

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Expressão de *GLP-1* (Peptídeo semelhante ao Glucagon 1) em ratos no estado de jejum e alimentado

Gabriela Cristina de Paula

GABRIELA CRISTINA DE PAULA

Expressão de GLP-1 (Peptídeo semelhante ao Glucagon 1) em ratos no estado de jejum e alimentado

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Lucielli Savegnago.

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P324e

Paula, Gabriela Cristina de

Expressão de GLP-1 (Peptídeo semelhante ao Glucagon 1) em ratos no estado de jejum e alimentado / Gabriela Cristina de Paula. – 48f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Lucielli Savegnago ; co-orientador Roberto Ferreira Artoni.

1.Biotecnologia. 2.Diabetes Mellitus 2. 3.Fatores insulíntrópicos. 5.GLP-1. I.Savegnago, Lucielli. II.Artoni, Roberto Ferreira. III.Título.

CDD: 616.462

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Chaves, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Sibeles Borsuk, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Lucielli Savegnago, Universidade Federal de Pelotas (orientadora).

Dedicatória

Aos meus pais, amor incondicional, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos, e acima de tudo acreditaram no meu potencial.

Aos meus irmãos, grandes companheiros e amigos, que me deram força e torceram pelo meu sucesso em toda essa jornada.

Aos meus avós, que com sua sabedoria transmitiram os melhores ensinamentos e lições de vida.

A todos os acometidos pela diabetes tipo 2. Que toda minha dedicação e esforço possa vir a servir de alguma forma à melhoria de sua qualidade de vida.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, que me abriu as portas para um novo mundo, rodeado de conhecimento, e a todos os professores do curso de graduação em Biotecnologia, pela qualidade de seus ensinamentos que nos capacitou chegarmos aos futuros profissionais que somos hoje.

À professora Sibeles, pela oportunidade do meu primeiro estágio, pela introdução à ciência e primeiras instruções e pela motivação para seguir o melhor caminho.

Ao meu orientador de estágio professor Roberto Artoni, pela oportunidade de realização de meu estágio final, por toda experiência passada, além da disponibilidade e atenção direcionadas a mim.

À minha orientadora acadêmica Lucielli Savegnago, por me auxiliar durante toda essa etapa, pela sua total competência e didática ao me orientar.

Ao Luiz Renato, pela sua prestatividade, disponibilidade de seu tempo e paciência ao me ajudar com a extração das amostras nos animais.

À professora Viviane Nogaroto, pelo auxílio e ensinamento na execução das técnicas laboratoriais e análises estatísticas e pelo tempo disposto a mim nas últimas semanas de meu estágio.

À minha amiga Natália Morelato, por todos os anos de amizade e força nos momentos em que mais precisei. A quem deixo o meu carinho e a minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Fernando e Pedro, pelo carinho dedicado a mim, pela amizade e companheirismo e por sempre estarem por perto, mesmo morando longe, quando precisei de um ombro amigo.

Aos meus pais, Sérgio e Tânia, pelo amor sem medidas, por toda a dedicação e preocupação com a minha educação, por tudo o que sou hoje.

Meu Muito Obrigada

*"Do sofrimento emergiram as almas mais fortes.
As personalidades mais sólidas são repletas de cicatrizes"*

(Khalil Gibran)

Resumo

DE PAULA, Gabriela Cristina. **Expressão de GLP-1 (Peptídeo semelhante ao Glucagon 1) em ratos no estado de jejum e alimentado**. 2013. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, e consequente intolerância à glicose, como resultado da resistência à insulina e ao esgotamento da atividade das células β pancreáticas. Fatores ambientais e genéticos estão envolvidos no desenvolvimento da doença, dentre eles o mal funcionamento das células β e a baixa expressão de GLP-1, principal responsável pela liberação de insulina na corrente sanguínea. Dessa forma, o objetivo do estudo visa compreender melhor os mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento da DM2. Para isso, foi analisado comparativamente a expressão gênica do hormônio GLP-1 (responsável pela liberação de insulina pós-prandial) em ratos no estado de jejum e após a ingestão de glicose. Deste modo, testes para a padronização do protocolo de extração de RNA total, com objetivo de alcançar alta qualidade foram realizados, bem como a realização de técnicas moleculares que auxiliaram no desenvolvimento do estudo. As análises de expressão gênica foram realizadas a partir de amostras de tecido coletadas do íleo distal de ratos, divididos entre os grupos no estado de “Jejum” e “Alimentado”. Pôde-se observar que no grupo Alimentado houve aumento significativo na expressão de *GLP-1* quando comparado ao grupo Jejum. Esses resultados denotam que, em não-diabéticos, ocorre um aumento da expressão de *GLP-1* no período pós-prandial, porém em pré-diabéticos os níveis de expressão desse hormônio se mantêm inalterados. Nesta condição, o paciente pode tomar medidas preventivas no que diz respeito ao desenvolvimento da doença. Através da metodologia empregada, pode-se concluir que a mesma se trata de um método eficiente no diagnóstico precoce da DM2, contribuindo, portanto, com o avanço nos estudos desta área.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus 2. Fatores insulíntrópicos. GLP-1.

Abstract

DE PAULA, Gabriela Cristina. **Expression of GLP-1 (glucagon-like peptide 1) in in rats in the fasting and fed state**. 2013. 49p. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Type 2 diabetes mellitus (TDM2) is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia and consequent glucose intolerance as a result of insulin resistance and the depletion of the activity of pancreatic β cells. Environmental and genetic factors are involved in the disease development, including dysfunction of β cells and low expression of *GLP-1*, primarily responsible for the release of insulin into the bloodstream. Therefore, the project carried out during this period aimed to better understand the genetic mechanisms involved in the development of type 2 diabetes mellitus. For it was comparatively analyzed the gene expression of the hormone GLP-1 (responsible for the release of postprandial insulin) in rats in fast state and after glucose ingestion. Thus, testing for protocol standardization of total RNA extraction, in order to achieve high quality were made, as well as the use of molecular techniques that worked on developing the study. Analyses of gene expression were performed from tissue samples collected from the distal ileum of rats divided between groups "Fast" and "Fed". It was observed in the fed group a significant increase in the expression of *GLP-1* when compared to the fasting group. These results denote that in normal people, increased expression of *GLP-1* in the postprandial period occurs, however, in pre-diabetics the expression levels of this hormone remain unchanged. Through the methodology, it can be concluded that it is an efficient method for early diagnosis of DM2, thus contributing to advancing the studies in this area.

Keywords: Type 2 Diabetes Mellitus. Insulinotropic factors. GLP-1.

Lista de Figuras

Figura 1: Estimativa de gastos com o tratamento de diabetes no Brasil nos anos 2010 e 2030.....	20
Figura 2: Eventos intracelulares que ocorrem após a ligação de GLP-1 ao seu receptor acoplado a proteína G específica.....	25
Figura 3: Gel de agarose 1,5 % contendo 4 amostras de RNA total do grupo Jejum e 4 amostras do grupo Alimentado, extraídas da porção do íleo distal dos ratos.....	33
Figura 4: Gel de agarose 1% da síntese de cDNA de ambos os grupos.....	34
Figura 5: Descrição dos parâmetros de amplificação e da curva de dissociação resultantes da análise por qRT-PCR.....	34
Figura 6: Análise comparativa da expressão de <i>GLP-1</i> nos grupos Jejum e Alimentado.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de países com os maiores números de casos estimados de diabetes tipo 2 nos anos 2000, 2010 e 2030.....	21
Tabela 2: Quantificação das amostras de RNA total.....	32

Lista de Abreviaturas e Siglas

α : Alfa.

β : Beta.

% : Valor em porcentagem.

mmol.L⁻¹: Milimol (0,001 mol) por litro.

®: Marca Registrada

[] : Concentração.

μ L: Microlitro.

ng: Nanograma.

nm: Nanômetro.

AD: Adaptação Digestiva.

AGL: Ácidos Graxos livres.

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico.

AN: Ácidos Nucleicos.

ADP: Adenosina difostato.

ATP: Adenosina trifosfato.

CAPN10: gene da calpaína 10.

DMG: Diabetes mellitus gestacional.

DM1: Diabetes mellitus tipo 1.

DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon 1.

IL6: Interleucina 6.

IMC: Índice de massa corporal.

°C: Grau Celsius.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

PKA: Proteína quinase A.

PTGO: Prova de tolerância à glicose oral.

RNA: Ácido ribonucleico.

TGI: Trato gastrintestinal.

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa.

UV: Ultravioleta.

x: Vezes.

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	09
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	12
1. <u>Introdução Geral</u>	16
2. <u>Revisão Bibliográfica</u>	17
2.1 Diabetes Mellitus	17
2.2 Classificação	18
2.3 Fatores de risco para DM2	19
2.4 Aspectos Epidemiológicos	20
2.5 Prevenção	22
2.5.1 Modificação Comportamental.....	22
2.5.2 Intervenção Farmacológica	23
2.5.3 Tratamento Cirúrgico.....	23
2.6 Influência do GLP-1 na secreção de insulina	24
2.7 Métodos de diagnóstico para DM2	26
2.8 qRT-PCR	27
3. <u>Objetivos do trabalho</u>	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. <u>Metodologia</u>	29
4.1 Padronização do Protocolo de extração de RNA	29
4.1.1 Protocolo 1.....	29
4.1.2 Protocolo 2.....	29
4.1.3 Protocolo 3.....	29

4.1.4 Protocolo 4.....	30
4.2 Animais e tratamento utilizados para o estudo.....	30
4.3 Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	31
4.4 Análise Estatística.....	33
5. <u>Resultados</u>.....	34
5.1 Protocolo padrão e extração do RNA total.....	34
5.2 Expressão Gênica.....	35
6. <u>Discussão</u>.....	38
7. <u>Conclusões e Perspectivas</u>.....	41
9. <u>Bibliografia</u>.....	42

1. Introdução Geral

Devido ao contato realizado com professores e à visita aos laboratórios da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) oportunizou-se a realização do estágio final nesta instituição junto ao grupo de pesquisa em Citogenética e Biologia Evolutiva. Durante este período, novos aprendizados foram obtidos, podendo-se trabalhar com algo até então não trabalhado, o que foi concedido a ampliação da experiência durante a etapa de graduação, gerando bases para a construção da monografia.

Dessa forma, a monografia apresentada neste trabalho é fruto do projeto de pesquisa participado, que visa compreender os mecanismos genéticos que possam estar envolvidos no desenvolvimento e progressão da diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Esta doença metabólica é causada pela intolerância à glicose, consequente da resistência à insulina (TURNER *et al.*, 1995). Fatores ambientais e genéticos estão envolvidos no seu desenvolvimento, sendo que o mal funcionamento das células β e a baixa expressão de *GLP-1* (peptídeo semelhante ao glucagon 1) tornam-se os principais aspectos que resultam na DM2. De forma específica, procurou-se analisar a expressão gênica de *GLP-1*, o qual se mostra ser altamente insulínico (RANGANATH *et al.*, 1996). Estudo este, importante aos indivíduos que ainda não possuem o quadro de DM2, mas que se enquadram no grupo de alto risco para o desenvolvimento da doença. Essa detecção pode ser vista como forma de diagnóstico precoce de DM2, visando a prevenção do desenvolvimento da doença para que os tratamentos específicos possam ser inicializados nesses pacientes.

Assim, para a realização desse trabalho de conclusão de curso, as orientações e treinamento do grupo em questão foram recebidos, capacitando a realização de diversas técnicas laboratoriais essenciais relacionadas à análise de expressão gênica.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus é descrita como uma desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas resultantes do defeito na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos (ALBERTI & ZIMMET, 1998). A doença está associada à morbidade e à mortalidade sendo responsável por complicações cardiovasculares, encefálicas, coronarianas, renais e vasculares periféricas (TOSCANO, 2004; SARWAR *et al.*, 2010). Estudos mostram que o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo doenças coronarianas e acidentes vasculares cerebrais, é aumentado de duas a quatro vezes em diabéticos, quando comparados com não-diabéticos da mesma idade (HAFFNER, 1998; MORRISH, 2001).

Seus sintomas iniciais são característicos, tais como sede, poliúria, visão turva e perda de peso, e suas complicações a longo prazo, incluem cegueira, nefropatia, que pode levar à insuficiência renal, neuropatia com risco de úlceras nos pés, amputação de membros e disfunção sexual. Entretanto, muitas vezes os sintomas iniciais estão ausentes, retardando o diagnóstico daqueles que possuem hiperglicemia de alto grau que possa acarretar em alterações patológicas e funcionais (CAPPUCCIO *et al.*, 2010).

Os processos patogênicos que estão envolvidos no desenvolvimento da diabetes incluem aqueles que destroem as células beta (células β) das Ilhotas de Langerhans, localizadas no pâncreas, com a consequente deficiência da secreção de insulina e outros que resultam da resistência à ação da insulina (OMS, 1999). O papel da disfunção mitocondrial, diminuição da regulação do eixo enteroinsular e estresse do retículo endoplasmático são atualmente os temas de intensa investigação por possuir um papel crucial na resposta celular da insulina (TRIPATHY

& CHAVEZ, 2010). Esses processos patogênicos estão envolvidos e são responsáveis pela correta classificação da doença.

2.2 Classificação

A classificação se deve aos critérios clínicos e aos tipos etiológicos da doença (KUZUYA, 1997). Entretanto, as pessoas que possuem diabetes mellitus, ou que estão desenvolvendo, podem ser categorizadas por estágios de acordo com as características clínicas, mesmo na ausência de informações sobre a etiologia subjacente. A classificação por tipos etiológicos é resultante de uma melhor compreensão das causas da diabetes mellitus, pois o processo da doença pode estar presente, mas pode não ter progredido ao ponto de causar hiperglicemia. A classificação etiológica reflete ao fato de que o defeito ou um processo que pode levar a diabetes podem ser identificados em qualquer fase do desenvolvimento da doença, mesmo na fase normoglicêmica (OMS, 1999). A doença pode ser dividida em 3 diferentes tipos: diabetes mellitus gestacional (DMG), tipo 1 (DM1), e tipo 2 (DM2) (ALBERTI & ZIMMET, 1998).

Durante a gravidez, muitas mulheres possuem glicose sérica elevada, o que caracteriza a DMG, sendo esses níveis normalizados após o parto. Isso ocorre devido a um bloqueio na secreção de insulina por hormônios da gravidez. Entretanto, mulheres com DMG possuem predisposição para um posterior desenvolvimento de DM2, bem como seus filhos (ADA, 2004).

A DM1 ou diabetes imunomediada é caracterizada pela insuficiente produção de insulina no pâncreas. Isso ocorre, pois as células da ilhota de Langerhans são acometidas por uma destruição autoimune, podendo anticorpos contra essas células ser encontrados no organismo. Essa classificação pode também ser chamada de diabetes insulino dependente devido ao fato da necessidade de administração

exógena de insulina diariamente por seus portadores, para que a glicose no sangue se mantenha em níveis normalizados (ALBERTI, 1998).

A intolerância à glicose, como resultado da resistência à insulina e ao esgotamento da atividade das células β pancreáticas, leva ao desenvolvimento da DM2, com conseqüente deficiência de insulina impactando músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Trata-se de uma desordem fenotípica e geneticamente heterogênea, subdividida nas formas precoce e tardia (TURNER, *et al.*, 1995), sendo esta última a mais comum. A forma precoce é determinada por indivíduos com idade abaixo dos 25 anos com herança autossômica dominante (FAJANS, 1989).

2.3 Fatores de risco para DM2

Em indivíduos com resistência à glicose, fatores genéticos e ambientais contribuem para a progressão da resistência à insulina e da DM2 (BADAWI *et al.*, 2010). Estudos em animais mostram que genes relacionados à forma precoce da doença estão localizados nos cromossomos 7, 12 e 20 (VAXILLAIRE *et al.*, 1995), e sugere-se, através de testes clínicos, que as mutações nesses genes afetam o padrão normal da secreção de insulina (BYRNE *et al.*, 1995). Na forma mais comum da doença, polimorfismos no gene da calpaína 10 (*CAPN10*), situados no cromossomo 2q, tem sido relacionados a uma maior predisposição a DM2 em diversas populações da América (HORIKAWA *et al.*, 2000; ROSAL *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010). A calpaína 10 é uma protease que coordena a ativação ou inibição de inúmeras proteínas envolvidas na sinalização intracelular, proliferação, diferenciação e nos mecanismos de secreção de insulina. Além do *CAPN10*, os genes *NIDDM1* (HANIS, *et al.*, 1996), *NEUROD1* (MALECKI *et al.*, 1999) também têm sido descritos como contribuintes ao desenvolvimento de DM2 em diferentes populações.

A obesidade, entretanto, é o principal fator de risco para essa doença, principalmente para aqueles que possuem maior deposição de gordura visceral, gordura essa que possui alto *turnover* metabólico, em que a atividade lipolítica aparece de forma expressiva e drena as concentrações de ácidos graxos livres (AGL) diretamente para o fígado através da veia portal (GOMES *et al.*, 2005). Os AGL a nível hepático, por sua vez, reduzem a liberação da insulina e aumentam a produção hepática de glicose, acarretando na alteração dos quadros de tolerância à glicose e glicemia de jejum alterada para a DM2 (LYRA *et al.*, 2006).

Na sua forma ativa, a obesidade está associada a uma inflamação crônica de baixo grau resultante em parte da ativação do sistema imune inato. Esta ativação leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 β (IL1 β) e interleucina-6 (IL6), que bloqueiam as principais cascatas anabólicas da sinalização da insulina e, assim, perturbam a homeostase da insulina e sua ação (BADAWI *et al.*, 2010).

2.4 Aspectos Epidemiológicos

Estima-se que, mundialmente, os custos gerados diretamente para o atendimento aos portadores de DM2 variam de 2,5% a 15% dos gastos nacionais em saúde, variando de acordo com a incidência de pacientes e a complexidade do tratamento disponível (OMS, 2002). No Brasil esses gastos chegam a 7 bilhões de dólares anualmente, e tendem ao aumento de 71% até 2030 (IDF, 2011), como representado na figura 1.

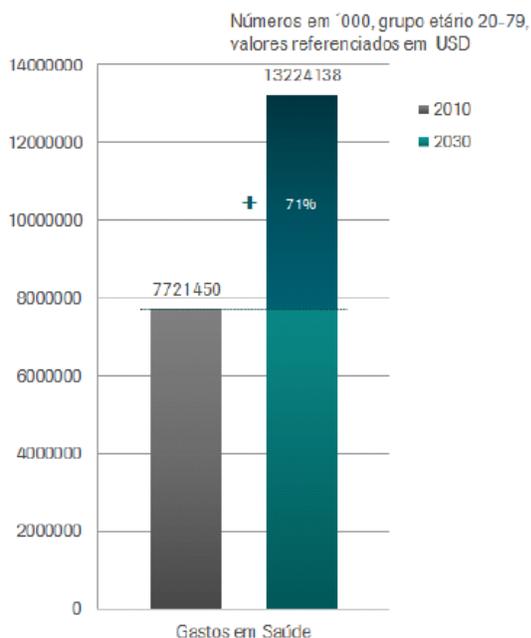


Figura 1: Estimativa de gastos com o tratamento de diabetes no Brasil nos anos de 2010 e 2030.

Fonte: IDF 2011

A prevalência de diabetes para pessoas cuja faixa etária encontra-se entre 20 e 79 anos em todo o mundo foi estimada em 2,8% em 2000, 6,4% em 2010 e 7,7% em 2030. O número total de pessoas com diabetes deverá crescer de 171 milhões em 2000 para 285 milhões em 2010 e 439 milhões em 2030 (WILD *et al.*, 2004; SHAW *et al.*, 2010). Estima-se que entre 2010 e 2030 haverá um aumento de 69% no número de adultos com diabetes nos países em desenvolvimento e de 20% nos países desenvolvidos (SHAW *et al.*, 2010), aumento esse, principalmente pela mudança no estilo de vida da população (REIS & VELHO, 2002), cuja dieta é mais rica em gordura e calorias e o sedentarismo encontra-se cada vez mais presente (NARAYAN, 2000).

Dados do Ministério da Saúde mostraram que no conjunto da população adulta das 27 capitais brasileiras estudadas, a frequência do diagnóstico médico prévio de DM2 foi de 5,2%, sendo maior em mulheres (5,6%) do que em homens (4,6%) (SESSO *et al.*, 2010).

Tabela 1: Lista de países com os maiores números de casos estimados de diabetes tipo 2 nos anos 2000, 2010 e 2030.

Ranking	2000		2010		2030	
	País	Número de pessoas com diabetes (milhões)	País	Número de pessoas com diabetes (milhões)	País	Número de pessoas com diabetes (milhões)
1	Índia	31,7	Índia	50,8	Índia	87
2	China	20,8	China	43,2	China	62,6
3	USA	17,7	USA	26,8	USA	36
4	Indonésia	8,4	Rússia	9,6	Paquistão	13,8
5	Japão	6,8	Brasil	7,6	Brasil	12,7
6	Paquistão	5,2	Alemanha	7,5	Indonésia	12
7	Rússia	4,6	Japão	7,1	México	11,9
8	Brasil	4,6	Paquistão	7,1	Bangladesh	10,4
9	Itália	4,3	Indonésia	7	Rússia	10,3
10	Bangladesh	3,2	México	6,8	Japão	8,6

Fonte: Wild et al, 2004; Shaw et al, 2010

Essa perspectiva desenfreada ocorre, pois os medicamentos atualmente utilizados possuem sucesso limitado no controle dos níveis de glicose no sangue, aparecendo, conseqüentemente, as complicações da doença (DOYLE & EGAN, 2005). Além disso, os defeitos na secreção da insulina e de sua ação ocorrem antes da patogênese de diabetes (WEYER *et al.*, 1999).

2.5 Prevenção

A ineficácia de tratamento e processo patológico silencioso da DM2 sugere que a redução da incidência de DM2 através de medidas preventivas, sobretudo aos indivíduos de alto risco, é a melhor maneira de reduzir seus impactos. Tais medidas têm como base a modificação comportamental, o uso de fármacos e o tratamento cirúrgico (LYRA *et al.*, 2006).

2.5.1 Modificação Comportamental

A mudança do estilo de vida do paciente com alto fator de risco é uma das mais eficientes maneiras de prevenir o desenvolvimento de DM2 em pessoas com

alto fator de risco. Um estudo feito com grupo de 523 pessoas cujo fator de risco era elevado (40 a 65 anos de idade com parentes de primeiro grau portadores de DM2 e índice de massa corporal acima de 25) mostrou que, após 1 ano, houve redução de $3,5 \pm 5,5$ kg no grupo de intervenção e de $0,8 \pm 4,4$ kg no grupo controle e após 4 anos, o risco de diabetes foi reduzida em 58% no grupo de intervenção. Os indivíduos do grupo de intervenção receberam informações detalhadas sobre a forma de alcançar os objetivos da intervenção, através da redução no peso e ingestão total de gordura, do aumento do consumo de fibras, além do exercício físico moderado durante 30 minutos por dia (TUOMILEHTO *et al.*,2001).

2.5.2 Intervenção farmacológica

Apesar da tentativa, muitas pessoas não conseguem mudar o estilo de vida, sendo necessário o uso de fármacos no intuito de prevenir o desenvolvimento de doenças como a DM2. Antidiabéticos orais, como arcabose, biguanidas (fenformina e metformina), tiazolidinedionas (troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona) e agentes anti-obesidade têm sido testados e alguns mostram resultados promissores na prevenção da doença (LYRA *et al.*, 2006). A arcabose, um inibidor da alfa-glicosidase, quando testada em um grupo de 1429 pessoas, reduziu em 25% o risco relativo de progressão para diabetes quando comparada ao placebo (CHIASSON *et al.*, 2007).

2.5.3 Tratamento Cirúrgico

A cirurgia bariátrica tem se mostrado eficaz no que diz respeito à prevenção do desenvolvimento de DM2 (SANTORO *et al.*, 2008; FENG *et al.*, 2013). Um estudo realizado no Brasil mostra o desenvolvimento de uma proposta cirúrgica que combina a gastrectomia vertical, a omentectomia e a jejunectomia para o tratamento da obesidade e suas consequências metabólicas, incluindo DM2. A estratégia recebe o nome de Adaptação Digestiva (AD), pois cria um trato gastrointestinal (TGI) reduzido proporcionalmente, ou seja, adequado de acordo com o processo evolutivo do homem e sua necessidade de armazenamento gástrico (SANTORO *et al.*, 2008).

O procedimento induz o aumento da secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), pois os nutrientes chegam ao intestino distal mais rapidamente para serem absorvidos, dando maior sensação de saciedade. Além disso, a DA reduz a produção de grelina e resistina (SANTORO *et al.*, 2008), hormônios responsáveis, respectivamente, pela estimulação da ingesta alimentar, levando a desajustes nutricionais e consequente obesidade (VILANDE JÚNIOR *et al.*, 2012), e pela relação à resistência à insulina, sendo encontrada em altas concentrações em animais obesos e diabéticos (GUIMARÃES *et al.*, 2007). No estudo de Santoro *et al.*, todos os 228 pacientes com Índice de Massa Corporal (IMC) variando de 35 a 51 apresentaram saciedade precoce e melhoria na co-morbidade pré-cirúrgica com a DA, especialmente no que diz respeito ao diabetes tipo 2.

2.6 Influência do GLP-1 na secreção de insulina

Uma falha na função contínua das células β é outro aspecto da DM2, que nenhum dos fármacos atualmente utilizados são capazes de reverter (DOYLE & EGAN, 2005). Geralmente, a secreção de insulina após a ingestão de alimentos é o efeito líquido de uma estimulação direta pelos nutrientes absorvidos, bem como estimulação indireta por sinais neurais e humorais. Fatores insulíntrópicos gastrintestinais, conhecidos como incretinas, mostraram que a resposta à insulina é muito maior após a administração oral de glicose, que após a via intravenosa. Com o passar dos anos, vários candidatos para o “fator incretina” foram examinados, incluindo o hormônio GLP-1, que se mostra altamente insulíntrópico, reduzindo efetivamente os níveis de glicose no sangue em diabéticos (RANGANATH *et al.*, 1996).

O GLP-1 é secretado pelas células L intestinais, localizadas predominantemente no íleo distal, cólon e reto, em resposta à ingestão nutricional (EISSELE *et al.*, 1992; DOYLE & EGAN, 2005). A administração exógena do hormônio reduz os níveis de glicose no sangue tanto em pessoas normais, quanto

em diabéticos. Isso ocorre pela estimulação da secreção de insulina, pela síntese em conjunto com glicose e pela supressão da secreção de glucagon (DOYLE & EGAN, 2005), além de promover sensação de saciedade (RANGANATH *et al.*, 1996).

A ação do GLP-1 em células β é mediada pela ligação do peptídeo a um receptor específico transmembrana de sete alças. A ativação desse receptor acoplado à proteína G causa um aumento na concentração do AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA). Como ilustrado na figura 2, o GLP-1 atua diretamente através da via AMPc/PKA para melhorar e sensibilizar as células β a secretarem insulina estimulada pela ingestão de glicose (DOYLE & EGAN, 2005).

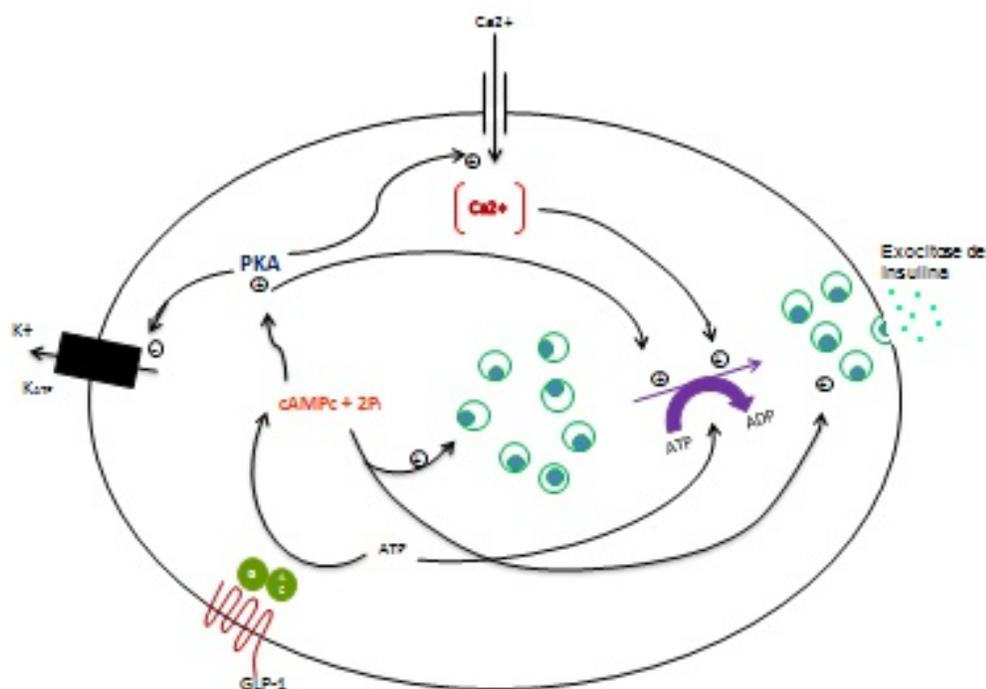


Figura 2: Descrição dos eventos intracelulares que ocorrem após a ligação do GLP-1 ao seu receptor acoplado a proteína G específica. A adenilil-ciclase é ativada, com um consequente aumento no AMPc que, por sua vez, resulta na ativação de PKA. Em seguida, através dos meios PKA dependente e independente, a insulina é liberada. AMPc – adenosina monofosfato cíclico; ADP – adenosina difosfato; ATP - adenosina trifosfato; Ca^{2+} - cálcio; GLP-1 – peptídeo semelhante ao glucagon 1; K^+ - potássio; PKA – proteína quinase A. \oplus ativado; \ominus inibido.

2.7 Métodos de Diagnóstico para DM2

Os sintomas relativos à DM2, como aumento da sede e do volume urinário, infecções recorrentes, perda de peso inexplicável e, em casos graves, sonolência e coma, são encontrados como os principais parâmetros para o diagnóstico clínico da doença (CAPPUCCIO *et al.*, 2010). A confirmação do diagnóstico é realizada através da análise de amostra sanguínea coleada do paciente, sendo positivo nos casos em que a concentração de glicose plasmática em jejum é igual ou acima de $7,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ (OMS, 1999; STUMVOLL *et al.*, 2005).

Para fins clínicos, umaprova de tolerância à glicose oral (PTGO) para estabelecer um status de diagnóstico só é necessária se os valores de glicose no sangue encontram-se na faixa de incerteza, ou seja, entre os níveis que estabelecem ou excluem a DM2 (ALBERTI, 1998). Esse exame é suficiente para medir os valores de glicose analisados através da coleta de sangue em diferentes etapas: em jejum e em 30, 60, 90 e 120 minutos após uma carga oral de glicose de 75g. Esses intervalos de dosagem se fazem necessários para avaliar se a insulina está sendo liberada corretamente (OMS, 2006).

Os níveis de expressão do *GLP-1* encontrados para a secreção de insulina podem ser utilizados como um método eficiente no diagnóstico precoce da DM2, diminuindo os riscos de desenvolvimento das complicações mais graves acarretadas pela doença e proporcionando uma melhor qualidade de vida e bem-estar aos seus portadores. Esse diagnóstico é possível através de técnicas moleculares como a transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR), método altamente sensível que analisa sequências específicas de ácidos nucleicos (AN), utilizando o DNA complementar (cDNA) como molde.

2.8 qRT-PCR

A RT-PCR é utilizada principalmente para análise gênica quantitativa (utilizando DNA) na determinação da quantidade de gene em um genoma, e na medição da expressão gênica (utilizando RNA) para o monitoramento das respostas biológicas a vários estímulos (HEID *et al.*, 1996). A detecção e a quantificação dos produtos gerados durante cada ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR) são feitas de forma confiável. Isso é possível devido ao fato de se dispor de um método para detectar o acúmulo do produto de PCR e de um instrumento para executar a termociclagem que está adaptada para captar os resultados durante cada ciclo de PCR em tempo real (GINZINGER, 2002).

Existem dois diferentes métodos de se analisar dados através do qRT-PCR que são as quantificações absoluta e relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias de entrada do transcrito de interesse, normalmente pela relação entre o sinal de PCR com uma curva padrão. A quantificação relativa descreve a mudança na expressão do gene alvo em relação a um grupo de referência, tais como a ausência de tratamento (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3. Objetivos do trabalho

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho buscou avaliar a expressão gênica de *GLP-1* de modo comparado, a fim de estabelecer um método de diagnóstico precoce para pacientes com alto fator de risco de diabetes tipo 2.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o protocolo de extração de RNA, utilizando amostras de tecido de peixe, de forma a obter alto grau de qualidade e pureza.
- Obter o RNA total de amostras de biópsia do íleo distal de ratos .
- Investigar a qualidade do RNA total através de técnicas moleculares para uso comparativo de amostras com o mesmo grau de qualidade.
- Quantificar o RNA por qRT-PCR.

4. Metodologia

4.1 Padronização do protocolo de extração de RNA total

Esse processo foi realizado através de diferentes testes a partir de protocolo já estabelecido para a extração de RNA total. Dessa forma, utilizou-se o kit comercial “Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare®), seguindo as indicações do fabricante (Anexo A). A partir dessas indicações, pequenas alterações no protocolo original foram realizadas, conforme o esquema 1.

4.1.1 Protocolo 1

Foram retiradas como amostras, gônadas de lambari fêmeas (gênero *Astyanax*) da região para a extração de RNA. O protocolo foi realizado com uma amostra a fresco e outra congelada em *RNA later* (Qiagen) a -20°C. Houve alteração do tempo de exposição da amostra à DNase I (de 15 minutos à temperatura ambiente para 5 minutos nas mesmas condições). A DNase I possui a função de degradar todo vestígio de DNA que possa estar presente na amostra. Essa alteração foi realizada para reduzir o tempo de exposição da amostra à temperatura ambiente, já que em todos os passos anteriores a amostra deve ser manipulada à baixa temperatura (gelo).

4.1.2 Protocolo 2

Amostras de gônadas e fígado de lambari foram utilizadas. O fígado foi utilizado por ser um tecido sólido, com densidade semelhante à biópsia de tecido que seria extraído no com os ratos (íleo distal). Nesse teste, não se utilizou nitrogênio líquido para homogeneizar o tecido e a DNase I ficou agindo durante o período de 10 minutos à temperatura ambiente.

4.1.3 Protocolo 3

Amostras de gônadas e fígado de lambari foram utilizadas. Neste teste o nitrogênio líquido para a homogeneização da amostra não foi utilizado e a DNase I

ficou agindo à temperatura ambiente de acordo com as indicações do fabricante (15 minutos).

4.1.4 Protocolo 4

Esse protocolo foi realizado de forma semelhante ao Protocolo 3, porém com a utilização do nitrogênio líquido para a homogeneização das amostras. As amostras de gônadas e fígado de lambari macho foram coletadas para extração do RNA total.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
<ul style="list-style-type: none"> • Gônadas • Utilização de N líquido • Ação DNaseI 5 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Gônadas e fígado • N líquido não utilizado • Ação DNaseI 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Gônadas e fígado • N líquido não utilizado • Ação DNaseI 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Gônadas e fígado • Utilização de N líquido • Ação DNaseI 15 min

Esquema 1: Metodologia empregada para a padronização do protocolo de extração de RNA total.

4.2 Animais e tratamento utilizados para o estudo

Após a padronização do protocolo 4 de extração de RNA total, amostras de biópsia de íleo distal de ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) (n=22), cuja linhagem foi obtida do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, foram coletadas a fim de extrair o RNA total para os testes futuros de expressão gênica. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil, segundo o protocolo 02860, de acordo com a lei Federal Brasileira. Para análise comparativa, foram utilizados os seguintes grupos:

Grupo 1: “grupo Jejum” (n=11), cuja amostra foi coletada após o período de 12 horas no estado de jejum.

Grupo 2: “grupo Alimentado” (n=11) com ingestão oral de glicose via gavagem, na dose de 12mg/Kg do animal, conforme escrito por Svidnicki (2013) precedida em 30 minutos anterior à eutanásia.

Após a extração do RNA total da amostra do íleo distal dos animais, uma alíquota foi sujeita à eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% (Invitrogen®) para a verificação da integridade da amostra (Figura 3). Outra alíquota foi utilizada para quantificação e análise de pureza no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare®).

4.3 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

A partir do RNA extraído e armazenado em ultrafreezer -80°C, 2µg foi submetido à transcrição reversa, utilizando o kit comercial “First-Strand cDNA Synthesis Kit” (GE Healthcare®) para a síntese de cDNA. Os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante (ANEXO B), sendo que as alíquotas de cDNA a serem testadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 4) e estocadas a -20°C. Uma PCR comum das amostras de cDNA (na concentração de 10 ng/µL) foi realizada para visualizar se a amplificação do primer GLP-1 estaria ocorrendo conforme o esperado, sendo seguido a seguinte ciclagem de temperaturas:

94°C – 5 minutos	} 35x
94°C – 1 minuto	
60°C – 45 segundos	
72°C – 30 segundos	
4°C – 16 -18 horas	

Dessa forma, as amostras de ambos os grupos foram submetidas à técnica de qRT-PCR, utilizando-se primers para o gene GLP-1. A análise foi realizada em

equipamentos Stratagene MxPro 3005P qPCR (Agilent Technology). As amostras de cDNA testadas foram deixadas em uma mesma concentração inicial (aproximadamente 60 ng), sendo todos os ensaios realizados em duplicatas com controle negativo (NTC). Como gene de referência para este trabalho, foi utilizado o rDNA 18S (Gene ID: 100008588), tornando possível a obtenção de um controle interno do teste. A finalidade do gene de controle interno é normalizar as PCRs para a quantidade de RNA adicionada a as reações de transcrição reversa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Nas reações de amplificação, os seguintes reagentes foram utilizados: SYBR *Green master mix* 1X (Stratagene); 0,8 µL dos primers *foward* e *reverse*; 3 µL de cDNA (60ng); e água MilliQ suficiente para o volume final de 25 µL. O controle negativo é composto de água substituindo o cDNA molde, sendo este utilizado tanto para o gene de interesse quanto para o gene de referência. A programação do equipamento seguiu o seguinte protocolo:

95°C – 15 minutos	}	40 ciclos
94°C – 15 segundos		
60°C – 30 segundos		
72°C – 30 segundos		
95°C – 1 minuto	}	Curva de Dissociação
55°C – 30 segundos		
95°C – 30 segundos		

Assim, o Treshold Cycle (Ct) de cada amostra foi obtido e a mudança relativa na expressão gênica foi apresentada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O Ct indica o número do ciclo fracional, no qual a quantidade de alvo amplificado atinge um limiar fixo. (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4.4 Análise Estatística

Os cálculos para comparação da expressão gênica dos dois grupos foi realizada através de Microsoft Office Excel, Microsoft, EUA. Utilizou-se os testes estatísticos ANOVA com teste T de *Student*, cuja significância atribuída foi de $p < 0,05$. Em seguida, as análises e os gráficos gerados foram realizadas por meio do software GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. Resultados

5.1 Protocolo padrão e extração do RNA total

Os resultados obtidos através de testes para padronização do protocolo de extração de RNA total apontou o Protocolo 4 como o mais indicado, pois as amostras se mostraram com maior viabilidade e pureza. A utilização do nitrogênio líquido na homogeneização do tecido, sem que a mesma descongele antes da adição do primeiro tampão, é um passo essencial para manter a integridade do RNA evitando sua desnaturação. Além disso, a ação da DNase I durante o período de 15 minutos se mostra com maior eficiência, não deixando vestígios de DNA na amostra.

Os RNAs totais extraídos dos animais para o estudo em questão se mostraram em concentrações diferentes, conforme já era esperado (Tabela 2). Para evitar uma maior variabilidade entre as amostras, foram utilizadas as 8 amostras cujas quantificações foram maiores. Assim, como pode ser visualizado na figura 3, a partir de 4 amostras do “grupo Jejum” e outras 4 do “grupo Alimentado” o estudo foi embasado.

Tabela 2: Quantificação do RNA total extraído de amostras coletadas da porção do íleo distal dos ratos.

Amostras	Quantificação		Amostras	Quantificação
Grupo Jejum	(ng/μL)		Grupo Alimentado	(ng/μL)
1	1,8		1	0,8
2	23,6		2	2,7
3	6,8		3	5,8
4	0,6		4	0,4
5	128,4		5	2,2
6	6,2		6	216,4
7	7,6		7	104,4
8	2,8		8	151,6
9	23,6		9	5,1
10	232,8		10	79,6
11	11,4		11	5,1

Quantificação realizada através do espectrofotômetro NanoVue, utilizando-se 3 μL de amostra do RNA total extraído. As amostras utilizadas para a síntese de cDNA estão destacadas em vermelho.

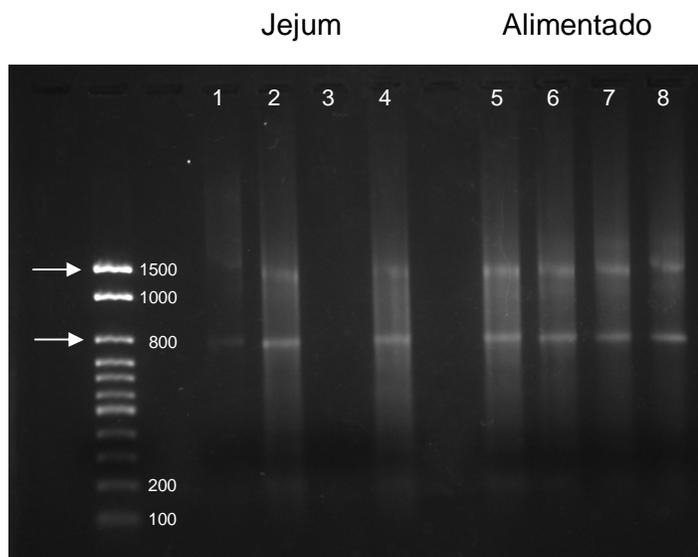


Figura 3: Gel de agarose 1,2% desnaturante, corado com GelRed, contendo 4 amostras de RNA total do grupo Jejum e 4 amostras do grupo Alimentado, extraídas da porção do íleo distal dos ratos. As setas indicam as bandas de rRNA 28S (~1500 pb) e 18S (~800 pb). Na primeira coluna, encontra-se representado o marcador de peso molecular (Norgen).

5.2 Expressão Gênica

De acordo com o ilustrado na figura 4, o cDNA das amostras utilizadas no estudo (Tabela 2) foi sintetizado com sucesso e os dados resultantes dos ensaios de qRT-PCR mostraram que todas as amostras foram amplificadas como pode ser visualizado na figura 5.

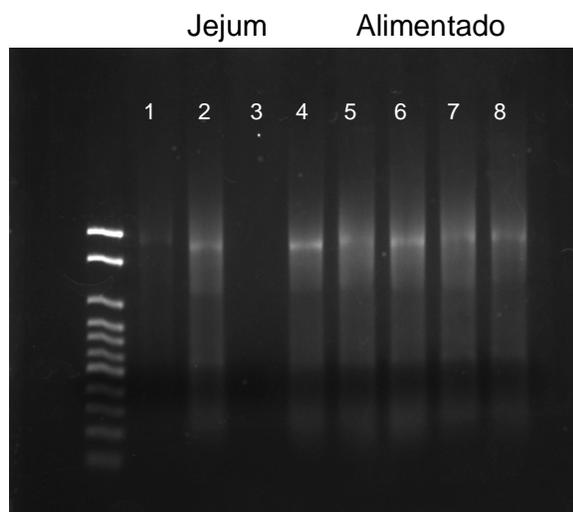


Figura 4: Gel de agarose 1% corado com GelRed da síntese de cDNA, contendo 4 amostras de cada grupo, Jejum (1 – 4) e Alimentado (5 – 8), respectivamente. Na primeira coluna, encontra-se representado o marcador de peso molecular 1kb (Norgen).

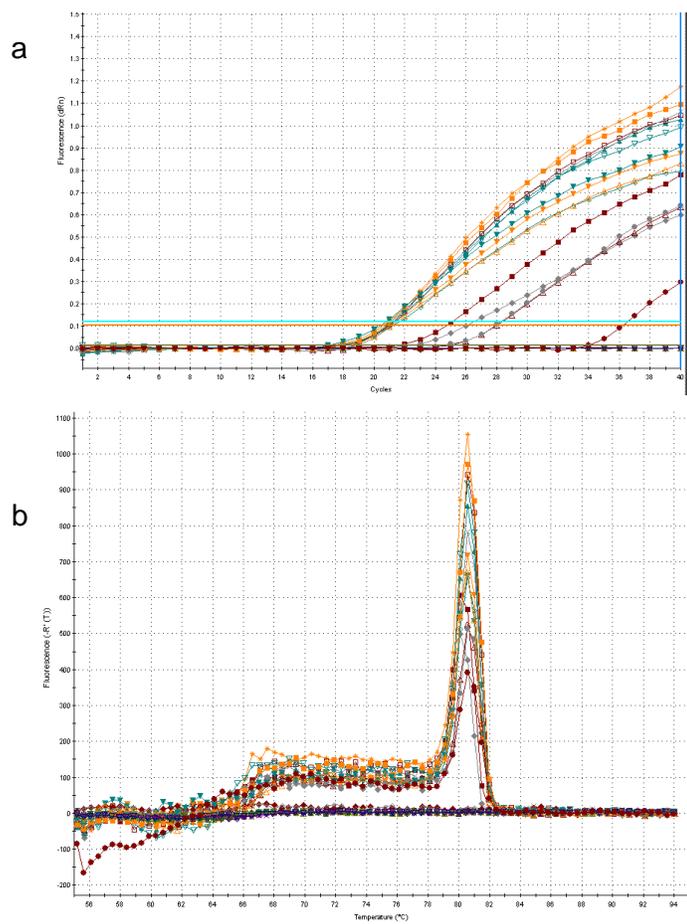


Figura 5: Descrição dos parâmetros de amplificação (a) e da curva de dissociação (b) resultantes da análise por qRT-PCR, realizada em duplicata com as amostras dos grupos Jejum e Alimentado.

A média do Ct das duplicatas que foi realizada para análise estatística mostra que houve aumento significativo na expressão gênica de GLP-1 em média 20 vezes no estado alimentado quando comparado ao grupo jejum (figura 6).

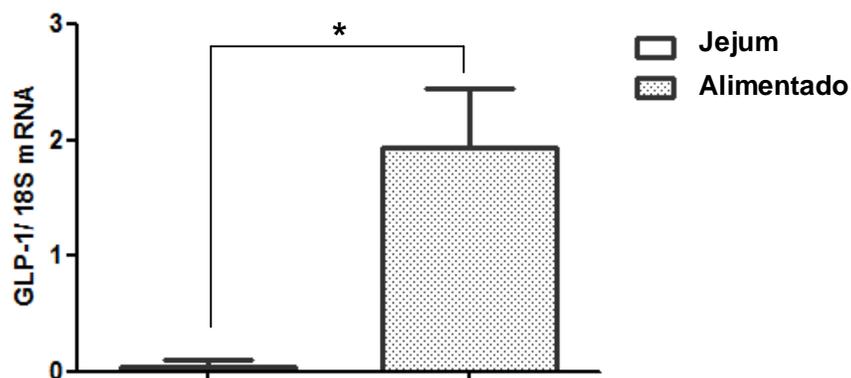


Figura 6: Análise comparativa da expressão gênica de GLP-1 nos grupos Jejum e Alimentado. O símbolo acima da barra (*) representa a diferença estatística significativa ($p < 0,05$) dos resultados. Foi utilizado o teste T de *Student*, sendo o gráfico gerado a partir do software GraphPad Prism[®] 5.

6. Discussão

O presente trabalho foi realizado através de duas etapas principais. A primeira teve como objetivo padronizar o protocolo de extração de RNA total para garantir uma boa viabilidade das amostras que seriam extraídas na segunda etapa. Dessa forma, amostras das gônadas e de fígado de peixes do gênero *Astyanax* foram utilizadas em 4 diferentes protocolos. Tais testes se distinguiram em relação à presença ou não do nitrogênio líquido para homogeneização do tecido, e no tempo de ação da DNase I à temperatura ambiente. Através dos resultados obtidos, observou-se que o protocolo 4 se mostrou o mais eficiente no que diz respeito à integridade e pureza da amostra.

Na segunda etapa, amostras do íleo distal de ratos no estado de jejum e com administração de glicose foram coletadas para avaliar os níveis de expressão do *GLP-1*. O *GLP-1* é peptídeo de 30 aminoácidos responsável por estimular a transcrição do gene da insulina, além de potencializar a secreção de insulina dependente de glicose das células β localizadas nas Ilhotas de Langerhans pancreáticas (SKOGLUND *et al.*, 2000; FENG *et al.*, 2013).

Como a glicose é o principal regulador da biossíntese de insulina, qualquer ação do *GLP-1* para corrigir uma disfunção da expressão do gene da insulina dependente de glicose no pâncreas seria de particular interesse (DOYLE & EGAN, 2005). Estudos que realizam o tratamento de diabéticos tipo 2 através da administração exógena de *GLP-1* (por infusão subcutânea), com a finalidade de potencializar a secreção de insulina, têm sido realizados (NATHAN *et al.*, 2009; NAUCK *et al.*, 2011).

Dessa forma, as amostras foram retiradas do íleo distal por ser este o local onde o *GLP-1* é secretado pelas células L, principalmente logo após a ingestão de alimentos. A secreção deste peptídeo é controlada pela combinação de estímulos neurais e endócrinos (DOYLE & EGAN, 2005; KARHUNEN *et al.*, 2008).

Em pessoas não-diabéticas, no estado de jejum, ocorre menor expressão de *GLP-1*. Ao haver ingestão de alimentos ricos em carboidratos, lipídeos e proteínas, a demanda de insulina é aumentada, portanto, ocorre elevação na expressão desse hormônio, garantindo a homeostase metabólica. Por outro lado, em indivíduos obesos, com propensão genética e idade avançada, é frequente a deficiência do correto funcionamento das células β pancreáticas em liberar o *GLP-1*, mesmo em condições pós-prandial. Isso acarreta em falhas na secreção de insulina, causando elevação dos níveis de glicose sérica (LAMONT *et al.*, 2012). Tais indivíduos possuem, portanto, baixos níveis de expressão do hormônio.

De acordo com os resultados obtidos da extração do RNA total dessas amostras, foram utilizadas aquelas cuja quantificação se deu em maior número e concentração, sendo, portanto utilizado quatro amostras referentes ao grupo Jejum e outras quatro referentes ao grupo Alimentado. Todas as amostras foram submetidas à técnica de qRT-PCR e, após a análise dos resultados das amplificações, os mesmos foram transferidos para o programa de análise estatística, com a finalidade de verificar a significância comparativa entre os grupos.

Os resultados finais do estudo mostram que houve um aumento significativo na expressão de *GLP-1* no grupo Alimentado em relação ao grupo Jejum. Isso comprova a teoria de que, em período pós-prandial, a liberação desse hormônio tende a ser aumentada para suprimir a necessidade da secreção de insulina com a finalidade de metabolizar a glicose presente na corrente sanguínea. Entretanto, em pessoas cujo fator de risco para DM2 seja elevado (obesidade, histórico familiar, estilo de vida), a probabilidade de haver resistência à insulina também é aumentada, podendo o quadro pré-diabético evoluir para a doença.

Deste modo, aquelas pessoas que possuem menor índice de expressão de *GLP-1*, mesmo em um período pós-prandial, tendem a possuir o quadro de resistência à secreção de insulina, derivado da deficiência da atividade das células β pancreáticas em liberar o *GLP-1*. Nestes casos, pode-se constatar altas taxas de glicose sérica a

ser metabolizada, acarretando em maior risco de desenvolvimento de DM2. Esta relação de balanço dependente entre expressão de *GLP-1* e produção de insulina é um mecanismo sensível para ser testado contra níveis finos de início de desbalanço em direção ao estabelecimento da DM2.

7. Conclusão e Perspectivas

A padronização do protocolo de extração de RNA total se fez necessária e imprescindível à boa qualidade da segunda etapa dos experimentos. Uma justificativa seria que as pesquisas utilizando RNA frequentemente possuem percalços no que diz respeito à contaminação e fácil degradação das amostras. A rapidez com que a amostra é macerada e homogeneizada em nitrogênio líquido é um ponto-chave para a correta realização do protocolo.

Dessa forma, o protocolo 4 foi utilizado como modelo para a extração de RNA das amostras de biópsia do íleo distal de ratos. O RNA das amostras de todos os animais foi extraído, sendo utilizado aquelas cuja quantificação se deu em maior concentração para os estudos de expressão gênica.

A análise comparativa da expressão gênica de *GLP-1* nos estados de jejum e alimentado em ratos forneceu ao estudo um parâmetro de como os mecanismos moleculares relacionados ao metabolismo da glicose ocorrem em indivíduos não-diabéticos, já que após a refeição, os níveis desse hormônio responsável pela liberação de insulina tendem a estar elevados.

Através dos resultados, foi evidenciada uma estratégia promissora no que diz respeito ao diagnóstico precoce da DM2, já que o paciente cuja glicose sanguínea encontra-se acima do normal e possui baixos níveis de expressão de *GLP-1*, pode estar encaminhando-se ao desenvolvimento da doença.

Para que tal conclusão possa ser comprobatória, novos ensaios utilizando grupos de animais com DM2 induzida se faz necessários. No entanto, os resultados apresentados no presente estudo indicam uma nova possibilidade de diagnóstico antes do estabelecimento da doença, podendo o paciente ser encaminhado ao tratamento preventivo ideal.

9. Bibliografia

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 27, n.1, p.88-90, 2004.

ALBERTI, K.G.M.M.; ZIMMET, P.Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetic Medicine**, v.15, p. 539-553, 1998.

BADAWI, A.; KLIP, A.; HADDAD, P.; COLE, D.E.C.; BAILO, B.G.; EL-SOHEMY, A.; KARMALI, M. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v.3, p. 173-186, 2010.

BYRNE, M.M. et al. Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. **Diabetes**, v.44, p. 699-704, 1995.

CHIASSON, J.L.; JOSSE, R.G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. Acarbose to prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP-NIDDM trial. **The Lancet**, v.359, n.9323, p. 2072-2077, 2007.

DOYLE, M.E.; EGAN, J.M. Glucagon-Like Peptide-I. **Endocrine Reviews**, v.56, n.1, p. 377-400, 2005.

EISSELE, R., GÖKE, R., WILLEMER, S., HARTHUS, H.P., VERMEER, H., ARNOLD, R., AND GÖKE, B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. **European Journal Clinical Investigation**, v.22, n.4, p. 283–291, 1992.

FAJANS, S.S. Maturity-onset diabetes of the young. **Diabetes/metab**, n.5, p. 579-606.

FENG, X.; ZHONG, S.; YANG, J.; WANG, Y.; LIU, J. Effects on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion by Distal Ileal Administration of Nutrients. **Obes. Surg**, v.23, p.1774-1782, 2013.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p. 503–512, 2002.

GOMES, M.B.; GIANNELLA NETO, D.; MENDONÇA, E. TAMBASCIA, M.A; *et al.* Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Pacientes Com Diabetes Mellitus do Tipo 2 no Brasil: Estudo Multicêntrico Nacional. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.50 n.1, p.136-144, 2006.

GUIMARÃES, D.E.D.; SARDINHA, F.L.C.; MIZURINI, D.M.; TAVARES DO CARMO, M.G. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, v.20, n.5, p. 549-559, 2007.

HAFFNER, S.M.; LEHTO, S.; RONNEMAA, T.; PYORALA, K.; LAAKSO, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v.339, p. 229-234, 1998.

HANIS, C.L.; BOERWINKLE, E.; CHAKRABORTY, R.; ELLSWORTH, D.L.; CONCANNON, P.; STIRLING, B.; MORRISON, V.A.; WAPELHORST, R.S.; SPIELMAN, R.S.; GOGOLIN-EWENS, K.J.; SHEPHARD, J.M.; WILLIAMS, R.S. *et al.* A genome-wide search for human non-insulin dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. **Nature Genetics**, v.13, p. 161-166, 1996.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, p. 986-994, 1996.

HORIKAWA, Y.; ODA, N.; COX, N.J.; LI, X.; ORHO-MELANDER, M.; HARA, M.; HINOKIO, Y.; LINDNER, T.H.; MASHIMA, H.; SCHWARZ, P.E.H.; BOSQUE-PLATA,

L. *et al.* Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. **Nature Genetics**, v.26, p. 163-175, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Global health expenditure for diabetes, 2010 and 2030**. Disponível em: <<http://www.idf.org/node/23640>> Acesso: 03 de Dezembro de 2013.

KARHUNEN, L.J.; JUVONEN, K.R.; HUOTARI A., *et al.* Effect of protein, fat, carbohydrate and fiber on gastrointestinal peptide release in humans. **Regul Pept**, v.149, p.70–78, 2008.

KUSUYA, T.; MATSUDA, A. Classification of diabetes on the basis of etiologies versus degree of insulin deficiency. **Diabetes Care**, v.20, n.2, p. 219-220, 1997.

LAMONT, B.J.; LI, Y.; KWAN, E.; BROWN, T.J.; GAISANO, H.; DRUCKER, D.J. Pancreatic GLP-1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice. **J Clin Invest**, v.122, n.1, p. 388-402, 2012.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LYRA, R.; OLIVEIRA, M.; LINS, D.; CAVALCANTI, N. Prevenção do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Bras. Endocrinologia e Metabologia**, v.50, n.2, 11p, 2006.

MALECKI, M.T.; JHALA, U.S.; ANTONELLIS, A.; FIELDS, L.; DORIA, A.; ORBAN, T.; SAAD, M.; WARRAM, J.H.; MONTMINY, M.; KROLEWSKI, A.S. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. **Nature Genetics**, v.23, p. 323-328, 1999.

MORRISH, N.J.; WANG, S.L.; STEVENS, L.K.; FULLER, J.H.; KEEN, H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational study of vascular disease in diabetes. **Diabetologia**, v.44, n. 2, p. S14-S21, 2001.

NARAYAN, K.M.; GREGG, E.W.; FAGOT-CAMPAGNA, A.; ENGELGAU, M.M.; VINICOR, F. Diabetes – a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.50, n.2, p. S77-S84, 2000.

NATHAN, D.M.; BUSE, J.B.; DAVIDSON, M.B.; FERRANININI, E.; HOLMAN, R.R.; SHERWIN, R.; ZINMAN, B. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. **Diabetes Care**, v. 32, n.1, p. 193-203, 2009.

NAUCK, M.A.; VARDARLI, I.; DEACON, C.F.; HOLST, J.J.; MEIER, J.J. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? **Diabetologia**, v.54, p. 10-18.

RANGANATH, L.R.; BEETY, J.M.; MORGAN, L.M.; WRIGHT, J.W.; HOWLAND, R.; MARKS, V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? **Gut**, v.38, n.6, p.916-919, 1996.

REIS, A; VELHO, G. Bases Genéticas do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinologia e Metabologia**, v.46, n.4, p. 426-432, 2002.

SANTORO, S.; MILLEO, F.Q.; MALZONI, C.E.; KLAJNER, S.; BOEGES, P.C.M.; SANTO, M.C.; CAMPOS, F.G.; ARTONI, R.F. Enterohormonal Changes After Digestive Adaptation: Five-Year Results of a Surgical Proposal to Treat Obesity and Associated Diseases. **Obesity Surgery**, v.18, p. 17-26, 2008.

SARWAR, N.; GAO, P.; SESHASAI, S.R.; GOBIN, R.; KAPTOGE, S.; DI ANGELANTONIO, E.; INGELSSON, E.; LAWLOR, D.A.; SELVIN, E.; STAMPFER, M.; STEHOUWER, C.D.; LEWINGTON, S.; PENNELLS, L.; THOMPSON, A.; SATTAR, N.; WHITE, I.R.; RAY, K.K.; DANESH, J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**, v.375, n.9733, p. 2215-2222, 2010.

SESSO, R.; GAWRYSZEWSKI, V.P.; MARCOPITO, L.F. Mortalidade por diabetes mellitus no estado de São Paulo com ênfase nos anos de 2005-2007. **Bepa**, v.7, n.73, p. 11-20, 2010.

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, p. 4-14, 2010.

SKOGLUND, G.; HUSSAIN, M.A.; HOLZ, G.G. Glucagon-Like Peptide 1 Stimulates Insulin Gene Promoter Activity by Protein Kinase A-Independent Activation of the Rat Insulin I Gene cAMP Response Element. **Diabetes**, v.39, p.1156-1164, 2000.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B.J.; VAN HAEFTEN, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v.365, p. 1333-1346, 2005.

SVIDNICKI, P.V. Efeito do exercício físico na expressão e atividade do GLP-1 e na expressão de adipocinas em ratos obesos. 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas concentrado na área de Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

TOSCANO, C.M. As campanhas nacionais para detecção das doenças crônicas não-transmissíveis: diabetes e hipertensão arterial. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n.4, p. 885-895, 2004.

TRIPATHY, D.; CHAVEZ, A.O. Defects in Insulin Secretion and Action in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **Curr Diab Rep**, v.10, p. 184-191, 2010.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTRÖM, J.; ERIKSSON, J.G.; VALLE, T.T.; HÄMÄLÄINEN, H.; ILANNE-PARIKKA, P.; *et al.* Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **The New England Journal of Medicine**, v.344, n.18, p. 1343-1350, 2001.

TURNER, R.C.; HATTERSLEY, A.T.; SHAW, J.T.E.; LEVY, J.C. Type II diabetes: clinical aspects of molecular biological studies. **Diabetes**, n.44, p. 1-10, 1995.

VAXILLAIRE, M. *et al.* A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. **Nature Genetics**, v.9, p. 418-423, 1995.

VILANDE JÚNIOR, A.V.; GOMES, C.F.; ALLGAYER, N.; LARA, G.M. A grelina e sua contribuição para obesidade e diabetes mellitus tipo 2. **Revista Conhecimento Online**, v.2, 8p, 2012.

WEYER, C.; BOGARDUS, C.; MOTT, D.M.; PRATLEY, R.E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v.104, n.6, p. 787–794, 1999.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes - Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p. 1047–1053, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 65p, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDf Consultation. 50p, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The cost of diabetes, 2002**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs236/en/>> Acesso: 04 de Outubro de 2013.

Anexos

Anexo A - Protocolo de extração de RNA total

Após a retirada de uma pequena amostra de tecido, a qual foi acondicionada em cadinhos, foi realizada a maceração mecânica do mesmo na presença de nitrogênio líquido, com ajuda de um bastão. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e exposta 30 minutos à luz UV, a fim de tomar todas as precauções necessárias para evitar a contaminação das amostras e degradação do RNA.

A partir da disrupção mecânica do tecido, foi utilizado o kit “Illustra RNAspin Mini RNA isolation Kit” (GE Healthcare®) para a extração do RNA total do precipitado. Os demais passos foram seguidos de acordo com as normas do fabricante.

Primeiramente, foi adicionado ao precipitado celular 350 µL do tampão RA1 e 3,5 µL de β-mercaptoetanol, os quais foram homogeneizados. O lisado foi então sujeito à filtração em “mini filtros RNAspin”, acoplados a tubos coletores (oferecidos pelo kit), por 1 minuto a 11000g em centrífuga refrigerada (4°C). Ao filtrado, foram então misturados a 350 µL de etanol 70% e a solução colocada em uma “mini coluna RNAspin”, acoplados a tubos coletores, e sujeita à centrifugação por 30 segundos a 8000g a 4°C. Após a troca do tubo coletor, a membrana de sílica presente na coluna foi tratada com 350 µL do tampão MDB (*Membrane Desalting Buffer*) para remoção do sal presente na coluna e centrifugada a 11000g por 1 minuto a 4°C. Em seguida, a amostra foi digerida com a enzima DNase I durante o período de 15 minutos a temperatura ambiente para a remoção de vestígios de DNA. Posteriormente, foram realizadas lavagens com 200 µL do tampão RA2 por 1 minuto a 11000g e 600 µL do tampão RA3, previamente acrescido de etanol 100%, por 1 minuto a 11000g a 4°C, sendo esta última lavagem repetida duas vezes. Finalmente, o RNA foi eluído da coluna com 50 µL de água livre de RNase por centrifugação a 11000g por 1 minuto a 4°C.

Uma alíquota de 3 μ L de RNA foi sujeita à eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2% (Invitrogen®) para verificar a integridade da amostra. O restante foi acondicionado em ultra-freezer -80°C para estocagem e posterior utilização.

Anexo B – Protocolo para síntese de cDNA

O RNA total obtido através do protocolo descrito no Anexo A foi utilizado como molde para a síntese de cDNA, através do kit “*First-Strand cDNA Synthesis Kit*” (GE Healthcare®), sendo as instruções do fabricante seguidas rigorosamente.

2 µg de RNA total foi utilizado como molde para a geração da primeira fita de cDNA. Primeiramente, a solução de RNA foi aquecida a 65°C durante um período de 10 minutos e, imediatamente colocada em gelo para que houvesse a desnaturação do RNA. Ao RNA pré-desnaturado, adicionou-se 11 µL da solução *bulk first-strand cDNA reaction mix*, sendo esta constituída de transcriptase reversa M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*), desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) na concentração de 1,8 mM e BSA (0,08 mg/mL), todos em tampão apropriado para a reação enzimática (Tris-HCl 45 mM, pH 8,3, KCl 68 mM, DTT 15 mM, MgCl₂ 9 mM). Juntamente a este mix, foram adicionados 1 µL de solução contendo DTT 200 mM e 1 µL (5 µg) de primer pD(N₆). Após a homogeneização da solução, esta foi incubada a 37°C pelo período de 1 hora.

Uma alíquota de 2 µL do cDNA foi aplicada em gel de agarose 1% (Invitrogen) para verificação da integridade da amostra e observação de um provável rastro, evidenciando assim o resultado esperado da técnica. O restante da solução foi acondicionado a -20°C para estocagem.