil Peptidase (DPP4)
- Kit de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para GLP-1
- Leitor de placas de ELISA
- Espectrofotômetro para leitura de absorvância

Figura 1: Ilustração de placa de cultura (*transwell*) com membrana de inserto.



Fonte: http://www.unc.edu/depts/our/hhmi/hhmi-ft_learning_modules/2012/biologymodule/science.html acessado em 2017.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi DMEM contendo alta concentração de glicose (4500 mg/L), L-glutamina, piruvato de sódio e sem bicarbonato de sódio.

Foi feita a reconstituição do meio em pó, adicionando 1 litro de água Milli-Q, 3,2 g de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado para 7,2 utilizando HCl a 2M.

O meio foi filtrado em sistema de filtragem autoclavado dentro das condições estéreis, na capela de fluxo laminar, para descontaminação.

Após a filtragem o meio foi suplementado com 10% de SFB, 1% de solução contendo penicilina e estreptomicina, e 1% de aminoácidos não essenciais (MEM) contendo L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glicina, L-serina, L-prolina e ácido L-glutâmico.

5.2.2 Preparo do tampão PBS

O tampão PBS utilizado para a lavagem das células durante o procedimento de passagem, congelamento das células e estímulos.

Foi preparado dissolvendo 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 2,72 g de fosfato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 0,24 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) em 800 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume foi ajustado para 1 L.

O PBS foi autoclavado por 20 minutos a 1,5 kg/cm² em ciclo líquido.

5.2.3 Cultivo celular

A linhagem celular HCT-8 foi adquirida em conjunto com o Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm², sendo os meios de cultura trocados a cada 2 dias e as passagens foram realizadas quando as monocamadas celulares atingiam a confluência, geralmente em 4 dias, com tripsina EDTA.

Nas placas de cultura para os estímulos, as células foram retiradas das garrafas de cultura com tripsina EDTA, coradas com azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer sendo utilizada a seguinte fórmula para a definição da densidade das células:

$$\text{número (n) de células/mL} = \frac{n \text{ total de células}}{n \text{ de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

O número de quadrantes contados foi 4 e o fator de diluição utilizado foi o de 1/2. Após a contagem as células foram aliquotadas da seguinte forma:

- Placas de 6 poços *transwell* (TR) com insertos - foram colocados sobre os insertos as células em uma densidade de 8,65 x 10⁵ céls./cm².

Após o procedimento descrito, os meios de cultura nas placas foram trocados a cada 2 dias e após 5 dias foram realizados os estímulos com glutamina, palmitado de sódio e alteração do pH.

As garrafas e placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C.

5.2.4 Descongelamento celular

As células estavam congeladas no nitrogênio líquido em solução de soro fetal bovino (SFB) com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para o descongelamento, as células foram aquecidas em banho maria a 37° C por 50 segundos. Com uma pipeta estéril foi retirado o conteúdo do *criovial* e adicionado a um tubo contendo 9 mL de meio de cultura

A solução foi centrifugada com rotação de 300 x g por 10 minutos a 4° C. Foi descartado o sobrenadante e o pellet de células foi ressuscitado em 4 mL de meio completo. As células foram coradas por azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer. Foram aliqüotadas em garrafas de cultura de 25 cm² com uma densidade de 3,7x10⁵ células/cm², com diluição de ¼.

As garrafas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C.

5.2.5 Passagem das células (tripsinização)

As células foram observadas em microscópio invertido para conferir a formação da monocamada e da confluência das células. Assim que as células apresentavam confluência (Figura 2) foi realizada a passagem.

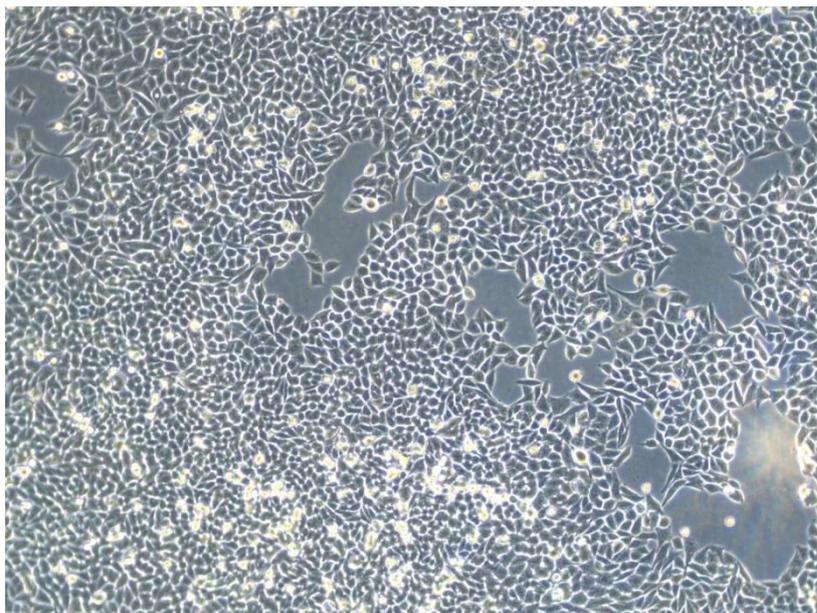
Para a realização da passagem foi retirado o meio de cultura das garrafas e desprezado, as células foram lavadas 2 vezes com tampão PBS para a retirada do SFB. O PBS do lavado foi armazenado em um tubo Falcon estéril. Adicionou 1 mL de tripsina EDTA para as garrafas. A tripsina remove as células aderidas na garrafa sendo acompanhada a turvação do meio e o desprendimento das células em microscópio invertido durante 5 minutos. Foi adicionado 3 mL de meio completo para a inativação da tripsina.

A solução de 4 mL (tripsina + meio) foi colocada junto com o lavado de PBS recolhido e foram centrifugados com rotação de 300 x g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuscitado em 10 mL de PBS. Dessa solução foram retirados 20 µL para contagem em câmara de Neubauer coradas com 20 µL Azul de Tripan, respeitando a diluição de ½.

Os 10 mL da solução de células com PBS foram centrifugados nas mesmas condições descritas acima. Depois da centrifugação foi retirado o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em meio de cultura em alíquotas com densidade de 3,3 x 10⁵ céls./cm² por garrafa de cultura e completou-se o com meio de cultura obedecendo a diluição de ¼.

As garrafas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C.

Figura 2: Imagem obtida através de microscópio invertido confocal em aumento de 10x demonstrando células HCT-8 após segunda passagem com 5 dias de cultivo em garrafas de 25cm².



Fonte: Imagem acervo do autor (2017).

5.2.6 Congelamento celular

Após a tripsinização, descrita nas passagens, o pellet obtido após a centrifugação foi ressuspenso em 10 mL de uma solução de SFB com 5% de DMSO.

A solução foi distribuída em *criovials* contendo aproximadamente 1 mL, com densidade de $2,7 \times 10^6$ céls./cm², e mantidas por 24 horas em freezer com temperatura de -80°C. Após esse período as células foram armazenadas em nitrogênio líquido.

5.2.7 Condições experimentais

Para os testes de estímulo, as células foram mantidas durante 6 dias, para atingirem a confluência, nas placas de cultura TR. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS para a retirada do SFB, e incubadas com meio DMEM sem antibióticos e SFB, para não interferir no processo de secreção das células, durante 7 horas.

Os meios foram coletados e identificados como PRÉ, para a quantificação de DHL e as células foram submetidas às condições de estímulos.

Os poços das placas com insertos foram identificados pelos tempos de 15 (T0), 30 (T1) e 60 (T2) minutos, sendo separados sete poços por tempo. Foram coletados os meios de cultura nos tempos.

As placas foram separadas e identificadas, sendo uma placa considerada basal com a condição de pH 7,2 sem estímulo, e as demais condições e estímulos foram comparadas com a condição basal.

Para as dosagens de GLP-1, foi adicionado aos meios de cultura (inclusive na condição basal), inibidor de DPP4 na concentração de 10 $\mu\text{L/mL}$, para evitar a degradação do peptídeo.

5.2.7.1 Preparo teste com pH

O pH dos meios no compartimento inferior das placas foi de 7,2 em todas as placas, para mimetizar as condições fisiológicas. Sendo 3 placas de seis poços, e mais um poço em outra placa, destinadas para o experimento com a alteração de pH para 4,8 (operado). Foi realizado o ajuste do pH acrescentando HCl a 2M.

Na parte inferior de todos os poços da placa *transwell*, foram adicionados 1 mL de meio de cultura com pH 7,2, enquanto na parte superior foram adicionados 1 mL dos meios com pH 4,8.

A partir da adição dos meios, com alteração do pH sobre as células, os mesmos, tanto sobre o inserto como na parte inferior, foram coletados obedecendo os tempos de T0, T1 e T2 em um tubo eppendorf, para as dosagens de GLP-1 e DHL.

5.2.7.2 Preparo do teste com glutamina

Foram utilizadas três placas de seis poços com insertos (TR) e mais um poço de outra placa com inserto. O meio sem antibióticos e SFB foi suplementado com 10 mM de glutamina, sendo 1 mL desse meio colocado na parte superior do inserto, e 1 mL de meio normal sem excesso de glutamina, na parte de inferior.

O estímulo com glutamina foi padronizado em pH 7,2.

O procedimento de coleta para quantificações foi o mesmo que o do pH descrito.

5.2.7.3 Preparo do teste com palmitato de sódio

O palmitato de sódio é um sal derivado do ácido palmídico, um dos principais compostos do óleo de palma. Esse estímulo foi definido, uma vez que o óleo de palma

não é hidrossolúvel, e os meios de cultura onde as células são mantidas tem como sua base principal a água, tornando o estímulo direto com o óleo inviável.

O meio de cultura sem antibióticos e SFB foi suplementado com palmitato de sódio na concentração de 100 μM , e foi distribuído na porção superior das placas TR.

O estímulo de palmitato também foi padronizado com pH 7,2

A distribuição e coleta dos experimentos com palmitato de sódio foi semelhante à de glutamina e alteração de pH.

5.2.8 Dosagens laboratoriais

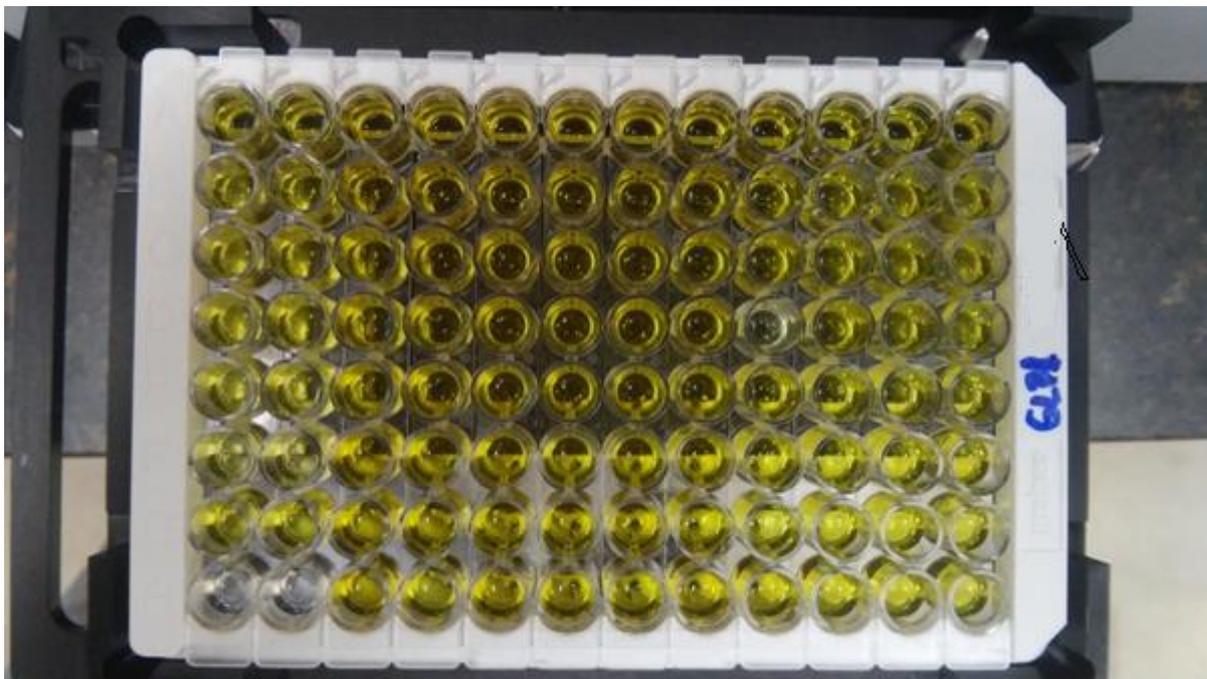
5.2.8.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para GLP-1

Foi utilizado o kit de ELISA pelo método de competição para a quantificação do GLP-1 (Sigma-Aldrich), sensibilizado por avidina e biotina, seguindo as seguintes etapas:

- A placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo anti GLP-1, durante uma incubação *overnight* a 4°C;
- Após a primeira incubação, a placa foi lavada por 4 vezes com tampão de lavagem;
- Nos poços identificados, foram pipetados o branco, os padrões devidamente diluídos, e as amostras, acrescidas com o reagente GLP-1 biotinilado, para competição;
- A placa foi incubada mais uma vez *overnight* a 4°C;
- Ao término da segunda incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem;
- Foi feita a adição da estreptoavidina em todos os poços e realizada uma incubação de 45 minutos agitando a placa em temperatura ambiente;
- Foi feita a lavagem da placa como descrito anteriormente, após a terceira incubação;
- Adicionou-se o substrato em todos os poços e foi feita uma incubação de 30 minutos;
- Foi acrescentada a solução de parada
- Após reação parada a placa foi lida imediatamente no leitor de placas de ELISA, configurado com a absorvância de 450 nm.

A Figura 3 apresenta a placa de ELISA para GLP-1 após o final do procedimento.

Figura 3: Placa de ELISA para GLP-1, pelo método de competição após a realização dos experimentos



Fonte: Acervo autor (2017).

5.2.8.2 Quantificação da Desidrogenase Láctica (DHL)

O kit de quantificação de DHL (Biotécnica), foi realizado através do método cinético da redução do piruvato por NADH.

Foi adicionado em uma cubeta de espectrofotômetro 1 mL do reagente de trabalho, que atua como substrato, e 20 µL do meio de cultura. As leituras em absorbâncias foram mensuradas nos tempos de 1 (A₀), 2 (A₁), 3 (A₂) e 4 (A₃) minutos em filtro de 340 nm.

Com o valor das leituras, foi feito o cálculo através da fórmula:

$$\frac{(A_0 - A_1) + (A_1 - A_2) + (A_2 - A_3)}{3} \times 8095$$

Onde 8095 corresponde ao fator de calibração. Os valores de DHL foram expressos em unidades por litro (U/L).

5.2.9 Análises dos resultados

Para resultados da concentração de GLP-1, foram realizadas as comparações entre as condições de estímulos com o basal e a avaliação da cinética, comparando os tempos de cada situação.

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graphpad Prism 5*. Todas as variáveis foram submetidas a análise descritiva, sendo determinados: n válido, média, mediana, valores mínimo e máximo, variância e desvio padrão. Foram ainda submetidas ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e o coeficiente de variação (CV). Como a maioria não apresentou distribuição normal, e o CV maior que 60%, foram utilizados testes não paramétricos.

Nas análises cinéticas nas comparações entre os tempos, foram realizados os testes de Wilcoxon para comparar dois tempos, e Friedman para comparar todos os momentos.

As comparações entre os estímulos com o basal, foram feitas a análises dos tempos utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Para a dosagem de DHL, foram utilizados os valores totais, e foi feita a análise estatística, onde foi aplicado o teste de normalidade de *Kolmogorov – Smirnov* associado ao CV. Como os valores não se apresentaram distribuição normal e o coeficiente de variação foi maior que 60%, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Os valores considerados significantes foram de $p < 0,05$.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS GLP-1

Os resultados da quantificação de GLP-1 em pg/mL, referentes aos testes basal, estímulos de glutamina, palmitato de sódio e alteração do pH, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1) e 60 (T2) em minutos, estão representados na Tabela 2.

Quando é observado a concentração de GLP-1 das placas destinadas ao basal, não se observa alterações com relação à mediana.

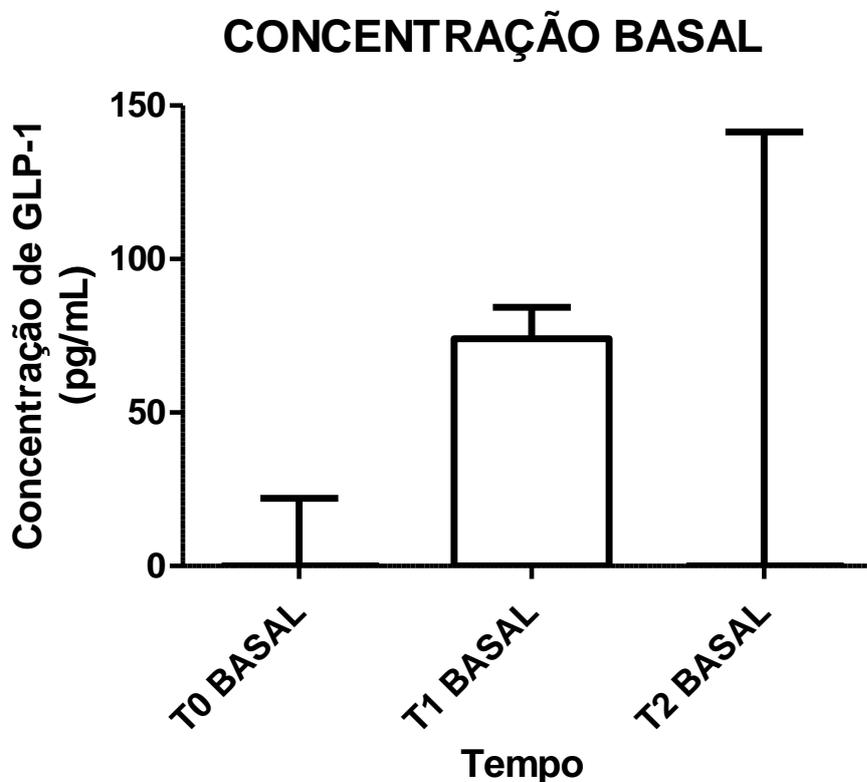
Analisando a cinética dos três tempos, não é observado nenhuma diferença estatística ($p = 0,49$). Quando comparados os tempos em relação a T0, também não apresentam diferenças estatísticas (T0 e T1 com $p = 0,5$ e T0 e T2 com $p = 1$). Esses resultados são apresentados na Figura 4.

Tabela 2: Valores de mediana, mínimo e máximo da concentração de GLP-1 (pg/mL) de acordo com os estímulos, em relação ao tempo (minutos)

Identificação	Tempo		
	T0	T1	T2
BASAL	0 (0 - 22,12)	0 (0 - 84,3)	0 (0 - 141,4)
GLUTAMINA	0 (0 - 38,2)	0 (0 - 143,3)	0 (0 - 19,65)
PALMITATO DE SÓDIO	0 (0 - 42,6)	0 (0 - 88,7)	0,4 (0 - 218)
pH	0,1 (0 - 68,9)	25,2 (0 - 116,6)	30,5 (8,2 - 59,7)

Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

Figura 4: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressas por mediana, mínimo e máximo para a condição basal, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos.



Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

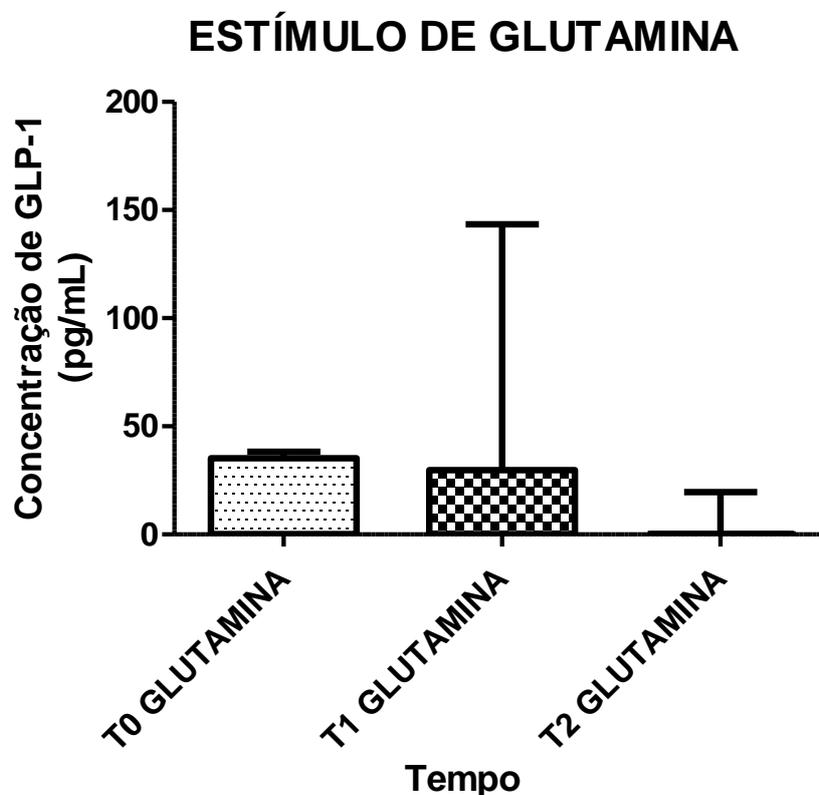
6.1.1 Resultados do estímulo da glutamina

A Figura 5 apresenta os resultados de GLP-1 (pg/mL) em todos os tempos, demonstrando a quantificação com estímulo de glutamina.

Analisando a cinética dos três tempos das quantificações com o estímulo da glutamina, pelo teste de Friedman, diferenças estatísticas significativas entre T0, T1 e T2 não foram observadas ($p = 0,23$).

Quanto a cinética, comparando 2 tempos em relação ao T0, pelo teste de Wilcoxon, não foram observadas relevâncias estatísticas quando comparados T0 com T1 ($p = 1,0$) e T0 com T2 ($p = 0,5$).

Figura 5: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo com estímulo de glutamina, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) em minutos.



Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

Comparando os momentos entre os grupos de experimentos de basal e estímulo de glutamina, demonstrados na Figura 6, são descritos os valores de GLP-1 de T0 basal (0 – 22,12) e T0 da glutamina (0 – 38,2), com $p = 0,47$ (Figura 6A). Quando comparadas T1 basal (0 – 84,3) e T1 glutamina (0 – 143,3) foi observado o valor de $p = 0,93$ (Figura 6B); e T2 basal (0 – 141,4) e T2 glutamina (0 - 19,65) com $p = 1,0$ (Figura 6C). Nenhuma significância estatística foi notada nas situações descritas.

Figura 6: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo para os testes de estímulo com glutamina, comparando os tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos entre condição basal e estímulo.

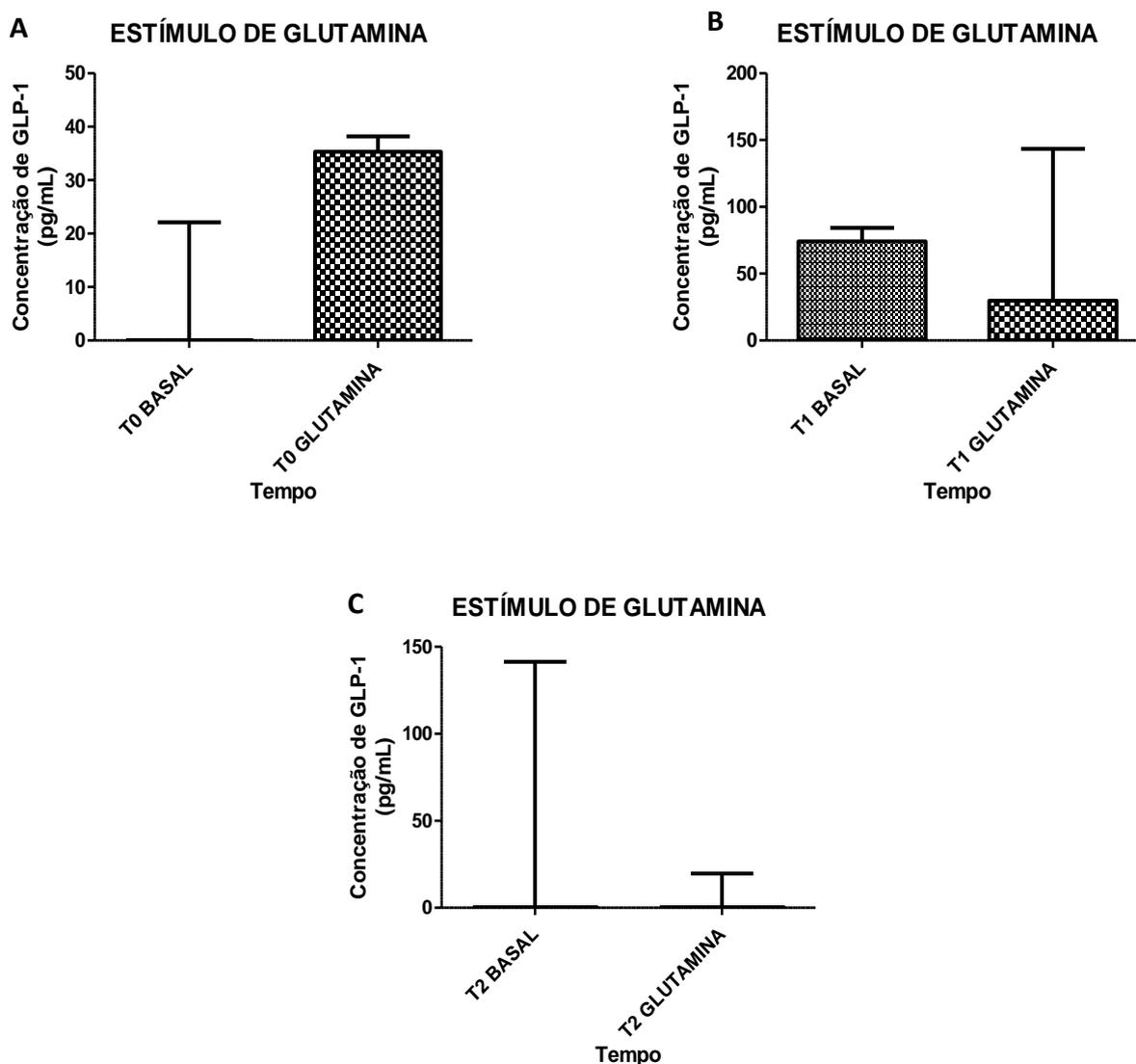


Figura 6A: Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T0 basal e T0 após o estímulo de glutamina ($p = 0,47$). **Figura 6B** Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T1 basal e T1 após o estímulo de glutamina ($p = 0,93$). **Figura 6C:** Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T2 basal e T2 após o estímulo de glutamina ($p = 1,0$). Dados obtidos pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

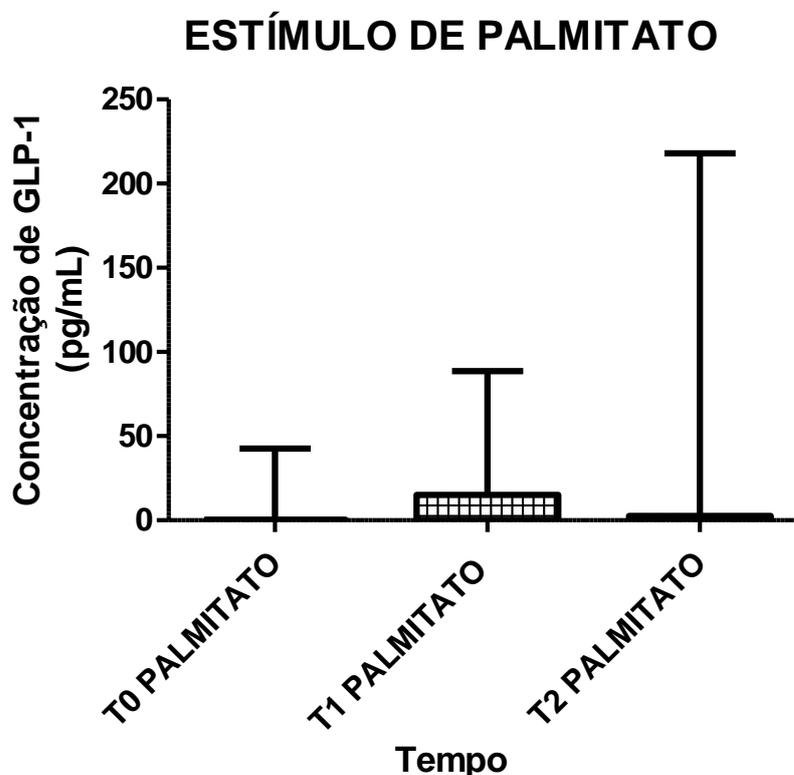
6.1.2 Resultados do estímulo do palmitato de sódio

A concentração de GLP-1 após o estímulo com o palmitato de sódio relacionada com o basal esta apresentada na Figura 7.

Para observação dos 3 tempos dentro do experimento com as placas destinadas para o estímulo com palmitato, não foi observado nenhuma variação estatística significativa, com o teste de Friedman ($p = 0,11$).

Quanto a cinética, comparando 2 tempos em relação ao T0, pelo teste de Wilcoxon, não foram observadas relevâncias estatísticas quanto comparados T0 e T1 ($p = 0,5$) e T0 com T2 ($p = 0,29$).

Figura 7: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo com estímulo de palmitato de sódio, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) em minutos.



Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

Com relação às comparações entre os 2 grupos (basal e palmitato), demonstrados na Figura 8, não foi observado alteração das medianas quanto comparados T0 basal com mediana 0 (0 – 22,12) e T0 palmitato 0 (0 – 42,6) com $p = 1$ (Figura 8A).

Comparando T1 basal com T1 palmitato, também não houve variação da mediana, onde não se tem uma diferença estatística significativa ($p = 0,93$), quando comparadas as duas situações e demonstrados na Figura 8B.

Em T2 basal e T2 palmitato observa-se a diferença onde o estímulo com mediana 0,4 (0 – 218) apresentou uma mediana maior do que a do basal de 0 (0 – 141,4), sendo essa diferença estatisticamente significativa com $p = 0,04$, conforme demonstrado na Figura 8C.

Figura 8: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo para os testes de estímulo com palmitato de sódio, comparando os tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos entre condição basal e estímulo.

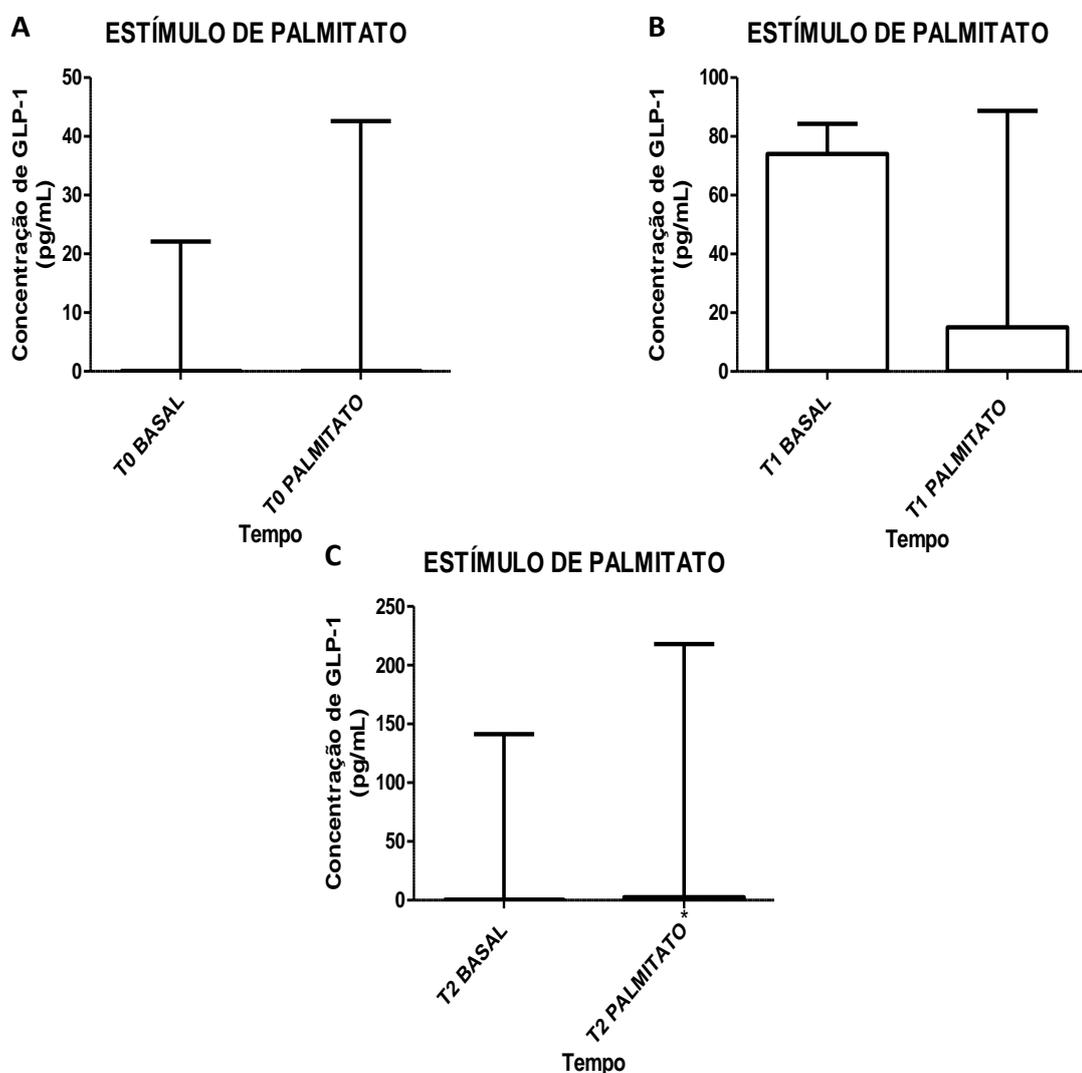


Figura 8A: Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T0 basal e T0 após o estímulo de palmitato de sódio ($p = 1,0$). **Figura 8B** Gráfico representando a concentração de GLP-1

(pg/mL) comparando T1 basal e T1 após o estímulo de palmitato de sódio ($p = 0,93$). **Figura 8C:** Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T2 basal e T2 após o estímulo de palmitato de sódio ($*p = 0,04$).

Dados obtidos pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

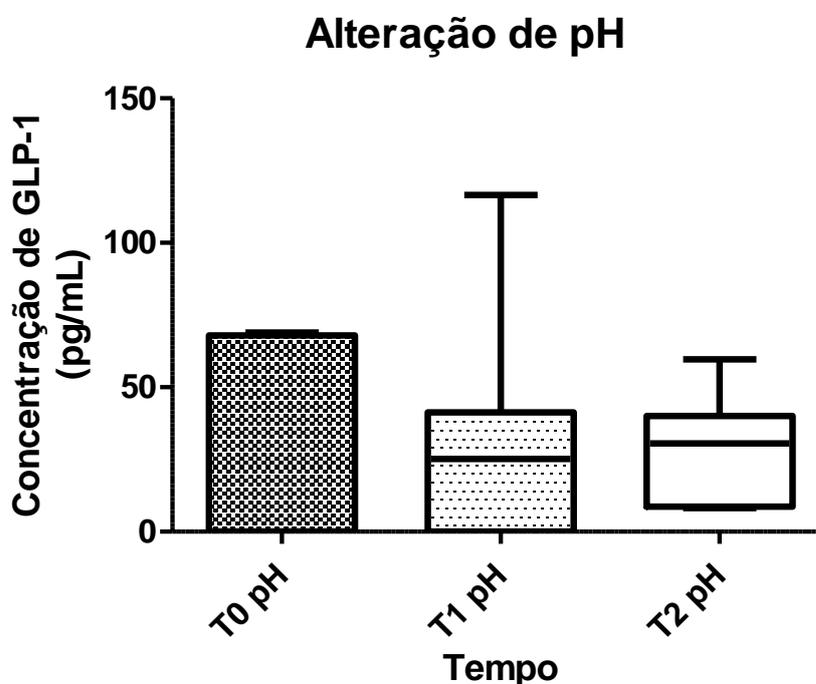
Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

6.1.3 Resultados da alteração de pH

Os resultados obtidos da concentração de GLP-1 (pg/mL) relacionados com os tempos (minutos) após a adição do meio com pH ajustado para 4,8 (duodenal) estão demonstrados na Figura 9.

Observando a concentração do hormônio nos 3 tempos, realizando a análise das 3 mensurações, não é observada nenhuma diferença estatística entre T0 que apresenta mediana 0,1 (0 – 68,9), T1 com 25,2 (0 – 116,6) e T2 com mediana 30,5 (8,2 – 59,7). O valor de p nessa análise é de 0,76.

Figura 9: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo com alteração de pH, nos tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) em minutos.



Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

Na comparação dos tempos entre basal e alteração do pH, observa-se uma diferença maior nas concentrações de GLP-1, com a mudança de pH, representados na Figura 10.

Nos tempos T0 basal e T0 pH, é averiguado uma concentração um pouco maior de GLP-1 na condição alterada com mediana de 0,1 (0-68,9) para o pH alterado e 0 (0 - 22,12) para o basal. Nesta comparação não foi observada diferença estatística significativa com valor de $p = 0,06$ (Figura 10A).

Na comparação dos intervalos T1 basal e T1 pH, observa-se também uma concentração maior do hormônio na condição experimental de pH modificado, com mediana de 0 (0 – 84,3) para o basal e 25,2 (0 – 116,6) para o pH alterado. Não foi observado significância estatística nesta análise, com $p = 0,33$ (Figura 10B).

Em T2 basal e T2 pH, foi observado que a mediana de T2 experimental, com valor de 30,5 (8,2 – 59,7) é significativamente maior que T2 basal, que apresenta mediana de 0 (0 – 141,4) com $p = 0,02$. A comparação pode ser observada na Figura 10C.

Figura 10: Concentração de GLP-1 em pg/mL expressa em mediana, mínimo e máximo para os testes de alteração do pH, comparando os tempos de 15 (T0), 30 (T1), e 60 (T2) minutos entre condição basal e alteração.

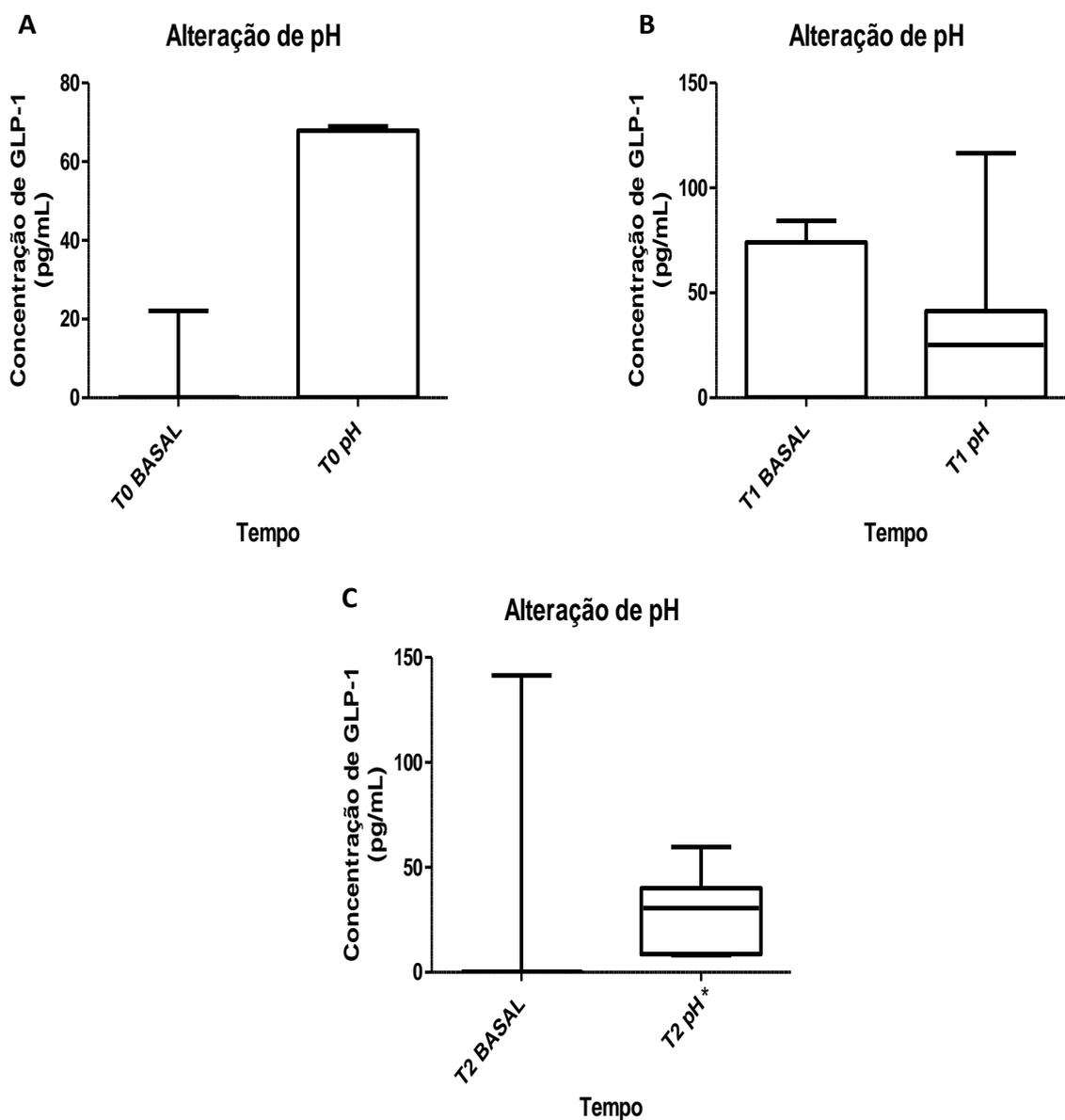


Figura 10A: Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T0 basal e T0 após a alteração de pH ($p = 0,06$). **Figura 10B:** Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T1 basal e T1 após a alteração do pH ($p = 0,33$). **Figura 10C:** Gráfico representando a concentração de GLP-1 (pg/mL) comparando T2 basal e T2 após alteração do pH ($*p = 0.02$). Dados obtidos pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

6.2 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA DESIDROGENASE LÁCTICA

A quantificação do DHL foi realizada no pré estímulo e pós estímulo, onde no primeiro momento, não foi possível a detecção pelo método utilizado, pois a concentração da enzima no sobrenadante das células estava menor que 7 U/L, considerado o limite inferior da técnica de quantificação. No momento pós estímulo, foi realizada a comparação entre as condições de pH 7,2 e 4,8, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de mediana, mínimo, máximo e significância da dosagem de DHL após estímulos.

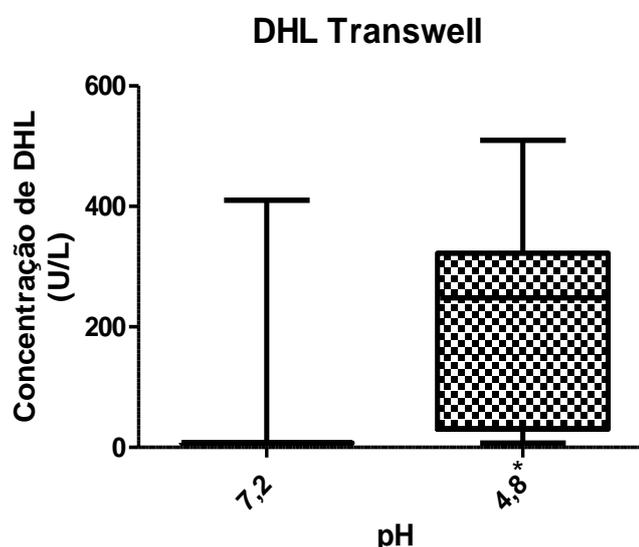
Identificação	pH		Valor de p
	7,2	4,8	
TR	7 (7-410)	248,2 (7-510)	0,019*

*Valores de p significativos quando $p < 0,05$

Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017).

Foi observado uma diferença significativa da DHL na comparação entre o pH 7,2 com mediana 7 U/L (7-410) e 4,8 de mediana 248,2 U/L (7-510) com $p = 0,019$ (Figura 11).

Figura 11: Gráficos representando medianas, mínimo e máximo de DHL (U/L) total comparando as duas situações de pH.



Fonte: Dados obtidos pelo autor (2017). (* $p=0,019$).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Atualmente a busca por tratamentos para o DMT2 vem evoluindo, e condições que aumentam a secreção fisiológica ou mimetizam as incretinas vem surgindo com um grande potencial terapêutico (REIMANN et al., 2008).

O estudo das células L enteroendócrinas localizadas no epitélio intestinal vem sendo visado por sua função como reguladores da resposta pós-prandial aos nutrientes, estimulando assim o GLP-1, com o intuito de melhorar a sensibilidade à insulina (GREINER; BÄCKHED, 2016).

Em nosso estudo foram sugeridas algumas situações, *in vitro*, que poderiam aumentar a secreção fisiológica do GLP-1 com o intuito de ajudar nas opções terapêuticas.

7.1 ESTÍMULO DE GLUTAMINA

Analisando os estímulos com glutamina, o presente estudo não relatou diferenças significativas comparando os tempos basal e de estímulos. Mesmo quando foram comparados os tempos, não se observou diferenças significativas.

Nossos resultados não corroboram o trabalho de Reimann *et al.*, em 2004, que demonstraram que células Glutag (células derivadas de tumor de cólon de rato), quando cultivadas com 10 mM de glutamina, apresentaram um aumento significativo na secreção de GLP-1, após duas horas de incubação. Em nosso estudo o tempo máximo foi de uma hora, e não foram observadas diferenças estatísticas quando comparados entre os grupos basal e experimento e nem quando foi realizada a análise dos três tempos de glutamina. Devem ser relevadas as diferenças entre os estudos, como as linhagens celulares diferentes, além da medida em tempos diferentes.

O mesmo argumento se aplica quando se compara nosso trabalho com o de Tolhurst *et al.*, em 2011, que suplementaram culturas primárias de tecidos intestinais de ratos com diferentes concentrações de glutamina, e após duas horas de incubação, demonstraram que a quantidade de GLP-1 foi se elevando a medida que se aumentava as concentrações de glutamina.

Rafferty *et al.*, 2011, demonstraram que células STC-1 (células tumorais neuroendócrinas intestinais de camundongos), expostas à uma condição de glicose acrescida de glutamina (1g/kg), produzem uma quantidade significativa de GLP-1,

enquanto comparada com testes 'in vivo', não se é observada esse aumento. Os dados daquele estudo não corroboram com os achados do nosso estudo, podendo-se levar em conta a diferença das linhagens celulares utilizados, sendo a do estudo comparado uma linhagem animal. Além da forma de estímulo diferente, uma vez que, Rafferty, utilizou uma mistura de glutamina com glicose, e em nosso estudo foi utilizado apenas a adição de glutamina.

Outro estudo que retrata a secreção de incretinas in vitro, foi realizado por Joshi; Tough e Cox, em 2013, onde os autores retiraram diferentes regiões da mucosa intestinal de camundongos, e adicionaram glutamina na concentração de 1 mM e concluíram que a glutamina estimula a liberação de GLP-1 endógena a partir de células L da mucosa que resultam em respostas epiteliais mediadas pelo receptor GLP-1.

A comparação entre o estudo de Joshi; Tough e Cox, e a presente análise, não podem ser fidedignas, pois no estudo citado, foi utilizado tecidos animais expostos à glutamina, e em nosso estudo foram empregadas células humanas submetidas a uma concentração diferente de glutamina.

Quando se exporta as comparações para experimentos in vivo, observa-se que os resultados no presente trabalho não corroboram com os de Joo *et al.*, (2015), onde os pesquisadores administraram dieta composta por glutamina, fibras e oligossacarídeos, para 20 participantes saudáveis (10 homens e 10 mulheres), e obtiveram como resultados uma alta secreção de GLP-1 após 30 e 60 minutos após a administração da dieta.

Outro estudo avaliando a administração fisiológica de glutamina, foi o de Greenfield *et al.*, 2009, onde 24 participantes divididos em obesos diabéticos, obesos não diabéticos e indivíduos saudáveis magros, receberam uma carga oral de glutamina, e foi mensurado o GLP-1 com 60 minutos após a administração. Observou-se que a glutamina aumentou a concentração da incretina em todos os indivíduos.

As situações descritas acima não podem ser comparadas com o presente estudo, pois a transição entre as condições in vivo e in vitro não podem ser fielmente comparadas. O que pode-se questionar são as situações que existem no organismo como um todo, que levam à secreção das incretinas, quando é administrado a glutamina e como essas condições não são detectáveis in vitro nas células HCT-8 que em teoria são encontradas nas regiões do íleo responsáveis pela produção e secreção do GLP-1.

7.2 ESTIMULO DE PALMITATO DE SÓDIO

Com o estímulo de palmitato de sódio, foi observado que as concentrações de GLP-1, uma elevação da mediana quando são comparados os tempos T0, T1 e T2, sem significância estatística.

Os resultados do presente estudo não são compatíveis com o trabalho de Vasu *et al.*, que em 2015 publicaram que células Glutag expostas por 8 horas ao palmitato, diminuem significativamente a secreção de GLP-1, mas aumenta a secreção do glucagon em linhagem de células TC1 (células pancreáticas de camundongos).

Quando foram comparados os resultados dos tempos entre o basal e estímulo com palmitato, foram observados que a concentração de GLP-1 é significativamente maior em T2 (60 minutos) com estímulo.

Esses achados não corroboram com os resultados apresentados por Gil-Lozano *et al.*, em 2016, onde foi demonstrado que ocorre uma diminuição significativa de GLP-1, quando as células Glutag são incubadas com 5 mM palmitato, por duas horas, sugerindo que o composto tem influência na biossíntese da incretina.

Também podem ser vistos no trabalho de Hayashi e colaboradores em 2014, que demonstraram uma diminuição do GLP-1 em condições suplementadas com palmitato das células Glutag após duas horas de incubação.

Os dois estudos supracitados, não podem ser fidedignamente comparados com nosso trabalho, uma vez que as células utilizadas, os tempos de incubação, coletas e concentrações são diferentes.

Abrangendo o contexto, visando que uma das funções do GLP-1 é a resposta insulínica, em 2009 Peyot *et al.* demonstraram que culturas de células pancreáticas de camundongos, quando suplementadas com glicose, palmitato e GLP-1, não demonstraram aumento da secreção de insulina.

Também objetivando o estudo da ação insulínica, Kang *et al.*, em 2013 mostraram que a exposição prolongada de, células secretoras de insulina e ilhotas de camundongos isoladas, a níveis elevados do palmitato de ácidos graxos leva à diminuição da expressão de receptores de GLP-1, levando à diminuição da potencialização de incretina na secreção de insulina estimulada pela glicose

Obviamente são trabalhos que tem um objetivo diferente do nosso estudo, pois visam estudar o efeito do GLP-1 na resposta insulínica, mas demonstra que estímulos de palmitato em culturas de células diferentes da linhagem utilizada (HCT-8)

geralmente não apresentam aumento das incretinas, podendo se tornar, em concentração maior e com um tempo prolongado, tóxicas para as células.

7.3 ALTERAÇÃO DE pH

O presente estudo houve uma diferença quando comparados as variações de pH alternando entre o pH 7,2 considerado fisiológico, e 4,8 considerado o pH do duodeno (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Exportando a ideia para um conceito mais abrangente, Sweeney e Morton em 2014, descreveram a suposição que as alterações dos ácidos biliares na região ileal causada pela cirurgia metabólica com a técnica de Y de Roux (técnica onde ocorre uma interposição ileal entre a região gástrica e a região jejunal) poderiam aumentar a secreção do GLP-1.

Trabelsi *et al.*, 2015, descreveram que o TGR5, um receptor acoplado a proteína G, mostrou promover a secreção de GLP-1 em resposta a ácidos biliares por células L enteroendócrinas intestinais.

Akiba e Kaunitz em 2011, também observaram que a acidificação do duodeno reflete na secreção de GLP-1. Ebert; Illmer e Creutzfeldt em 1979, obtiveram resultados após a infusão intra duodenal de ácido clorídrico 0,05-0,5 N aumenta os níveis séricos de GIP em ratos.

Takeuti *et al.* em 2014 demonstraram que pacientes submetidos à cirurgia de exclusão duodeno jejunal com interposição ileal sem gastrectomia, onde as células ileais são transferidas para próximo do estômago e conseqüentemente são expostas ao pH ácido, apresentavam GLP-1 elevado na condição de jejum, sem nenhum tipo de estímulo.

Comparando com o estudo realizado em nosso trabalho, a secreção do hormônio, quando é feita a análise da cinética comparando os tempos, não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Quando são comparados os tempos com o basal, T2 se apresentou maior estatisticamente significativo. Salientando que as semelhanças *in vitro* e em *in vivo*, não podem ser comparadas fidedignamente.

Um outro ponto que pode ser abordado na diferença da concentração do GLP-1 nas diferenças dos pHs, pode ser a adição do inibidor da enzima DPP4 (degradadora do hormônio) ao meio de cultura, uma vez que o pH ótimo para a atividade da enzima é 7,2 (DAVY *et al.*, 2000). Partindo deste raciocínio, pode-se sugerir que a enzima na condição de pH 4,8 não conseguiu exercer sua característica principal, indicando

assim uma elevação do peptídeo. Como a secreção dos metabólitos da célula HCT-8 é apical e basolateral (LIEVIN-LE MOAL; SERVIN, 2013), pode explicar a queda da concentração de GLP-1 no momento T2.

7.4 VIABILIDADE CELULAR

Quanto a quantificação da DHL, o que pode ser utilizado como um marcador de viabilidade celular, a ausência da atividade da enzima no momento pré estímulo indica que as células estavam viáveis para o experimento.

Quando são comparados os pós estímulos nas condições de pH 7,2 e 4,8, pode se notar uma diferença da enzima quando ocorre a acidificação do pH, onde na condição de 4,8 é observado um valor mais alto que a outra condição, o que sugere que essa condição mais ácida pode ser tóxica a ponto de causar morte celular.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode se sugerir que a alteração do pH assim como o estímulo com palmitato influencia na secreção de GLP-1, nas células HCT-8, observando-se uma concentração maior quando é comparado com o basal.

O estímulo da glutamina, na concentração utilizada no trabalho, não se mostrou um potencializador da secreção do hormônio.

Mais estudos devem ser realizados para que sejam comprovadas as teorias.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, F. M.; SICHIERI, R. Associação do índice de massa corporal e da relação cintura/quadril com hospitalizações em adultos do Município do Rio de Janeiro, RJ. **Rev Bras Epidemiol**, v. 5, n. 2, p. 153–163, 2002.
- AKIBA, Y.; KAUNITZ, J. D. Duodenal chemosensing: Master control for epigastric sensation? **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 26, n. 1, p. 6–7, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. SUPPL.1, p. 81–90, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical care in diabetes - 2017. **The Journal of Clinical and Applied Research and Education**, v. 40, n. January, p. 1–142, 2017.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; AARON W MICHELS, M. Type 1 diabetes. **Clinical chemistry**, v. 383, n. 9911, p. 69–82, 2014.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins : GLP-1 and GIP. p. 2131–2157, 2007.
- BALDUCCI, S. et al. Physical exercise as therapy for type 2 diabetes mellitus. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 30, n. 1, p. 13–23, 2014.
- BAST, A. et al. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 45, n. 6, p. 867–876, 2002.
- BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1293–1300, 2010.
- BUDIN, S. B. et al. The effects of palm oil tocotrienol-rich fraction supplementation on biochemical parameters, oxidative stress and the vascular wall of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 64, n. 3, p. 235–44, 2009.
- CAHILL, F. et al. The association of serum total peptide YY (PYY) with obesity and body fat measures in the coding study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- CARVALHO, E.; RABELO, J. Identificação, prevenção e tratamento dos fatores de riscos associados à síndrome metabólica em pacientes atendidos no programa integrado de atividade física, esporte e lazer para todos os servidores da ufv campus florestal: estudo piloto – piafel-ep. ... **Revista Digital FAPAM, Pará de Minas**, v. 1, n. 1, p. 355–366, 2009.
- CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 5, p. 816–823, 2004.

CHANDARANA, K. et al. Diet and gastrointestinal bypass-induced weight loss: The roles of ghrelin and peptide YY. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 810–818, 2011.

CLARKE, P. M. et al. Event rates, hospital utilization, and costs associated with major complications of diabetes: A multicountry comparative analysis. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 2, 2010.

CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: Aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 392–397, 2009.

D'ADAMO, E.; CAPRIO, S. Type 2 Diabetes in Youth: Epidemiology and Pathophysiology. **Diabetes Care**, v. 34, n. Supplement 2, p. S161–S165, 2011.

DAFOULAS, G. E. et al. Type 1 diabetes mellitus and risk of incident epilepsy: a population-based, open-cohort study. **Diabetologia**, v. 60, n. 2, p. 258–261, 2017.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.

DAVY, A. et al. Purification and characterization of barley dipeptidyl peptidase IV. **Plant physiology**, v. 122, n. 2, p. 425–32, 2000.

DEACON, C. F. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? **Regulatory Peptides**, v. 128, n. 2, p. 117–124, 2005.

DEY, L.; ATTELE, A. S.; YUAN, C.-S. Alternative therapies for type 2 diabetes. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 7, n. 1, p. 45–58, 2002.

DIABETES PREVENTION TRIAL--TYPE 1 DIABETES STUDY GROUP. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 346, n. 22, p. 1685–1691, 2002.

DIEPVENS, K. et al. Long-term effects of consumption of a novel fat emulsion in relation to body-weight management. **International Journal of Obesity**, v. 31, p. 942–949, 2007.

EBERT, R.; ILLMER, K.; CREUTZFELDT, W. Release of Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) by Intraduodenal Acidification in Rats and Humans and Abolishment of the Incretin Effect of Acid by GIP-Antiserum in Rats. **Gastroenterology**, v. 76, n. 3, p. 515–523, 1979.

GELONEZE, B.; PAREJA, J. C. Cirurgia bariátrica cura a síndrome metabólica? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 400–407, 2006.

GIL-LOZANO, M. et al. High-fat diet and palmitate alter the rhythmic secretion of glucagon-like peptide-1 by the rodent L-cell. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 586–599, 2016.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 175, n. 2, p. 165–70, 2006.

GREENFIELD, J. R. et al. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1 , glucagon , and insulin concentrations in lean , obese , and type 2 diabetic subjects 1 – 4. **The American journal of clinical nutrition**, v. 1, p. 106–113, 2009.

GREINER, T. U.; BÄCKHED, F. Microbial regulation of GLP-1 and L-cell biology. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 9, p. 753–758, 2016.

GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Signalling in the gut endocrine axis. **Physiology and Behavior**, v. 176, p. 183–188, 2017.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16–26, 2002.

GUNAWARDENE, A. R.; CORFE, B. M.; STATON, C. A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92, n. 4, p. 219–231, 2011.

HANSOTIA, T.; DRUCKER, D. J. GIP and GLP-1 as incretin hormones: Lessons from single and double incretin receptor knockout mice. **Regulatory Peptides**, v. 128, n. 2, p. 125–134, 2005.

HAYASHI, H. et al. Glucagon-like peptide-1 production in the GLUTag cell line is impaired by free fatty acids via endoplasmic reticulum stress. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 6, p. 800–811, 2014.

INZUCCHI, S. E. et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach: Update to a position statement of the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 140–149, 2015.

JOHANSSON, I. et al. Prognostic Implications of Type 2 Diabetes Mellitus in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 13, p. 1404–1416, 2016.

JOO, E. et al. Enteral supplementation with glutamine, fiber, and oligosaccharide modulates incretin and glucagon-like peptide-2 secretion. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 6, n. 3, p. 302–308, 2015.

JOSHI, S.; TOUGH, I. R.; COX, H. M. Endogenous PYY and GLP-1 mediate l - glutamine responses in intestinal mucosa. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 5, p. 1092–1101, 2013.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068–1083, 2014.

- KANG, Z. F. et al. Pharmacological reduction of NEFA restores the efficacy of incretin-based therapies through GLP-1 receptor signalling in the beta cell in mouse models of diabetes. **Diabetologia**, v. 56, n. 2, p. 423–433, 2013.
- KARRA, E.; CHANDARANA, K.; BATTERHAM, R. L. The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. **The Journal of physiology**, v. 587, n. 1, p. 19–25, 2009.
- KASHYAP, S. R. et al. Bariatric surgery for type 2 diabetes: Weighing the impact for obese patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 77, n. 7, p. 468–476, 2010.
- KASSI, E. et al. Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 48, 2011.
- KERNER, W.; BRÜCKEL, J. Classification And Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 122, n. 7, p. 2–4, 2010.
- KOIVUSALO, S. B. et al. Gestational Diabetes Mellitus Can Be Prevented by Lifestyle Intervention: The Finnish Gestational Diabetes Prevention Study (RADIEL): A Randomized Controlled Trial. **Diabetes Care**, v. 39, n. 1, p. 24–30, 2016.
- LEY, S. H. et al. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. **Lancet (London, England)**, v. 383, n. 9933, p. 1999–2007, 2014.
- LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 380–439, 2013.
- LIM, G. E. et al. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 580–591, 2009.
- LOTTENBERG, S. A.; GLEZER, A.; TURATTI, L. A. Metabolic syndrome: identifying the risk factors. **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S204-8, 2007.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375–399, 2002.
- MEEK, C. L. et al. The effect of encapsulated glutamine on gut peptide secretion in human volunteers. **Peptides**, v. 77, p. 38–46, 2016.
- MERCURI, N.; ARRECHEA, V. Diabetes mellitus e atividade física Atividade física e diabetes mellitus. **Diabetes Clínica**, v. 5, n. 2, p. 347–349, 2001.
- MINGRONE, G. et al. Bariatric–metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre,. **The Lancet**, v. 386, 2015.

NAUCK, M. Incretin therapies: Highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 203–216, 2016.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169–181, 2011.

OLIVÁN, B. et al. Effect of Weight Loss by Diet or Gastric Bypass Surgery on Peptide YY3–36 Levels. v. 249, n. 6, p. 948–953, 2009.

OLIVEIRA, J. E. P. DE; MILECH, A. Diabetes Mellitus Clínica, Diagnóstico Tratamento Multidisciplinar. In: **Diabetes Mellitus Clínica, Diagnóstico Tratamento Multidisciplinar**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 77–98.

OYAMA, J.-I.; HIGASHI, Y.; NODE, K. Do incretins improve endothelial function? **Cardiovascular diabetology**, v. 13, p. 21, 2014.

PEIXOTO, G. V.; SILVA, R. M. DA. Estratégias Educativas ao Portador de Diabetes Mellitus: Revisão Sistemática. **Artigo**, v. 13, n. 1, p. 74–81, 2011.

PEREIRA-LANCHA, L. O.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; LANCHA, A. H. Obesity: Considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 5, p. 75–87, 2012.

PEYOT, M. L. et al. Glucagon-like peptide-1 induced signaling and insulin secretion do not drive fuel and energy metabolism in primary rodent pancreatic β -cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, 2009.

PHAM, H. et al. A bitter pill for type 2 diabetes? The activation of bitter taste receptor TAS2R38 can stimulate GLP-1 release from enteroendocrine L-cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 475, n. 3, p. 295–300, 2016.

RAFFERTY, E. P. et al. In vitro and in vivo effects of natural putative secretagogues of Glucagon-like peptide-1 (GLP-1). **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 3, p. 615–621, 2011.

RAJAGOPALAN, K. N.; DEBERARDINIS, R. J. Role of Glutamine in Cancer – Therapeutic and Imaging Implications. **J Nucl Med**, v. 52, n. 7, p. 1005–1008, 2012.

RAMRACHEYA, R. D. et al. PYY-Dependent Restoration of Impaired Insulin and Glucagon Secretion in Type 2 Diabetes following Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. **Cell Reports**, v. 15, n. 5, p. 944–950, 2016.

REIMANN, F. et al. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. **Diabetologia**, v. 47, n. 9, p. 1592–1601, 2004.

REIMANN, F. et al. Glucose Sensing in L Cells: A Primary Cell Study. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 532–539, 2008.

RUBINO, F. et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. **Annals of surgery**, v. 244, n. 5, p. 741–9, 2006.

SALINARI, S. et al. Duodenal-jejunal bypass and jejunectomy improve insulin sensitivity in goto-kakizaki diabetic rats without changes in incretins or insulin secretion. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 1069–1078, 2014.

SEINO, Y.; KUWATA, H.; YABE, D. Incretin-based drugs for type 2 diabetes: Focus on East Asian perspectives. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. April, p. 102–109, 2016.

SELPH, S. et al. Screening for type 2 diabetes mellitus: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of internal medicine**, v. 162, n. 11, p. 765–76, 2015.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 4–14, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l.: s.n.]. v. 5

STERNINI, C.; ANSELMINI, L.; ROZENGURT, E. Enteroendocrine cells: a site of “taste” in gastrointestinal chemosensing. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 15, n. 1, p. 73–78, 2008.

SWEENEY, T. E.; MORTON, J. M. HHS Public Access. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 28, n. 4, p. 727–740, 2014.

TAKEUTI, T. D. et al. Effect of the ingestion of the palm oil and glutamine in serum levels of glp-1 , ppy and glycemia in diabetes. **ABCD. Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 27, n. 1, p. 51–55, 2014.

TANWEER, D. S. et al. Type-2 Diabetes Mellitus; Frequency of Microalbuminuria in Patients Having Diabetic Retinopathy in Nishter Hospital Multan. **the Professional Medical Journal**, v. 23, n. 11, p. 1390–1394, 2016.

TASYUREK, H. M. et al. Incretins: Their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus Hale. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 30, n. 5, p. 354–371, 2014.

TOLHURST, G. et al. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca²⁺ and cAMP. **Endocrinology**, v. 152, n. 2, p. 405–413, 2011.

TRABELSI, M.-S. et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1

production by enteroendocrine L cells. **Nature Communications**, v. 6, n. May, p. 7629, 2015.

VASU, S. et al. Differential molecular and cellular responses of GLP-1 secreting L-cells and pancreatic alpha cells to glucotoxicity and lipotoxicity. **Experimental Cell Research**, v. 336, n. 1, p. 100–108, 2015.

WYNNE, K.; BLOOM, S. R. The role of oxyntomodulin and peptide tyrosine-tyrosine (PYY) in appetite control. **Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism**, v. 2, n. 11, p. 612–20, 2006.

YABE, D.; SEINO, Y. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their actions in insulin secretion and ?? cell preservation. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 107, n. 2, p. 248–256, 2011.

YI, B.; HUANG, G.; ZHOU, Z. Different role of zinc transporter 8 between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 4, p. 459–465, 2016.

ZHANG, J. S. et al. Tocotrienol-Rich Fraction (TRF) suppresses the growth of human colon cancer xenografts in Balb/C nude mice by the Wnt pathway. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

ZIEGLER, F. et al. Effects of l-glutamine supplementation alone or with antioxidants on hydrogen peroxide-induced injury in human intestinal epithelial cells. **e-SPEN**, v. 6, n. 4, p. e211–e216, 2011.

ANEXO

ANEXO

Declaração de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – Uberaba (MG)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
 Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar – Bairro Nossa Senhora da Abadia
 38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854
 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À ALTERAÇÃO DE PH, ÓLEO DE PALMA, GLUTAMINA E ÓLEO DE COCO EM CULTURA DE CÉLULAS L INTESTINAIS.
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: EDUARDO CREMA
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM
DATA DE ENTRADA NO CEP/UFTM: 29/11/2012
PROTOCOLO CEP/UFTM: 2526

PARECER

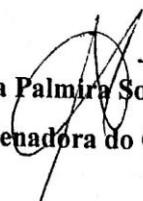
De acordo com as disposições da Resolução CNS 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM considera o protocolo de pesquisa **aprovado**, na forma (redação e metodologia) como foi apresentado ao Comitê.

Conforme a Resolução 196/96, o pesquisador responsável pelo protocolo deverá manter sob sua guarda, pelo prazo de no mínimo cinco anos, toda a documentação referente ao protocolo (formulário do CEP, anexos, relatórios e/ou Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLE assinados, quando for o caso) para atendimento ao CEP e/ou à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Toda e qualquer alteração a ser realizada no protocolo deverá ser encaminhada ao CEP, para análise e aprovação.

O relatório anual ou final deverá ser encaminhado um ano após o início da realização do projeto.

Uberaba, 28 de agosto de 2013.


Prof.^a Ana Palmira Soares dos Santos
Coordenadora do CEP/UFTM