

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DE UMA SOBRECARGA AGUDA DE ÁCIDOS GRAXOS
MONOINSATURADOS E SATURADOS NOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLP-1 E PYY
EM RATOS WISTAR**

MANOELA NEVES DA JORNADA

Porto Alegre
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DE UMA SOBRECARGA AGUDA DE ÁCIDOS GRAXOS
MONOINSATURADOS E SATURADOS NOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLP-1 E PYY
EM RATOS WISTAR

MANOELA NEVES DA JORNADA

Orientador: Marcello Casaccia Bertolucci
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre
2012

*Dedico esta dissertação de mestrado
aos meus pais, Rosebell e João Luiz,
à minha avó Lucena, à minha amiga
Luciana e ao meu namorado Vitor.*

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha amiga Luciana da Conceição Antunes por ter me introduzido nessa atmosfera científica, na qual sempre me apoiou e pela participação em todos os momentos desse trabalho. Agradeço também pelo carinho, pelas conversas, paciência e forte amizade.

Agradeço aos meus pais, Rosebell e João Luiz, ao meu irmão João, por terem me proporcionado formação intelectual, amor, cuidado e pelos demais valores transmitidos. À minha avó Lucena, pelo constante incentivo e admiração no que diz respeito ao meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Vitor, por estar ao meu lado, pelo amor, apoio e compreensão.

Ao Professor Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pela oportunidade de constante aprendizado, pela orientação e respeito à mim concedidos.

À colega Kelly Carraro Foletto, pela importante participação nesse trabalho e também pela amizade.

Gostaria de agradecer à toda minha família e amigos, que me incentivaram a trilhar este caminho, sobretudo às minhas tias Ana e Fátima, minhas primas Bruna e Marília, bem como aos meus queridos amigos Letícia Ramalho e Tiago Madeira Cardinal.

Às minhas queridas secretárias Vilma, Luiza e Morgana, por me ajudarem a conciliar o trabalho e a dedicação necessária à essa pesquisa.

Obrigada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo investimento e capacitação na minha formação. Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM) da Faculdade de Medicina da UFRGS (FAMED/UFRGS). Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Por fim, à toda equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), ao Laboratório Nobel e aos animais que participaram dos experimentos.

“Toda verdade passa por três estágios.
No primeiro ela é ridicularizada.
Depois, é criticada pela oposição.
Finalmente, é aceita por ser
evidente por si mesma”

Schopenhauer

Resumo

Introdução: A prevalência de doenças crônicas tem crescido em decorrência do aumento da obesidade nos últimos anos. Peptídeos secretados pelo trato gastrointestinal, como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY), exercem papel fundamental no controle da ingestão alimentar, pois levam informações acerca dos nutrientes ingeridos até o sistema nervoso central, possuindo efeitos anorexígenos e/ou orexígenos. Tanto GLP-1 quanto PYY são produzidos pelas células-L do íleo distal e cólon, sendo liberados após a ingestão alimentar. Além do efeito incretina produzido pelo GLP-1, ambos os peptídeos apresentam implicações no controle do apetite, o qual reflete na redução do peso corpóreo. **Objetivos:** Demonstrar um aumento na secreção de GLP-1 e PYY após sobrecarga oral de diferentes tipos de lipídios, comparados à controle negativo (água) e positivo (glicose). **Métodos:** Foi realizado um estudo experimental controlado em ratos Wistar, distribuídos em 4 grupos de acordo com a sobrecarga oral: grupo MUFA (óleo de oliva); grupo SAT (banha suína); grupo GLUC (glicose) e grupo CONT (água), foram avaliadas as concentrações séricas de GLP-1 ativo e PYY₃₋₃₆ nos tempos: 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. As sobrecargas foram isovolumétricas e isocalóricas, com exceção do grupo controle. **Resultados:** Houve pico de secreção do GLP-1 pós-sobrecarga no grupo MUFA no ponto 120' vs CONT e GLUC ($p \leq 0,001$) e no ponto 30' quando comparado ao seu *baseline*. Também observou-se pico de secreção de PYY no grupo MUFA vs CONT no ponto 30' ($p=0,015$); no ponto 60' vs CONT e GLUC ($p=0,019$) e no ponto 120' vs CONT e SAT ($p=0,02$). A carga secretada do PYY foi maior no MUFA quando comparada ao CONT ($p=0,04$). Verificou-se forte correlação entre os níveis basais e AUC's do GLP-1 e PYY ($r=0,57$; ($p=0,02$); $r=0,39$; ($p \leq 0,001$)). A proporção GLP-1/PYY apresentou um coeficiente médio de 3,77 ($\pm 2,04$). O grupo MUFA evidenciou níveis menores de glicose e maiores de insulina no ponto 15', enquanto SAT mostrou níveis maiores de glicose e menores de insulina neste ponto, porém, sem diferença significativa. **Conclusão:** A sobrecarga oral de fontes de ácidos graxos monoinsaturados promoveu um pico de secreção do GLP-1 de forma rápida e no que diz respeito ao PYY, o pico foi mais sustentado. Estudos adicionais são necessários, a fim de se avaliar o efeito de fontes distintas de lipídeos da dieta sobre a secreção destes peptídeos e seus efeitos na saciedade.

PALAVRAS-CHAVE

GLP-1, PYY, insulina, glicemia, ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos saturados.

Abstract

Background: The increased prevalence of chronic diseases has risen due to obesity. Gut peptides, such as glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and peptide YY (PYY), play an important role controlling food intake in response to a meal. GLP-1 exerts the known incretin effect stimulating the release of insulin in a glucose-dependent manner. Besides its insulinotropic effects, it is well established that GLP-1 slows gastric emptying, and also inhibits inappropriate glucagon release, additionally improves satiety. Both PYY and GLP-1 are produced by L cells of the distal ileum and colon. **Objective:** Demonstrate an increased secretion of PYY and GLP-1 after oral overload of different types of lipids, compared to negative (water) and positive (glucose) control. **Methods:** We conducted a controlled experimental study in Wistar rats, divided into 4 groups according to oral overload: MUFA group (olive oil), SAT group (lard:), carbohydrates group (glucose) and CONT group (water), It was evaluated the serum concentration of active GLP-1 and PYY₃₋₃₆ in the times: 0, 15, 30, 60 and 120 minutes. Overloads were isovolumetric and isocaloric, but the control group. **Results:** It was verified a higher peak secretion of GLP-1 in MUFA group at 120' after overload vs. CONT and carbohydrates ($p \leq 0.001$) and at 30' when compared to its baseline ($p=0,01$). It was shown a higher secretion peak of GLP-1 after MUFA overload at time 120' vs CONT e GLUC ($p \leq 0,001$) and at time 30' when compared to its baseline. It was also verified a PYY release peak in MUFA vs CONT at time 30' ($p=0,015$); 60' vs CONT e GLUC ($p=0,019$) and 120' vs CONT e SAT ($p=0,02$). PYY release load presented higher in MUFA group when compared to CONT ($p=0,04$). A strong correlation was seen between baseline PYY and GLP-1 ($r=0,57$; $p= 0,02$) as their AUC's ($r=0,39$; $p \leq 0,001$). GLP-1/PYY proportion release presented a mean coefficient of 3, 77($\pm 2,04$). **Conclusion:** monounsaturated fatty acids promoted a release peak of GLP-1 in a faster manner and concerning PYY this peak was more sustained. Further studies are necessary to evaluate whether distinct diet fatty acids can ameliorate these gut peptides release and their role on satiety.

KEYWORDS

GLP-1, PYY, insulin, glucose, monounsaturated fatty acids, saturated fatty acids.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados Basais.....	51
Tabela 2. Ponto máximo da secreção de GLP-1 e PYY.....	60

Lista de Figuras

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Efeito Incretina.....	16
Figura 2. Processamento do Proglucagon	17

ARTIGO

Figura 1.a Area under the curve of GLP-1.....	52
Figura 1.b. Secretory response of GLP-1 under overload.....	53
Figura 2a. Area under the curve of PYY.....	54
Figura 2b. Secretory response of PYY under overload.....	55
Figura 3a. Area under the curve of Glycemia.....	56
Figura 3b. Secretory response of glycemia under overload.....	57
Figura 4a. Á Area under the curve of Insulinemia.....	58
Figura 4b. Secretory response of insulin under overload.....	59
Figura 5a. Correlation between the basal levels of GLP-1 and PYY.....	61
Figura 5b. Correlation between the AUC's of GLP-1 and PYY.	62

Lista de Abreviaturas

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
ARC	Núcleo Arqueado
CCK	Colecistoquinina
DM2	Diabete Mellitus tipo 2
GIP	Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1
GLP-2	Peptídeo Semelhante ao Glucagon 2
GLP-1R	Receptor para Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IG	Índice Glicêmico
IMC	Índice de Massa Corporal
MUFAs	Ácidos Graxos Monoinsaturados
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PP	Polipeptídeo Pancreático
PYY	Peptídeo YY
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato Gastrointestinal

Sumário

1	Introdução	12
2	Revisão da literatura	14
2.1	Peptídeo semelhante ao Glucagon 1 – GLP-1	16
2.1.1	Síntese e estrutura Molecular.....	17
2.1.2	A Célula-L Intestinal.....	18
2.1.3	Estímulo e Regulação da Secreção.....	18
2.1.4	Degradação.....	19
2.1.5	Ação.....	21
2.2	Peptídeo YY - PYY	24
2.2.1	Síntese e estrutura Molecular.....	24
2.2.2	Estímulo e Regulação da Secreção.....	25
2.2.3	Ação.....	27
3	Objetivos.....	30
3.1	Objetivo principal	30
3.2	Objetivos secundários	30
4	Justificativa.....	31
5	Referências bibliográficas da revisão	31
6	ARTIGO EM INGLÊS	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
8	ANEXOS.....	711

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, há 300 milhões de obesos no mundo, sendo que um terço desta parcela encontra-se nos países em desenvolvimento. A prevalência de doenças crônicas como as dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) tem crescido em decorrência do aumento da obesidade.

Peptídeos secretados pelo trato gastrointestinal, como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), peptídeo YY (PYY), grelina e peptídeo insulino-trópico dependente de glicose (GIP), exercem papel fundamental no controle da ingestão alimentar, pois levam informações acerca dos nutrientes ingeridos até o sistema nervoso central (SNC), possuindo efeitos anorexígenos e/ou orexígenos.

O GLP-1 é um peptídeo produzido pelas células-L do íleo distal e cólon sendo liberado após a ingestão alimentar. O GLP-1 age nas ilhotas pancreáticas tanto nas células- β pancreáticas (estimulando a síntese de insulina) quanto nas células- α (inibindo a secreção de glucagon). Além disso, retarda o esvaziamento gástrico por meio de ação local e hipotalâmica, diminuindo o apetite.

Outro peptídeo que desempenha um importante papel no controle dos mecanismos de fome e saciedade é o PYY. O PYY, assim como o GLP-1, também é secretado pelas células-L do íleo distal. As formas moleculares ativas circulantes de PYY são: PYY₁₋₃₆ e PYY₃₋₃₆ (anorexígeno). Mesmo antes de chegarem às partes mais distais do intestino, onde as células entero-endócrinas contendo GLP-1 e PYY estão presentes em maior quantidade, os nutrientes já provocam a liberação desses peptídeos na circulação, indicando que durante a alimentação, a secreção pode também ser regulada por mecanismos neurais, através do nervo vago, bem como por mecanismos humorais, via liberação de colecistoquinina (CCK), e GIP.

A composição da dieta e os tipos de macronutrientes influenciam a secreção de GLP-1 e PYY de maneiras diferentes. Lipídeos são os mais potentes estimuladores da secreção de ambos. O comprimento da cadeia dos ácidos graxos parece ser crucial para esse efeito, sendo que ácidos graxos de cadeia longa

promovem maior resposta secretória quando comparados com ácidos graxos de cadeia média.

Os mecanismos pelos quais os nutrientes estimulam a célula-L intestinal ainda não estão bem elucidados. GLP-1 e PYY são hormônios que merecem destaque nesse contexto, constituindo um alvo promissor para a ação terapêutica em doenças crônicas. Além do efeito incretina produzido pelo GLP-1, ambos os peptídeos apresentam implicações no controle do apetite, refletindo na redução do peso corpóreo, dos níveis pressóricos e na melhora da função cardiovascular.

2 Revisão da literatura

Atualmente há cerca de 300 milhões de obesos no mundo, sendo que um terço desta parcela encontra-se nos países em desenvolvimento(2). A prevalência de doenças crônicas como a dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) tem crescido em decorrência do aumento da obesidade (3). Dentre os inúmeros desafios impostos por esta pandemia, encontra-se o desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficazes para combatê-la. Dessa forma, a compreensão de mecanismos neuro-endócrinos como o comportamento alimentar e o balanço energético se tornam primordiais.

O comportamento alimentar se dá por meio de conexões neurais periféricas, as quais informam a porção central do sistema nervoso (SNC) tanto acerca do estado nutricional imediato quanto sobre a quantidade de alimentos ingerida, através de peptídeos secretados pelo trato gastrointestinal (TGI), levando à finalização da refeição. Em contrapartida há hormônios os quais transportam informações sobre a quantidade de estoque energético disponível sob a forma de tecido adiposo.

Peptídeos secretados pelo TGI exercem papel fundamental no controle da ingestão alimentar. A partir da presença de alimento no tubo digestório, ocorre a formação de um eixo de controle com alças de retroalimentação entre a porção superior do TGI e os campos de projeção neural extrínseca com seus respectivos neurônios-alvo no SNC, os quais definem o eixo denominado intestino-encéfalo. Tal nomenclatura sinaliza a direção do fluxo de informações ao longo da via neural: sinais aferentes desencadeados pelo contato do tubo digestório com nutrientes ingeridos partem desses locais e chegam a porções do sistema SNC intermediando o comportamento alimentar. As vias aferentes neurais são os nervos vago e esplânicos os quais inervam o TGI e juntos compreendem o componente neural extrínseco do eixo intestino-encéfalo. Na parede de todo TGI encontram-se os plexos nervosos mioentérico (plexo de Auerbach) e submucoso (plexo de Meissner), onde ambos constituem a porção intrínseca neural do eixo anteriormente mencionado. O plexo mioentérico é responsável pelo controle de movimentos gastrintestinais e o submucoso, majoritariamente pela secreção e fluxo

gastrointestinais. Juntas estas porções coordenam eventos musculares e da mucosa do TGI e, por consequência, a sinalização ao SNC.

O eixo intestino-encéfalo possui também uma alça humoral constituída por neuropeptídeos (expressos no TGI e SNC), os quais são liberados pelo tubo digestório a partir da ingestão de nutrientes. Tais peptídeos como a grelina, o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo YY (PYY), chegam à corrente sanguínea e a regiões do SNC, responsáveis pelo controle da ingestão de alimentos, através de informações hormonais.

Dentre os inúmeros mecanismos que necessitam de elucidação, encontra-se o papel do nutriente na secreção de hormônios relacionados ao mecanismo fome-saciedade(4), como GLP-1 e PYY. Tal esclarecimento acarretará no melhor controle da ingestão alimentar, gerando uma nova ferramenta para o tratamento da obesidade e suas co-morbidades.

A alimentação provoca a secreção de múltiplos hormônios gastrointestinais envolvidos na regulação da motilidade intestinal, na secreção de ácido gástrico e das enzimas pancreáticas e na absorção de nutrientes. As incretinas são hormônios produzidos pelo TGI, liberados quando há entrada de nutrientes no intestino(5). Esse conceito foi desenvolvido a partir da comparação entre nutrição enteral e estímulo intravenoso isoglicêmico. Ao confrontar essas duas vias verificou-se que a primeira consistia em um fator insulínico mais potente(6). A diferença na secreção de insulina entre uma quantidade de glicose administrada por via oral e o mesmo montante administrado por via intravenosa é chamado de efeito incretina (Figura 1) e os hormônios responsáveis por este efeito são chamados de incretinas(7).

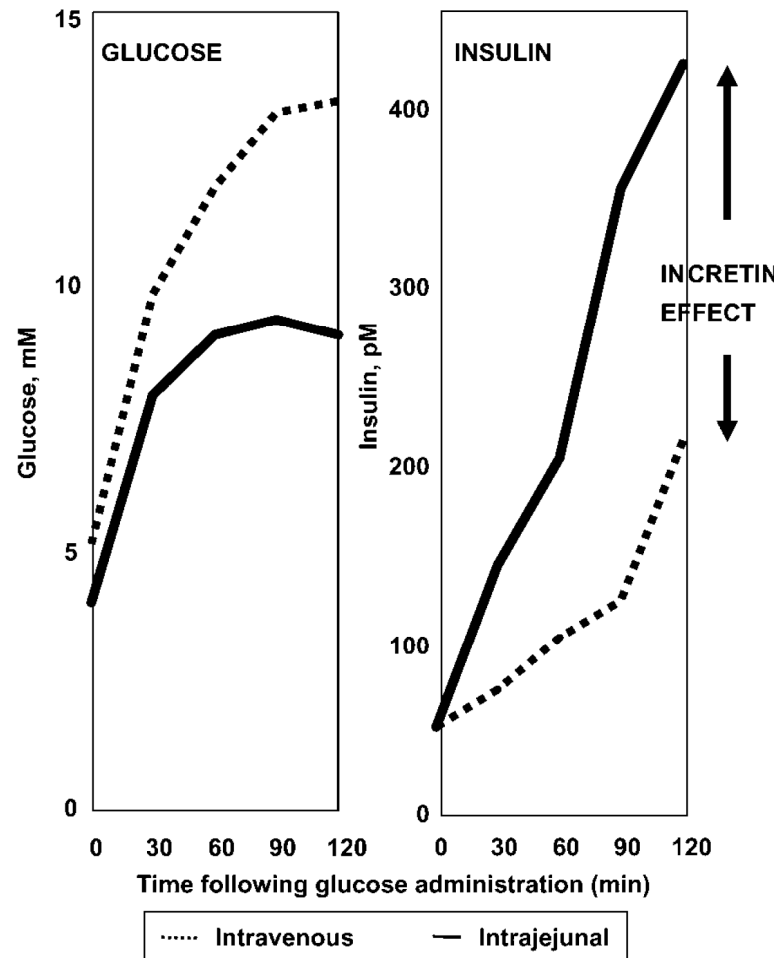


Figura 1. Efeito Incretina.

Sendo assim, as incretinas desempenham um relevante papel no controle da liberação fisiológica da insulina. O primeiro hormônio encontrado foi a somatostatina. Além desse, desempenham tal efeito o GIP e o GLP-1.

2. 1. Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1 (GLP-1)

O segundo hormônio incretínico identificado foi o GLP-1, cuja produção se dá pelas células do tipo L do íleo distal e cólon sendo liberado após a ingestão alimentar. O GLP-1 age nas ilhotas pancreáticas tanto nas células- β (estimulando a síntese de insulina) quanto nas células- α (inibindo a secreção de glucagon). Ademais, retarda o esvaziamento gástrico por meio de ação local e hipotalâmica, contribuindo para saciedade(8).

2.1.1 Síntese e Estrutura Molecular

O GLP-1 é um produto da gênese do glucagon, constituído por peptídeos de 30 e 31 aminoácidos (9) (10). O seu gene é expresso nas células- α do pâncreas, onde ocorre a síntese do produto primário, o pré-proglucagon, o qual possui três seqüências: glucagon e peptídeos semelhantes ao glucagon 1 e 2 (GLP-1 e GLP-2) (11).

Nas células-L intestinais o GLP-1 é clivado a partir do precursor pró-glucagon pela enzima proconvertase 1/3. Nas células- α do pâncreas o pró-glucagon é clivado em glucagon pela enzima proconvertase 2 (7).

A sua produção se dá por meio de um peptídeo inativo (GLP-1₁₋₃₇-amina), cujo C-terminal contém uma glicina. A forma ativa é produzida pela clivagem pós-traducional de 6 aminoácidos a partir do N-terminal (GLP-1₁₋₃₇). Sua forma truncada (GLP-1₇₋₃₇) pode ser amidada na glicina final do C-terminal e é a principal forma circulante (Figura 2). Ambos (GLP-1₇₋₃₇ e GLP-1₇₋₃₆ amida) possuem equipotente ação insulínica(7).

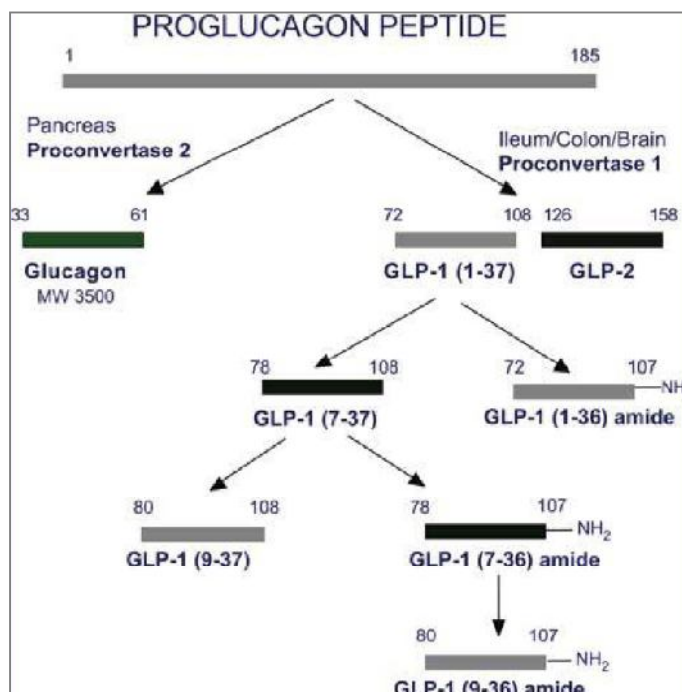


Figura 2. Processamento do Proglucagon.

2.1.2. A Célula-L Intestinal

A célula-L intestinal é uma célula endócrina do tipo aberta, com forma delgada e triangular, cuja base é apoiada na lâmina basal, a qual possui microvilosidades que se projetam para o lúmen (11). Através dessas microvilosidades a célula-L é capaz de identificar a presença de nutrientes nesta região e transformar essa informação em um estímulo à secreção de peptídios, como o GLP-1. Uma vez excitado, tal hormônio se difunde pela lâmina basal até a lâmina própria cujo transporte para a circulação portal se dá por meio do fluxo sanguíneo (12).

2.1.3. Estímulo e regulação da secreção

Após uma refeição, a presença dos nutrientes no duodeno ativa uma alça neuroendócrina proximal-distal, que estimula a secreção de GLP-1 a partir das células-L no íleo e cólon. Sabe-se que, em roedores, a liberação de GIP pelas células-K ativa aferências vagais as quais posteriormente causam a liberação de GLP-1. O fluxo de nutrientes para seções mais distais do intestino levam à interação direta destes com as células-L, relação esta que também estimula a secreção de GLP-1(13).

Os receptores de GLP-1 (GLP-1Rs) são vastamente expressos no TGI, em ilhotas pancreáticas e em outros órgãos periféricos(10). O estímulo aos GLP-1Rs resulta em um aumento de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) intracelular e da concentração de cálcio, que nas células- β é um sinal para a exocitose de insulina previamente sintetizada(14).

A principal produção e secreção local de GLP-1 é regulada em parte pelo sistema nervoso através do sistema colinérgico e receptores M1 e M2; além disso, a estimulação adrenérgica também desempenha certo papel. Receptores de GLP-1 (GLP-1Rs) estão presentes no SNC(15).

Estímulo por nutrientes

Há muito se sabe que a secreção de peptídeos de regulação do apetite é parcialmente dependente da energia total, do consumo e pode ser afetada por diferentes tipos de dietas(16).

Um estudo investigou os efeitos de três dietas (rica em sacarose, rica em amido e rica em lipídios) sobre a glicemia, lipidemia e resposta hormonal em mulheres nunca-obesas e ex-obesas. A área sob a curva (AUC) do GLP-1 mostrou-se maior durante a dieta rica em gordura e mais baixa durante a dieta rica em amido e sacarose(17). Portanto, a gordura parece ser um estimulador mais potente de GLP-1 que o carboidrato, sem diferença entre os tipos de carboidrato usados.

Em roedores, Yoder *et al*(18), observaram que além de ser mais estimulada por lipídios, a secreção de GLP-1 também é dose-dependente. Em quatro modelos de dietas com concentrações lipídicas diferentes, verificou-se que o pico de estimulação foi 10 vezes maior do que o jejum para níveis de GLP-1 e 4 vezes maior que os níveis de jejum para GIP em resposta à dieta mais concentrada em lipídios.

Alguns estudos mostram que o estímulo à secreção de GLP-1 pode ser maior dependendo dos diferentes tipos de lipídios administrados (19,20,21,22). De acordo com Radulescu *et al* (19), a secreção de insulina estimulada pela ingestão de gorduras (banha, óleo de cártamo e azeite de oliva) pode ser mediada por um aumento na concentração de GLP-1. Este peptídeo evidenciou um acréscimo maior ainda quando estimulado por uma dieta com alta concentração de azeite de oliva, rico em ácidos graxos monoinsaturados (MUFA's).

Além disso, a presença de receptores específicos para ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como o receptor GPR120, promove a secreção de GLP-1 *in vitro* e *in vivo*, fato que, em ambos, acarreta no aumento da insulina circulante (23). Outro experimento realizado em cultura celular evidenciou o papel da Proteína Kinase-C ζ na sinalização dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa, o que estimularia a secreção de GLP-1, resultando em uma maior resposta insulínica(20).

Rocca *et al*, 2001 testaram os efeitos de uma dieta rica em MUFAs e outra rica em gordura saturada no que tange à tolerância glicêmica e à secreção de GLP-1 pela célula-L em ratos Zucker. O grupo que recebeu dieta rica em MUFAs apresentou melhora na tolerância glicêmica, o que pode ter ocorrido em virtude do aumento da secreção de GLP-1. Uma possível explicação para a maior resposta secretória de GLP-1 induzida por MUFAs, quando comparado à glicose, é de que ocorre uma estimulação das células-L através de mecanismos indiretos, já que a glicose é rapidamente absorvida nas regiões proximais do TGI, assim não alcançaria as porções mais distais em altas concentrações, onde há maior número de células-L(24).

Um efeito diferencial de gorduras saturadas e monoinsaturadas na secreção pós-prandial de GLP-1 em sujeitos saudáveis e pacientes diabéticos já foi observada(21,22). Os MUFAs parecem, portanto, ser potentes estimuladores da secreção de GLP-1, tanto em enterócitos cultivados de ratos quanto *in vivo*, já que possuem estrutura de cadeia longa (25).

Outros secretagogos

Além da estimulação luminal por nutrientes, um número adicional de peptídeos intestinais e neurotransmissores, bem como hormônios sistêmicos, parecem modular a secreção de GLP-1(13).

Estes incluem somatostatina, através de feedback negativo com GLP-1; GABA, aumentando a liberação de GLP-1 e agonistas α e β -adrenérgicos, os quais, respectivamente, inibem e estimulam a secreção de GLP-1 através das células-L intestinais de ratos perfundidos.

A leptina também apresenta certo papel no estímulo à liberação de GLP-1 em humanos e roedores, efeito este, abolido na presença de resistência à leptina em ratos obesos. A insulina parece ser um importante secretagogo de GLP-1, já que em situação de resistência insulínica e obesidade e DM2 os níveis de GLP-1 encontram-se reduzidos(13).

2.1.4. Degradação

A degradação de GLP-1 ocorre devido à ação da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), que se expressa não só na borda em escova dos enterócitos, mas também nas células endoteliais que revestem os vasos capilares da lâmina própria. Ademais, esta enzima também é responsável pelo metabolismo extremamente rápido de GLP-1, resultando em uma meia-vida no plasma de 2-1 min, produzindo uma taxa de depuração metabólica superior ao quadrado da cardíaca. O metabólito também é rapidamente eliminado, principalmente nos rins, com meia-vida de 4-5 min(26).

Devido à degradação extensiva, a concentração plasmática do hormônio intacto é muito baixa podendo não aumentar significativamente em resposta a pequenas refeições. A determinação da concentração do metabólito, que será muito maior, pode revelar que houve estimulação das células-L(27).

2.1.5 Ação

Fome e Saciedade

Os neurônios responsáveis pela expressão do pré-proglucagon estão localizados no tronco cerebral, desenvolvendo um papel na regulação da ingestão alimentar. Tem-se demonstrado que tais neurônios projetam-se em áreas hipotalâmicas, as quais já se sabe estarem envolvidas tanto na regulação da ingestão alimentar quanto hídrica (28-31).

Mecanismos Centrais

Através de sua ação no SNC, o GLP-1 provoca um aumento da temperatura, juntamente com a secreção de hormônios hipofisários, incluindo hormônio estimulador da tireóide, hormônio luteinizante, e vasopressina. Em camundongos com mutação do receptor para GLP-1 (GLP-1R^{-/-}), a principal função do eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é preservada, embora haja um aumento nas concentrações de corticosteróides em resposta ao estresse(32).

A administração intracerebroventricular de GLP-1 possui um efeito anorexígeno, suprimindo o consumo energético em ratos (33-36).

Mecanismos Periféricos

Sabe-se que a administração periférica de receptores antagonistas de GLP-1 inibe o esvaziamento gástrico(37) e suprime a ingestão alimentar tanto em ratos(38) quanto em humanos (39-42).

O GLP-1 periférico também está relacionado à saciedade, uma vez que a administração exógena de GLP-1 reduz o volume da refeição em ratos³⁶ e em primatas não-humanos(43). Em seres humanos, a administração oral de análogos de GLP-1 ocasiona aumento de seus níveis circulantes, mantendo-os em variações fisiologicamente normais, inibindo a alimentação e promovendo aumento da saciedade(44).

A administração intravenosa de GLP-1 ocasionou um aumento da sensação de saciedade e plenitude, além de atenuar a fome e a vontade de comer, bem como reduziu significativamente o consumo de alimentos por meio da inibição do esvaziamento gástrico, resultando na redução do peso corporal em humanos saudáveis(39).

Em um estudo conduzido por seis semanas verificou-se um decréscimo de cerca de 15% na ingestão alimentar e redução do IMC em pacientes com DM2 submetidos à infusão subcutânea contínua ou injeções subcutâneas de GLP-1, quatro vezes ao dia antes das refeições, comparando à infusão de soro fisiológico(45).

Poucos trabalhos acerca do papel fisiológico do GLP-1 periférico na saciedade foram conduzidos, estudos adicionais são necessários para analisar o papel e/ou o comportamento do GLP-1 na obesidade. Entretanto, um estudo mostra que reduzida concentração de GLP-1 foi observada em indivíduos obesos(7).

Secreção de Insulina e Células- β Pancreáticas

São muitas as ações periféricas do GLP-1. Além do seu efeito incretina, também exerce um papel protetor e proliferativo para as células- β pancreáticas em roedores (46-49).

O efeito agudo de agonista de receptor de GLP-1 nas células- β promove o aumento da liberação de insulina glicose-dependente, seguido por um aumento da biossíntese deste hormônio por meio da estimulação da transcrição do seu gene(50). Embora sejam necessários maiores esclarecimentos sobre os mecanismos responsáveis por tais efeitos, acredita-se que são mediados por AMP-c, proteínas transportadoras de glicose, atividade dos canais de potássio e cálcio e proteínas kinase(51).

Em indivíduos saudáveis, a infusão do antagonista de receptor de GLP-1, durante o teste de tolerância à glicose, aumentou a área sobre a curva (AUC) e o pico pós-prandial dos níveis glicêmicos. Em pacientes diabéticos, o efeito desta incretina parece encontrar-se perdido ou diminuído(42).

A administração parenteral de GLP-1 em pacientes diabéticos mostrou uma pronunciada resposta insulínica, todavia, o padrão secretório de GLP-1 no DM 2 ainda não está completamente elucidado(43).

2.2 Peptídeo YY (PYY)

O peptídeo YY (PYY) é um polipeptídeo secretado por células enteroendócrinas do tipo L, principalmente a partir do íleo e do cólon(1). Em 1980, Tatemoto e Mutt isolaram o PYY pela primeira vez, a partir da mucosa intestinal de porcos(52). Sua nomenclatura se deve à presença do aminoácido tirosina (abreviação: Y) em ambas as extremidades N- e C-terminal da cadeia linear de 36 aminoácidos que forma sua estrutura, sendo que sua extremidade C-terminal possui a tirosina ligada a um grupo -NH₂, formando uma amida C-terminal(53) . Em 1988, Tatemoto et al. isolaram e identificaram a seqüência de aminoácidos do PYY humano(54). As estruturas diferem nos aminoácidos das posições 3, com substituição de alanina por isoleucina, e 18, com substituição de serina por asparagina.

2.2.1 Síntese e estrutura molecular

O PYY pertence à família de peptídeos que inclui neuropeptídeo Y (NPY) e polipeptídeo pancreático (PP), chamada de família *PP-fold*. Essa denominação se dá porque a cadeia de aminoácidos dos peptídeos dobra sobre si mesma, formando uma curva acentuada, semelhante à letra U(55).

A estrutura dos membros da família *PP-fold* caracteriza-se pela presença de uma hélice de prolina, formada por resíduos de prolina nas posições 2, 5 e 8, ligada à extremidade N-terminal. A hélice de prolina é conectada, por uma região chamada de giro β , a uma α -hélice anfipática(56), que por sua vez é seguida por resíduos configurados em curva flexível, ligados à extremidade C-terminal(57) (Figura3).

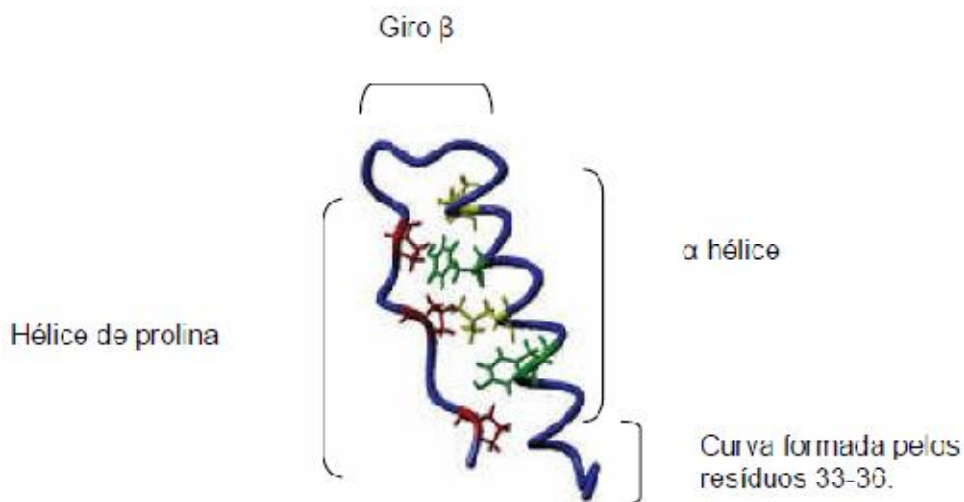


Figura 3. Imagem representativa da estrutura do PYY humano.

As formas moleculares ativas circulantes de PYY são: PYY₁₋₃₆ e PYY₃₋₃₆ (58). O PYY 3-36 se origina da ação da enzima dipeptidil peptidase - IV (DPP-IV), que cliva o dipeptídeo tirosina-prolina (Tyr-Pro) da extremidade N-terminal do PYY₁₋₃₆ (14), a qual constitui a forma predominante no período pós-prandial(59)(60).

2.2.2 Estímulo e Regulação da Secreção

Os efeitos desses peptídeos se dão via receptores do tipo Y, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G, dos quais cinco subtipos foram clonados em mamíferos: Y1, Y2, Y4, Y5 e y6(61). Em primatas, o gene que codifica o y6 é considerado um pseudo-gene, uma vez que não leva à expressão de proteína funcional(62). Os subtipos de receptores Y possuem diferentes graus de afinidade com PYY, NPY e PP: Y1 tem como ligantes mais potentes as formas não clivadas de NPY e PYY; Y2 possui maior afinidade por formas clivadas de NPY e PYY, que

possuem somente a extremidade C-terminal; Y4 tem como ligante mais potente o PP; e Y5 possui maior afinidade por NPY(62).

Os níveis circulantes de PYY são baixos no jejum, elevando-se após ingestão alimentar, atingindo picos geralmente entre 60 e 120 minutos(63, 64, 65), podendo se manter elevados por até cinco horas(66). Essa mudança pós-prandial indica que o PYY pode agir como um sinal de saciedade(67). No período pós-prandial, a forma PYY₃₋₃₆ predomina, representando 54% dos níveis circulantes de PYY(60).

Mesmo antes de chegarem às partes mais distais do intestino, onde as células êntero-endócrinas contendo PYY estão presentes em maior quantidade, os nutrientes já provocam a liberação desse peptídeo na circulação(68), indicando que durante a alimentação, a secreção de PYY pode ser também regulada por mecanismos neurais, através do nervo vago, por mecanismos humorais, via liberação de CCK(61), ou ainda por mecanismos de transdução sensorial, com participação de receptores gustativos presentes nas células êntero-endócrinas, os quais são ativados por contato direto com nutrientes(62). Distensão gástrica(69), consumo hídrico(70), alimentação simulada(71) e adoçantes artificiais não calóricos(72) não alteram a secreção de PYY.

Estímulo por Diferentes Nutrientes

A composição da dieta e os tipos de macronutrientes influenciam a secreção de PYY de maneiras diferentes, tendo lipídeos e proteínas efeitos mais pronunciados do que carboidratos (63).

Um estudo em roedores comparou o consumo de: sacarose, glicose e frutose adicionada à água disponível para consumo diário. Os dois primeiros apresentaram níveis plasmáticos de PYY maiores após 24 horas, quando comparados ao grupo controle. Após uma semana, não houve diferença entre os grupos, mas ao final de duas semanas, todos os grupos apresentaram níveis plasmáticos de PYY menores que o controle, sem diferenças entre si(73).

Em humanos, infusões intra-gástricas de soluções contendo glicose ou frutose (diluídas em quantidades ajustadas para intensidade de doçura em relação à sacarose) elevaram os níveis plasmáticos de PYY total, em comparação com os níveis de jejum, após 28 minutos para infusão de glicose e após 38 minutos da infusão de frutose. Porém, em 120 minutos, a resposta secretória de PYY foi maior somente para glicose. As soluções foram preparadas para se igualarem em intensidade de doçura e, portanto, não foram isocalóricas, já que o poder de doçura da glicose é menor que o da frutose, o que pode dificultar a interpretação desses resultados(72), visto que, as preparações de maior volume, podem promover um aumento precoce nos níveis de PYY(61).

Lipídeos são os mais potentes estimuladores da secreção de PYY(74). O comprimento da cadeia dos ácidos graxos parece ser crucial para esse efeito, sendo que ácidos graxos de cadeia longa promovem maior resposta secretória quando comparados com ácidos graxos de cadeia média(60). Poucos estudos avaliaram até o momento a influência do grau de saturação de lipídeos na secreção do PYY. Há discordância na literatura em relação à existência de diferenças na capacidade estimulatória de gordura saturada e monoinsaturada na secreção do PYY(75, 76). Um estudo mostrou que a secreção de PYY é estimulada de maneira similar tanto por sobrecarga de ácidos graxos saturados como por ácidos graxos monoinsaturados(76), enquanto outro estudo mostrou que a secreção de PYY é estimulada de maneira mais potente por ácidos graxos monoinsaturados .

2.2.3 Ação

3.3.1- Fome e Saciedade

A administração de PYY pode resultar em alterações no comportamento alimentar, causando tanto efeitos orexígenos quanto anorexígenos(77).

Mecanismos Centrais

Administradas centralmente, as duas formas de PYY podem levar a efeitos opostos, dependendo do sítio de administração. Em ratos alimentados, PYY₁₋₃₆ administrado no núcleo paraventricular levou à hiperfagia(78), efeito este, também foi causado após administração intracerebroventricular de PYY₁₋₃₆ em camundongos(79) e de PYY₃₋₃₆ em ratos(80). Tal ação orexígena de ambas as formas do PYY, após serem administradas nessas regiões, pode ser atribuída à ativação de receptores Y1 e Y5, pois camundongos deficientes nos dois receptores não apresentaram comportamento hiperfágico(81). Após administração direta no núcleo arqueado de ratos em jejum, o PYY₃₋₃₆ levou à redução da ingestão alimentar cumulativa de 2 horas(82), efeito provavelmente mediado por receptores Y2, expressos em grande quantidade nesse núcleo hipotalâmico(83).

Mecanismos Periféricos

Quando administrado periféricamente, a principal ação do PYY é a redução da ingestão alimentar(82). Injeções intraperitoniais de PYY₃₋₃₆ em roedores em jejum(82) ou sem privação alimentar(84), logo antes do início da fase escura, durante a qual os roedores exibem maior consumo(85), levaram à redução da ingestão alimentar cumulativa de até 24 horas.

Em camundongos apresentando obesidade induzida por dieta hiperlipídica, infusões subcutâneas diárias de PYY₃₋₃₆, durante 28 dias, provocaram redução da ingestão alimentar cumulativa e do peso corporal(86).

A forma PYY₁₋₃₆, que é orexígena quando administrada centralmente (87) (78), apresenta efeito anorexígeno quando administrada periféricamente em ratos(88) e em camundongos(89). Tal efeito pode se dar devido à conversão periférica de PYY₁₋₃₆ em PYY₃₋₃₆, pela ação da DPP-IV(14). Em humanos, tanto indivíduos obesos quanto eutróficos se mostram sensíveis ao efeito inibitório no apetite causado pelo PYY₃₋₃₆ (82, 90). Em adultos eutróficos, PYY₃₋₃₆ reduziu a

ingestão calórica, o tempo de duração de uma refeição e a ingestão de líquidos, de maneira dose-dependente(64).

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Avaliar os efeitos de sobrecargas orais de diferentes tipos de lipídios, comparados à controle negativo (água) e positivo (glicose).na secreção de GLP-1 e PYY.

3.2 Objetivos secundários

- Observar os picos de secreção do GLP-1 e PYY após sobrecarga oral de diferentes tipos de nutrientes;
- Analisar a carga secretada (área sob a curva - AUC) da secreção de GLP-1 e PYY após sobrecarga oral de diferentes tipos de nutrientes;
- Correlacionar as cargas secretadas do GLP-1 e PYY;
- Determinar a proporção de secreção GLP-1 e PYY ;

4 Justificativa

Os mecanismos que regulam a secreção dos hormônios GLP-1 e PYY ainda não estão bem descritos.

Diferentes tipos de macronutrientes parecem estimular sua liberação. Há dados sobre o efeito estimulatório de carboidratos e lipídios. Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFAs) podem atuar de maneira distinta no estímulo à secreção da célula-L.

Devido ao fato destes peptídios estarem envolvidos no controle do apetite, sua secreção pode permitir uma melhor resposta a anormalidades metabólicas, bem como de mecanismos relacionados ao controle da ingestão alimentar, possibilitando novas intervenções em pacientes obesos e insulino-resistentes.

5 Referências bibliográficas da revisão

1. Onaga T, Zabielski R, Kato S. Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract. *Peptides*. 2002 Feb;23(2):279-90.
2. Nishida C, Ko GT, Kumanyika S. Body fat distribution and noncommunicable diseases in populations: overview of the 2008 WHO Expert Consultation on Waist Circumference and Waist-Hip Ratio. *Eur J Clin Nutr*. 2010 Jan;64(1):2-5.
3. Sartorelli DS, Franco LJ. [Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition]. *Cad Saude Publica*. 2003;19 Suppl 1:S29-36.
4. El Khoury D, El-Rassi R, Azar S, Hwalla N. Postprandial ghrelin and PYY responses of male subjects on low carbohydrate meals to varied balancing proportions of proteins and fats. *Eur J Nutr*. Apr 16.
5. Wu T, Zhao BR, Bound MJ, Checklin HL, Bellon M, Little TJ, et al. Effects of different sweet preloads on incretin hormone secretion, gastric emptying, and postprandial glycemia in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2012 Jan;95(1):78-83.
6. Rehfeld JF. Incretin physiology beyond glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: cholecystokinin and gastrin peptides. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Apr;201(4):405-11.
7. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, Wright JW, Howland R, Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut*. 1996 Jun;38(6):916-9.
8. Flock G, Baggio LL, Longuet C, Drucker DJ. Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice. *Diabetes*. 2007 Dec;56(12):3006-13.
9. Moller C, Sommer W, Thorsell A, Rimondini R, Heilig M. Anxiogenic-like action of centrally administered glucagon-like peptide-1 in a punished drinking test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002 Jan;26(1):119-22.
10. Vrang N, Larsen PJ. Preproglucagon derived peptides GLP-1, GLP-2 and oxyntomodulin in the CNS: role of peripherally secreted and centrally produced peptides. *Prog Neurobiol*. 2010 Nov;92(3):442-62.

11. Larsen PJ, Holst JJ. Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): hormone and neurotransmitter. *Regul Pept.* 2005 Jun 15;128(2):97-107.
12. Toft-Nielsen M, Hvidberg A, Hilsted J, Dige-Petersen H, Holst JJ. No effect of beta-adrenergic blockade on hypoglycaemic effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in normal subjects. *Diabet Med.* 1996 Jun;13(6):544-8.
13. Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ, Brubaker PL. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology.* 2009 Feb;150(2):580-91.
14. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept.* 1999 Nov 30;85(1):9-24.
15. Bojanowska E. Physiology and pathophysiology of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity, and stress. *Med Sci Monit.* 2005 Aug;11(8):RA271-8.
16. Track NS, Carlen PL. Motilin and human pancreatic polypeptide measured in CSF from alcoholic and non-alcoholic neurological patients. *Peptides.* 1986 Nov-Dec;7(6):1193-5.
17. Raben A, Holst JJ, Madsen J, Astrup A. Diurnal metabolic profiles after 14 d of an ad libitum high-starch, high-sucrose, or high-fat diet in normal-weight never-obese and postobese women. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2):177-89.
18. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Aug;297(2):G299-305.
19. Radulescu A, Gannon MC, Nuttall FQ. The effect on glucagon, glucagon-like peptide-1, total and acyl-ghrelin of dietary fats ingested with and without potato. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jul;95(7):3385-91.
20. Iakoubov R, Ahmed A, Lauffer LM, Bazinet RP, Brubaker PL. Essential role for protein kinase C ζ in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion in vivo in the rat. *Endocrinology.* 2011 Apr;152(4):1244-52.
21. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, et al. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 1999 Jun;69(6):1135-43.

22. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2003 Mar;77(3):605-11.
23. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005 Jan;11(1):90-4.
24. Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker PL. Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology.* 2001 Mar;142(3):1148-55.
25. Rocca AS, Brubaker PL. Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon-derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology.* 1995 Dec;136(12):5593-9.
26. Vilsboll T, Agero H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):220-4.
27. Nauck MA, El-Ouaghlidi A, Gabrys B, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, et al. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004 Nov 15;122(3):209-17.
28. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other proglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience.* 1997 Mar;77(1):257-70.
29. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Jessop DS. Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology.* 1997 Oct;138(10):4445-55.
30. Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 1999 Jan 11;403(2):261-80.
31. Rinaman L. Interoceptive stress activates glucagon-like peptide-1 neurons that project to the hypothalamus. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 2):R582-90.
32. Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, et al. Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the

enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1326-35.

33. Dakin CL, Gunn I, Small CJ, Edwards CM, Hay DL, Smith DM, et al. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology*. 2001 Oct;142(10):4244-50.

34. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Romer J, Vrang N. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):802-7.

35. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Goke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Moller M, et al. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol*. 1996 Oct;271(4 Pt 2):R848-56.

36. Tang-Christensen M, Vrang N, Larsen PJ. Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. *Diabetes*. 1998 Apr;47(4):530-7.

37. Schirra J, Houck P, Wank U, Arnold R, Goke B, Katschinski M. Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut*. 2000 May;46(5):622-31.

38. Larsen J, Hylleberg B, Ng K, Damsbo P. Glucagon-like peptide-1 infusion must be maintained for 24 h/day to obtain acceptable glycemia in type 2 diabetic patients who are poorly controlled on sulphonylurea treatment. *Diabetes Care*. 2001 Aug;24(8):1416-21.

39. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):515-20.

40. Gutzwiller JP, Drewe J, Goke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5 Pt 2):R1541-4.

41. Gutzwiller JP, Goke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, et al. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut*. 1999 Jan;44(1):81-6.

42. Zander M, Taskiran M, Toft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ. Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):720-5.
43. Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab*. 2008 Feb;34 Suppl 2:S73-7.
44. Froud T, Faradji RN, Pileggi A, Messinger S, Baidal DA, Ponte GM, et al. The use of exenatide in islet transplant recipients with chronic allograft dysfunction: safety, efficacy, and metabolic effects. *Transplantation*. 2008 Jul 15;86(1):36-45.
45. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*. 2002 Mar 9;359(9309):824-30.
46. Drucker DJ, Lovshin J, Baggio L, Nian M, Adatia F, Boushey RP, et al. New developments in the biology of the glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;921:226-32.
47. MacLusky NJ, Cook S, Scrocchi L, Shin J, Kim J, Vaccarino F, et al. Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Endocrinology*. 2000 Feb;141(2):752-62.
48. Holst JJ, Orskov C, Nielsen OV, Schwartz TW. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett*. 1987 Jan 26;211(2):169-74.
49. Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest*. 1987 Feb;79(2):616-9.
50. Ranganath LR. The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(1):43-56.
51. Kwan EP, Gaisano HY. Glucagon-like peptide 1 regulates sequential and compound exocytosis in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes*. 2005 Sep;54(9):2734-43.
52. Tatemoto K, Mutt V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature*. 1980 Jun 5;285(5764):417-8.

53. Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Sep;79(18):5485-9.
54. Tatemoto K, Nakano I, Makk G, Angwin P, Mann M, Schilling J, et al. Isolation and primary structure of human peptide YY. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Dec 15;157(2):713-7.
55. Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev*. 1998 Mar;50(1):143-50.
56. Nygaard R, Nielbo S, Schwartz TW, Poulsen FM. The PP-fold solution structure of human polypeptide YY and human PYY3-36 as determined by NMR. *Biochemistry*. 2006 Jul 11;45(27):8350-7.
57. Berglund MM, Hipskind PA, Gehlert DR. Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Mar;228(3):217-44.
58. Eberlein GA, Eysselein VE, Schaeffer M, Layer P, Grandt D, Goebell H, et al. A new molecular form of PYY: structural characterization of human PYY(3-36) and PYY(1-36). *Peptides*. 1989 Jul-Aug;10(4):797-803.
59. Grandt D, Schimiczek M, Beglinger C, Layer P, Goebell H, Eysselein VE, et al. Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regul Pept*. 1994 May 5;51(2):151-9.
60. Maas MI, Hopman WP, Katan MB, Jansen JB. Release of peptide YY and inhibition of gastric acid secretion by long-chain and medium-chain triglycerides but not by sucrose polyester in men. *Eur J Clin Invest*. 1998 Feb;28(2):123-30.
61. Burdyga G, de Lartigue G, Raybould HE, Morris R, Dimaline R, Varro A, et al. Cholecystinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach. *J Neurosci*. 2008 Nov 5;28(45):11583-92.
62. Steinert RE, Gerspach AC, Gutmann H, Asarian L, Drewe J, Beglinger C. The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clin Nutr*. 2011 Aug;30(4):524-32.

63. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. 1985 Nov;89(5):1070-7.
64. Degen L, Oesch S, Casanova M, Graf S, Ketterer S, Drewe J, et al. Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology*. 2005 Nov;129(5):1430-6.
65. Lomenick JP, Clasey JL, Anderson JW. Meal-related changes in ghrelin, peptide YY, and appetite in normal weight and overweight children. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Mar;16(3):547-52.
66. Moran TH, Smedh U, Kinzig KP, Scott KA, Knipp S, Ladenheim EE. Peptide YY(3-36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Feb;288(2):R384-8.
67. Stock S, Lechner P, Wong AC, Ghatgei MA, Kieffer TJ, Bloom SR, et al. Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr;90(4):2161-8.
68. Fu-Cheng X, Anini Y, Chariot J, Voisin T, Galmiche JP, Roze C. Peptide YY release after intraduodenal, intraileal, and intracolonic administration of nutrients in rats. *Pflugers Arch*. 1995 Nov;431(1):66-75.
69. Oesch S, Ruegg C, Fischer B, Degen L, Beglinger C. Effect of gastric distension prior to eating on food intake and feelings of satiety in humans. *Physiol Behav*. 2006 May 30;87(5):903-10.
70. Pedersen-Bjergaard U, Host U, Kelbaek H, Schifter S, Rehfeld JF, Faber J, et al. Influence of meal composition on postprandial peripheral plasma concentrations of vasoactive peptides in man. *Scand J Clin Lab Invest*. 1996 Oct;56(6):497-503.
71. Symersky T, Biemond I, Frolich M, Masclee AA. Effect of peptide YY on pancreatico-biliary secretion in humans. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Aug;40(8):944-9.
72. Steinert RE, Frey F, Topfer A, Drewe J, Beglinger C. Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br J Nutr*. 2011 May;105(9):1320-8.

73. Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept.* 2008 Oct 9;150(1-3):26-32.
74. Adrian TE, Savage AP, Sagor GR, Allen JM, Bacarese-Hamilton AJ, Tatemoto K, et al. Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology.* 1985 Sep;89(3):494-9.
75. Feltrin KL, Little TJ, Meyer JH, Horowitz M, Rades T, Wishart J, et al. Comparative effects of intraduodenal infusions of lauric and oleic acids on antropyloroduodenal motility, plasma cholecystokinin and peptide YY, appetite, and energy intake in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2008 May;87(5):1181-7.
76. Maljaars J, Romeyn EA, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr.* 2009 Apr;89(4):1019-24.
77. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg.* 2006 May;16(5):651-8.
78. Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides.* 1985 Nov-Dec;6(6):1205-11.
79. Miura M, Inui A, Sano K, Ueno N, Teranishi A, Hirose Y, et al. Dynorphin binds to neuropeptide Y and peptide YY receptors in human neuroblastoma cell lines. *Am J Physiol.* 1994 Nov;267(5 Pt 1):E702-9.
80. Tschöp M, Castaneda TR, Joost HG, Thone-Reineke C, Ortmann S, Klaus S, et al. Physiology: does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature.* 2004 Jul 8;430(6996):1 p following 165; discussion 2 p following
81. Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, et al. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 2000 Mar;141(3):1011-6.
82. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 2002 Aug 8;418(6898):650-4.

83. Broberger C, Landry M, Wong H, Walsh JN, Hokfelt T. Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*. 1997 Dec;66(6):393-408.
84. Nordheim U, Hofbauer KG. Stimulation of NPY Y2 receptors by PYY3-36 reveals divergent cardiovascular effects of endogenous NPY in rats on different dietary regimens. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Jan;286(1):R138-42.
85. Clifton PG. Meal patterning in rodents: psychopharmacological and neuroanatomical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Mar;24(2):213-22.
86. Pittner RA, Moore CX, Bhavsar SP, Gedulin BR, Smith PA, Jodka CM, et al. Effects of PYY[3-36] in rodent models of diabetes and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Aug;28(8):963-71.
87. Nakajima M, Inui A, Teranishi A, Miura M, Hirosue Y, Okita M, et al. Effects of pancreatic polypeptide family peptides on feeding and learning behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Feb;268(2):1010-4.
88. Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. Intravenous infusion of glucagon-like peptide-1 potently inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Jun;288(6):R1695-706.
89. Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, et al. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1325-36.
90. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):941-8.
91. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):E981-8.
92. Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology*. 1988 Oct;123(4):2009-13.

93. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, et al. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*. 2000 May;49(5):741-8.
94. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes*. 1999 Dec;48(12):2358-66.
95. Dossat AM, Lilly N, Kay K, Williams DL. Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake. *J Neurosci*. 2011 Oct 12;31(41):14453-7.
96. Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract Project Directly to the Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens to Control for Food Intake. *Endocrinology*. 2011 Nov 29.
97. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, Whiteside CI, Brubaker PL. Protein kinase Czeta is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*. 2007 Mar;148(3):1089-98.
98. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1058-66.
99. Little TJ, Feinle-Bisset C. Oral and gastrointestinal sensing of dietary fat and appetite regulation in humans: modification by diet and obesity. *Front Neurosci*. 2010;4:178.
100. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):270-99.
101. Aponte GW, Park K, Hess R, Garcia R, Taylor IL. Meal-induced peptide tyrosine tyrosine inhibition of pancreatic secretion in the rat. *FASEB J*. 1989 Jun;3(8):1949-55.
102. Serrano P, Yago MD, Manas M, Calpena R, Mataix J, Martinez-Victoria E. Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid secretion and release of gastrin, somatostatin, and peptide YY in man. *Dig Dis Sci*. 1997 Mar;42(3):626-33.

6 ARTIGO

ACUTE EFFECT OF AN OVERLOAD OF MONOUNSATURATED AND SATURATED FATTY ACIDS ON GLP-1 AND PYY RELEASE IN WISTAR RATS

Jornada MN¹, Antunes LC¹, Foletto KC¹, Batista BM², Bertoluci MC^{1,3}

¹ Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

² Nutrition student, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

³ Internal Medicine Division, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

From the Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. Supported by the Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Conflict of Interest: There was no financial relationship between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

Corresponding author: Marcello Casaccia Bertoluci

Internal Medicine Service of HCPA, UFRGS

2350 Ramiro Barcelos St.

Zip Code 90035-903. Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: + 55 51 3359 8152

e-mail address: mbertoluci@uol.com.br

Running title: GLP-1, PYY, monounsaturated fatty acids, saturated fatty acids

Abstract

Aims: To evaluate the effects of an acute oral overload of different lipids, compared to control in the release of GLP-1 and PYY. **Material and Methods:** We conducted a controlled experimental study in Wistar rats, divided according to oral overload: MUFA group (olive oil), SAT group (lard), GLUC group (glucose) and CONT group (water). We evaluated active GLP-1 and PYY₃₋₃₆ measures at the following times: 0, 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after the oral load and then area under the curve (AUC). Statistical significance was determined as $p \leq 0.05$. **Results:** We found a significant GLP-1 increase in the MUFA group at 30' when compared to its baseline ($p=0.01$) and a higher GLP-1 secretion peak at 120' compared to CONT and GLUC ($p \leq 0.001$). We demonstrated a PYY release peak in MUFA vs CONT at time 30' ($p=0.015$) 60' vs CONT and GLUC ($p=0.019$) and 120' vs CONT and SAT ($p=0.02$). PYY AUC was higher in the MUFA group when compared to CONT ($p=0.04$). A strong correlation was seen between PYY and GLP-1 ($r=0.57$; $p=0.02$). **Conclusions:** MUFAs promoted a slight but significant peak of GLP-1 compared to saturated fatty acid load. MUFAs also provoked an increase in PYY release while saturated fat overload did not, which was more vigorous and sustained than the GLP-1. The secretions of both peptides are correlated with each other, indicating that they may be co-secreted after MUFA load. MUFA may have a unique mechanism for GLP-1 and PYY release not seen with saturated fat overload in this study.

KEYWORDS

GLP-1, PYY, insulin, glucose, monounsaturated fatty acids, saturated fatty acids.

Introduction

According to the World Health Organization, there are 300 million obese people worldwide(1). The prevalence of chronic diseases such as dyslipidemia, hypertension and diabetes mellitus type 2 (DM2) has increased due to the increase in obesity(2).

Peptides secreted by the gastrointestinal tract, such as glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and peptide YY (PYY), play a fundamental role in controlling food intake, sending satiety signals to the central nervous system (CNS), producing anorexic or orexigenic responses. GLP-1 is produced by the pro-glucagon gene in the entero-endocrine L-cells of the small bowel and colon in response to nutrients. It is a gut hormone that exerts the known incretin effect stimulating the release of insulin in a glucose-dependent manner. Subsequent investigations confirmed that GLP-1 is the most important prandial hormone responsible for insulin secretion(3). Besides its insulinotropic effects, it is well established that GLP-1 slows gastric emptying(4), and also inhibits inappropriate glucagon release(5), stimulates beta cell proliferation and differentiation in rats and *in vitro*(6, 7) and additionally improves satiety(8, 9).

Another peptide that plays an important role in controlling the satiety mechanisms is peptide YY (PYY). PYY, like GLP-1, is also secreted by L-cells of the distal ileum(10) in response to the amount of calories ingested. A truncated form, PYY₃₋₃₆, exerts anorectic action and is apparently mediated through the inhibitory actions *via* NPY-2 receptors highly expressed in orexigenic NPY neurons in the hypothalamic arcuate nucleus in the hypothalamus (11). The acute peripheral administration of PYY₃₋₃₆ resulted in a significant reduction of food intake and body weight suggesting its potential therapeutic application for obesity treatment(12).

Mechanisms by which nutrients stimulate GLP-1 and PYY release have not been completely elucidated. Macronutrients influence the release of these gut peptides in different ways. Lipids are the most potent stimulators of their secretion and the chain size of fatty acids appears to be crucial to this effect. Long chain fatty acids can promote a greater secretory response when compared with medium-chain

fatty acids(13). The effect of lipids in gut peptides secretion however is (ou has not been completely) not completely understood, especially in respect of the effect of monounsaturated and saturated fatty acids after an acute load in GLP-1, PYY and insulin.

Moreover, this knowledge allows the development of new allies as therapeutic tools in the treatment of obesity and its comorbidities, especially regarding food intake and glycemic control.

The aim of the present study was to verify whether an oral macronutrient overload may cause an effect on PYY, GLP-1 and insulin release.

Materials and Methods

Study design

We conducted a controlled experiment with an acute overload of 2 different types of fatty acids and compared to water and glucose overload.

Animals

A total of 44 male Wistar rats, weighing 200-300g, was included in this study. Animals were randomized by body weight. Groups were determined according to their macronutrient overload through gavage: CONT group (water as vehicle); GLUC group (glucose 80%); SAT group (lard) and MUFA group (olive oil). All overloads were isovolumetric (the total volume was calculated to occupy 80% of animal gastric capacity) and isocaloric (MUFA, SAT and GLUC groups received a mean of 0.026Kcal/g per body weight) except in the CONT group.

Animals were kept in a 12/12hr light-dark cycle and fed with standard chow and water *ad libitum*. The night before experimentation animals were kept in overnight fasting (12 hour). After 12-hour overnight fasting, blood was collected from the retro-orbital artery in a glass cannula directly to an eppendorf tube at baseline (0) and the following time points: 15', 30', 60', 90' and 120 minutes after the load.

All experimental procedures were performed in accordance with institutional animal welfare guidelines and approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

GLP-1, PYY, Insulin and Glucose measurements

GLP-1, PYY and Insulin were determined by Luminex® using Milliplex Rat Map Gut Hormone Panel - 03 plex kits purchased from Linco® Research (purchased by Millipore, Billerica, MA). During the blood collection an appropriate amount of dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor was added to stabilize GLP-1. Blood was mixed with dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor within less than 30 sec after collection. Then it was immediately placed in an ice bath and centrifuged at 1000xg for 10 minutes, to separate serum according to the manufacturer's instructions. Capillary blood collected

from the tail was used to determine glucose values by glucometer (Medisense Optium Xceed Meter).

Statistics

A comparison of continuous variables and differences between groups was performed by ANCOVA with Bonferroni correction. The area under the curve (AUC) was determined by the trapezoidal method and analyzed by ANOVA with Tukey. Correlations were performed by Pearson's correlation test. Statistical significance was determined as $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0 for Windows. The results were presented as mean and standard error for all parameters

Results

Table 1 shows baseline measures concerning body weight, insulin, glycemia, GLP-1 and PYY levels. There was no difference among groups regarding weight, fasting glycemia, fasting insulin, fasting GLP-1 and fasting PYY.

GLP-1

We verified that the MUFA group presented a slight but significant increased peak secretion of GLP-1 at 30 minutes in relation to baseline and an increased secretion at 120' minutes when compared to the CONT and GLUC groups respectively; ($p \leq 0.001$) (Figure 1b). When we evaluated the area under the curve (AUC), meaning the whole secretion load in time, there were no differences between groups (Figure 1a). There was also no change in GLP-1 secretion in relation to baseline or to the SAT or GLUC or CONT groups.

PYY

In the MUFA group, PYY was significantly increased from baseline at 60 minutes (Fig 2b). PYY released response was also higher in the MUFA group than CONT at time point 30' ($p=0.13$). (Moreover, the MUFA group showed higher PYY secretion when compared to the CONT and GLUC groups at time point 60' ($p=0.019$). The area under the curve (AUC) was significant higher in the MUFA group than in the CONT group ($p=0.04$) (Figure 2a). At time point 120' the MUFA group presented a higher PYY level than the CONT and SAT groups ($p=0.02$) (Figure 2b).

Insulin and Glucose

Insulin release was unchanged in MUFA and in the SAT and CONT groups. Significantly augmented insulin secretion was seen only in the GLUC group at time point 15 minutes ($p=0.003$) (Figure 4b). As expected, the AUC of both glycemia and insulinemia was significantly higher only in the GLUC group when compared to other groups as well as their released loads (Figure 3a and 4a). Glycemic levels of the GLUC group were higher at time points 15', 30', 60', 90' and 120' compared to all

other groups. There was also a significant peak in glucose concentration at 60 and 120 minutes in the SAT group in relation to baseline. This was an expected result since the GLUC group was the positive control (Figure 3b).

Correlations

A strong correlation was found between GLP-1 and PYY basal secretion levels ($p= 0.02$). It was also observed that the correlation was maintained when post-overload secretion was evaluated through area under the curve (AUCs) of GLP-1 and PYY ($p\leq 0.001$) (Figure 6a e 6b).

PYY / GLP-1 secretion proportion

As to the release proportion of GLP-1/PYY, a sustained relation of 3.77 to 1 was seen during the 120 minute period (data not shown).

Discussion

GLP-1

In the present study we found a slight peak of GLP-1 after monounsaturated fatty acids (MUFAs) at time point 30', which represents an increase of 1.3 times in relation to baseline. This did not occur in the group that received saturated fatty acid (SFA). The MUFA group also presented a higher release peak at time point 120' in relation to controls. The entire secreted load of GLP-1 did not differ among groups.

Only a few studies have assessed the use of monounsaturated fats in acute GLP-1 secretion. In the study of Lakoubov *et al*, using intravenous and rectal infusion of long chain fatty acids an augmentation of GLP-1 secretion was shown compared to the use of short and medium chain fatty acids or vehicle, and this increase was obtained at 60 minutes after the load(14). The GLP-1 range went from 2 up to 8 times above baseline. The present study is in accordance with this, however the higher levels observed in the aforementioned study were probably due to the administration mode and the type and dose of the macronutrient chosen. Yet, this 8-fold increase may be closely related to monounsaturated fatty acids (long chain fatty acids) administered through rectal administration, since the end of the small bowel and colon is the area with the highest L-cell concentration. Therefore, the minor increase found in our study may be due to the more physiological administration route (oral) chosen, reinforcing the hypothesis that there is a possible association between long-chain fatty acids and GLP-1 release by means of L-cell stimulation in the distal ileum.

The impact of macronutrients on humans was also evaluated in terms of gut peptide regulation and glycemic control, during six months by 3 different isocaloric diets (MUFA; MUFA + low glycemic index diet and standard diet). MUFA, regardless of glycemic index, was associated with augmented baseline levels of GLP-1 and PYY, besides improved glycemic levels(15). Although we have developed an acute experimental study in rats, our findings agree with this, since we reported an increase of GLP-1 and PYY release mediated by MUFA. We can also speculate regarding

allegedly approved glycemic response, which can be ascribed to the fact that the MUFA group did not show a difference in its glucose levels during the experiment.

We found that although a huge amount of lipid overload was given, only a slight peak of GLP-1 was elicited that was not sufficient to elicit further stimulus in insulin secretion. The literature reports a more sustained peak in both healthy and insulin resistant(27) humans and in rats after intravenous(14) and rectal(14) infusion of MUFAs. However we did not find a study with an oral overload of MUFAs and insulin response in rats. We believe that the MUFA effect in GLP-1 might not be relevant for inducing an acute significant alteration in the glucose-insulin relation at least in the time observed.

Mechanisms involved in the macronutrient stimulus for GLP-1 luminal stimulation are still emerging. The presence of a G-protein-coupled receptor, named GPR 120, is abundantly expressed in the intestine, functioning as a receptor for unsaturated long-chain free fatty acids which indirectly can promote glucose-stimulated insulin secretion by stimulating GLP-1 release. Free fatty acids (FFAs) evoke a specific increase in the intracellular calcium concentration which increases the phosphorylated kinase regulatory signal (ERK; p44/42), stimulating the release of GLP-1. Apparent stimulatory activities were detected for free fatty acids with an unsaturated chain length of C₁₆ to C₂₂². Besides that, some membrane transport proteins associated with fatty acids, as well as intracellular fatty acids binding proteins have been described that can modulate the Protein Kinase-C ζ (PKC ζ) activity in oleic acid-induced GLP-1 secretion(16-18).

PYY

The MUFA group presented a substantially higher secretion load of PYY than the SAT and CONT group. Our finding suggests that MUFAs may promote a more vigorous and sustained release of PYY than GLP-1. This finding is in accordance with previous studies (19)(20)(21), which describe the impact of macronutrients on the secretory response of PYY, suggesting that lipids play a major role in stimulating its release.

Additional studies indicate that differences in the nature and degree of saturation of fatty acids exert distinct effects on the secretory stimulus of PYY⁸⁻⁹⁻¹⁰. It was demonstrated that intraduodenal infusions of long-chain fatty acids (fish oil with 20-22 carbons and corn oil 18 carbons) elevate total PYY by 1.7 times when compared to fasting levels (22). Similarly to corn oil, olive oil, used in our study as the source of MUFA, is also a long-chain fatty acid as it is composed by 74% of monounsaturated fatty acids with a chain length containing 18 to 24 carbons. Therefore, the length of the chain may have an important role in the secretion stimulus of PYY.

In another study it was shown that administration of corn oil into the duodenum and ileum did not stimulate PYY release beyond baseline levels during 120 minutes. On the other hand, oleic acid (MUFAs) produced significant secretory responses 60 minutes after its administration (23). In accordance with this finding, we evidenced an increase of the stimulatory response of PYY induced by oleic acid. However, this increase occurred at time point 30'. One of the possible causes concerning this difference between findings may be the administration route, since we chose a more physiological one. Another consideration related to PYY release would be the vagal tone stimulation and humoral stimulus through CCK release (24). However our findings do not indicate a significant role for vagal tone stimulation of PYY release because the CONT group, which was submitted to a similar gastric volume overload, did not show an increase in PYY secretion in the period studied.

As both PYY and GLP-1 are secreted by intestinal L-Cells it is not surprising that their secretion might be related to each other in vivo. Ballantynes *et al.*, demonstrated that pharmacological infusions of GLP-1 can induce a decrease in basal PYY levels in humans, suggesting that GLP-1 augmentation directly inhibits PYY entero-endocrine L-cell secretion (25). Thus, GLP-1 would participate in a biofeedback loop which auto-regulates intestine L-cells secretion and down-regulates PYY release. In the present study, however, we did not confirm this finding, but we found it interesting that there was a strong correlation between GLP-1 and PYY, indicating that both peptides may be co-secreted by L-cells and also that the

proportion of secretion (PYY to GLP-1 3:1) was similar in the fasting state as well as after MUFA overload. In this study it was impossible to define if any down-regulation occurred because we did not infuse any of these peptides.

It should be noted that currently there are no studies focusing on the discovery of specific receptors for long-chain fatty acids that can stimulate PYY release, such as the GPR 120 for GLP-1 (18). It is possible that PYY and GLP-1 are co-secreted by entero-endocrine L-cells, but the assumption that this receptor may also be able to increase PYY release may be considered in future studies.

Comparing glucose and insulin excursion between MUFA and SAT groups, there was no significant change, but SAT increased baseline-related glucose levels while MUFA did not.

If monounsaturated fatty acids have the ability to stimulate GLP-1 release (26) then it is to be expected that it could indirectly stimulate the release of insulin in an insulinotropic effect on the beta-cell, however it was not found in the present study. On the other hand, the SAT group induced a slight increase in glucose concentration which could not be explained by any down-regulation in insulin. We wondered whether the stress in animals, caused by gavage and pain during eye blood collection may have been more intense in some animals, and whether may have led to the acute rise in the glucose level. However we cannot discharge an intrinsic effect of saturated fat on glucose metabolism through a diverse mechanism.

In conclusion, we demonstrated that an oral overload of monounsaturated fat does stimulate a slight secretory response of GLP-1 and a huge secretory response in PYY in non-obese rats. Further studies are necessary to verify if these effects can influence satiety, and also if they are impacted by a change from an insulin-sensitive state to an insulin-resistant state.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa-FIPE/HCPA. The authors also thank the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Animal Experimentation Unit (UEA/HCPA), Marta Cioato and Fabiola Meyer.

Table 1. Baseline data expressed as mean \pm standard error.

	CONT (n=9)	GLUC (n=9)	MUFA (n=9)	SAT (n=9)	<i>p</i>
Weight (g)	290,4 (\pm 4,1)	290,5 (\pm 5,5)	289,2 (\pm 4,5)	286,9 (\pm 3,5)	0,94
Glycemia (mg/dl)	103,9 (\pm 6,2)	104,4 (\pm 5,9)	103,3 (\pm 5,9)	101,6 (\pm 5,9)	0,27
Insulinemia (pg/ml)	353,8(\pm 89,1)	462,2(\pm 89,1)	340,2(\pm 88,9)	387,5(\pm 89,3)	1,0
GLP-1 (pg/ml)	145,1 (\pm 12,5)	141,6 (\pm 12,5)	118,4 (\pm 12,5)	128,5 (\pm 12,6)	0,28
PYY (pg/ml)	48,5 (\pm 8,5)	55,7 (\pm 9,0)	35,5 (\pm 8,5)	38,4 (\pm 9,0)	0,23

Figure 1.a. Area under the curve of GLP-1

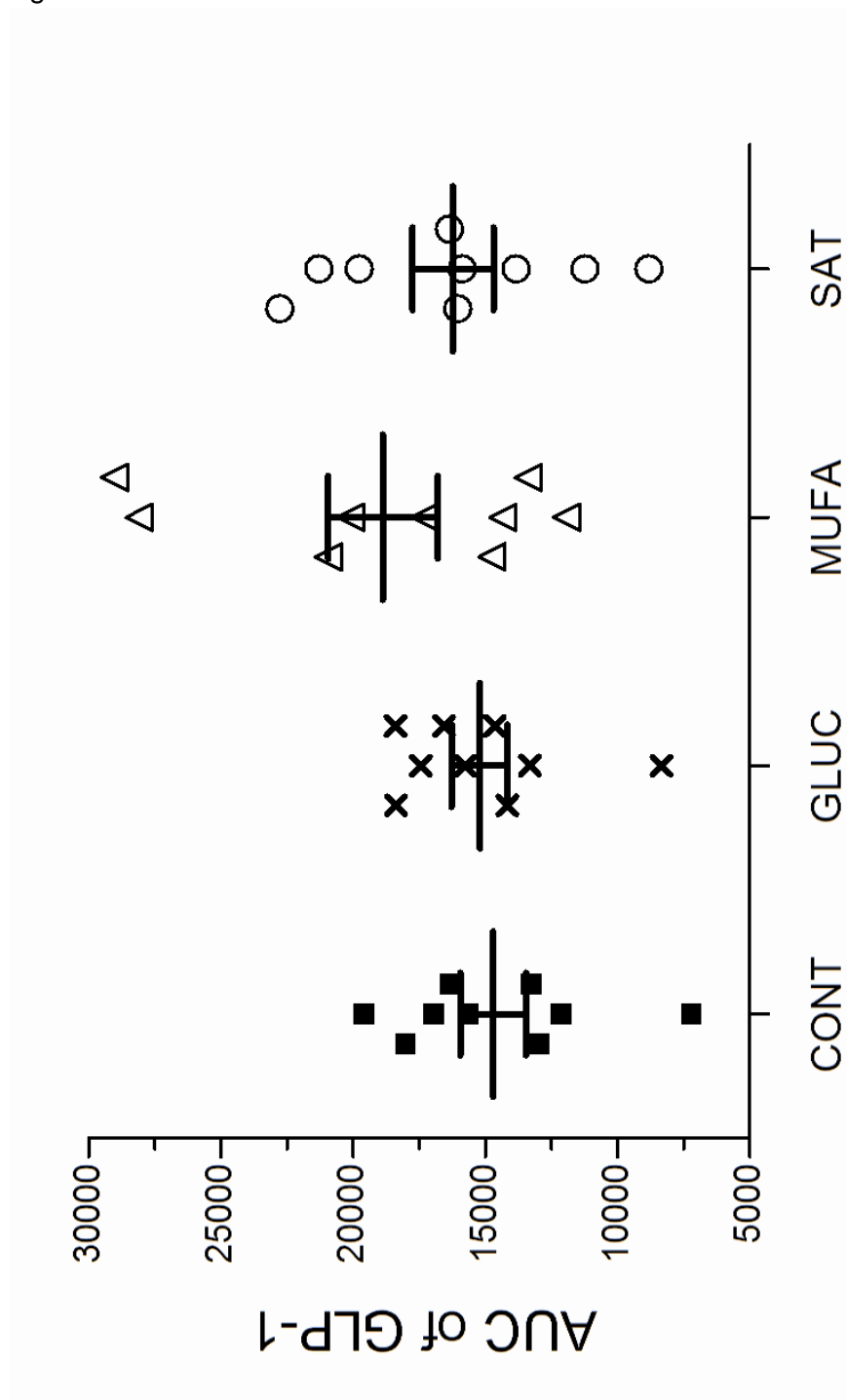


Fig. 1a. The $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of GLP-1 did not differ between groups. ANOVA followed by Tukey post hoc, $n = 9$ per group. Values are mean \pm SE. $F(3, 35) = 1.48, p = 0.24$.

Figure 1.b. Secretory response of GLP-1 under overload.

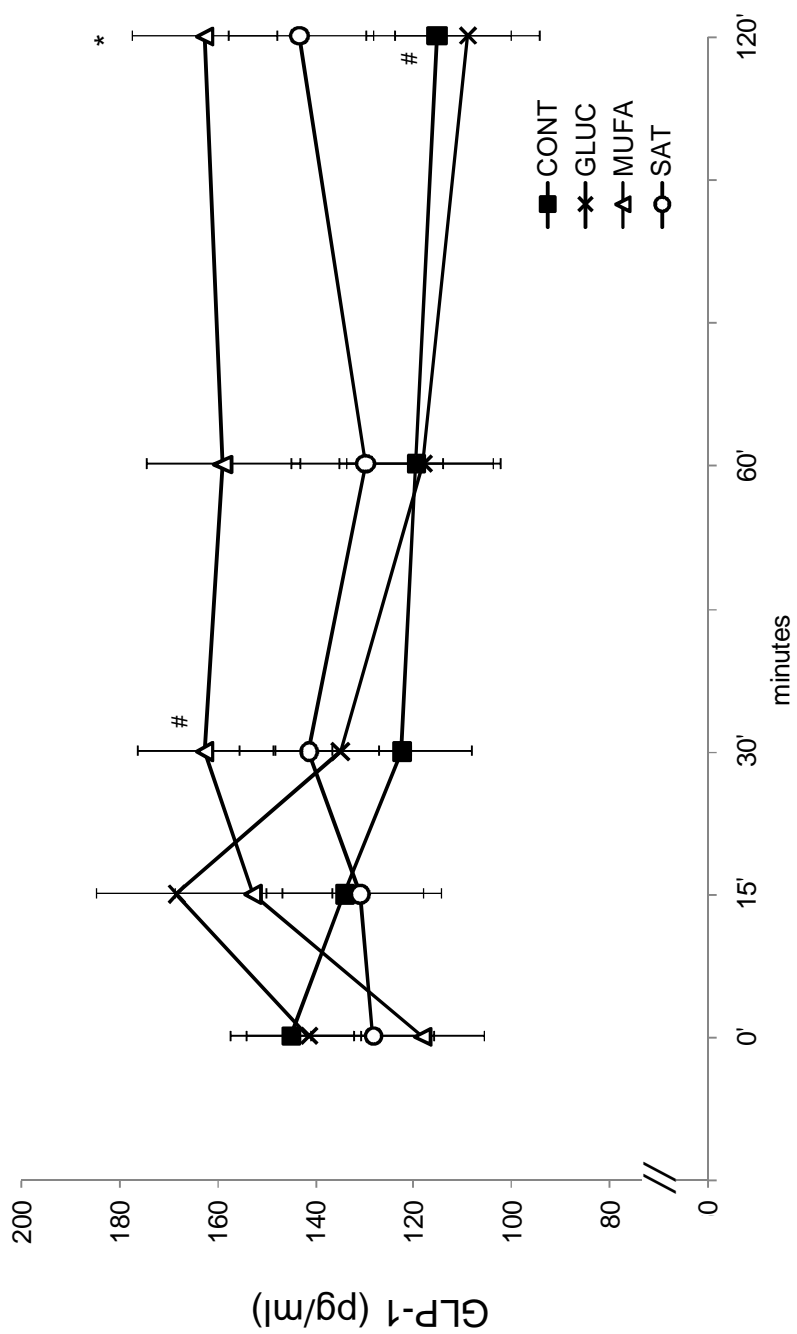


Fig 1b. Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. (* $p < 0.05$ of MUFA in relation to CONT and GLUC. (#)MUFA (30') in relation to baseline $p = 0.01$; CONT (120') $p = 0.015$ in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group. $F(12, 124) = 4.33$, * $p < 0.001$.

Figure 2a. Area under the curve of PYY.

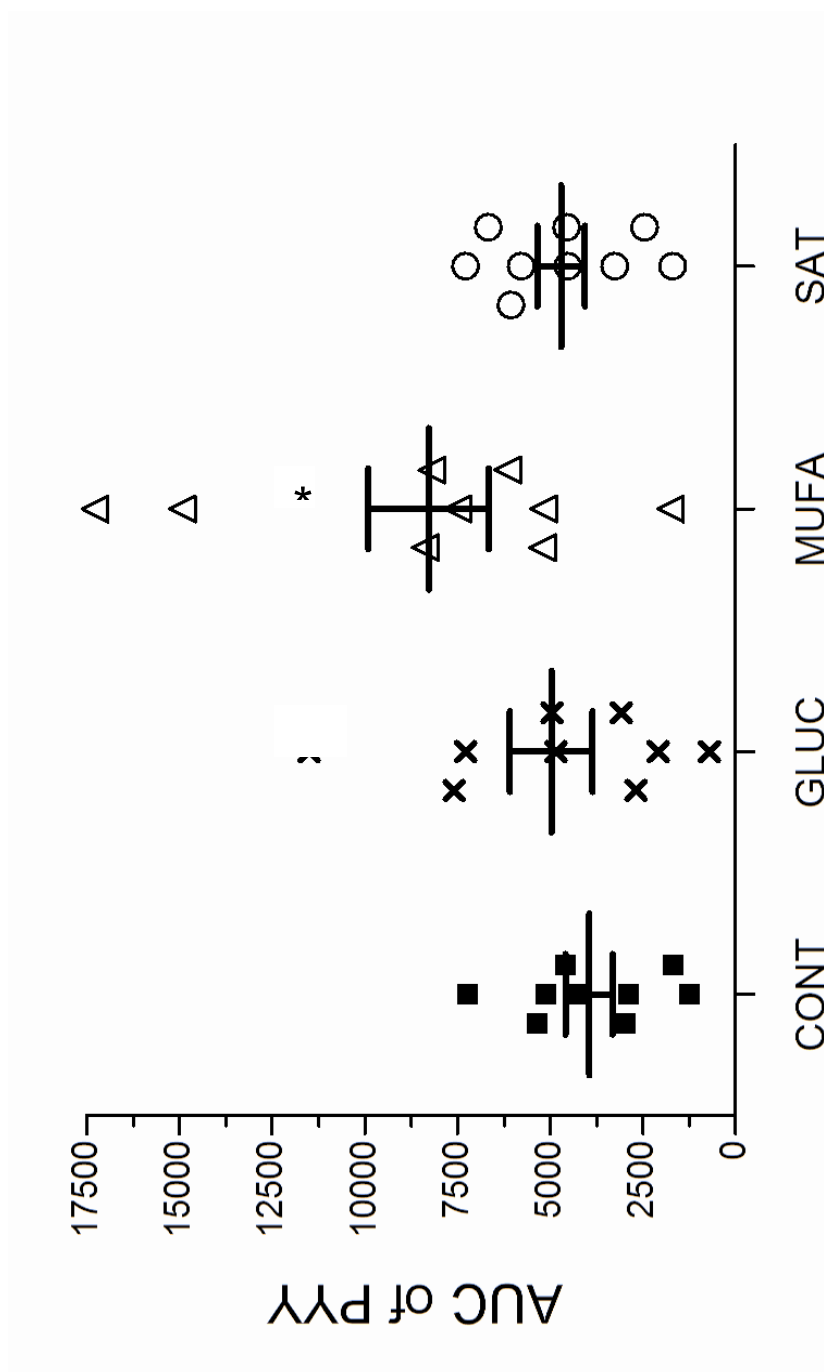


Fig. 2a: The $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of PYY was different between MUFA and CONT groups $*p < 0.05$. ANOVA followed by Tukey post hoc, $n = 9$ per group. Values are mean \pm SE. $F(3, 35) = 3.12$, $p = 0.04$.

Figure 2.b. Secretory response of PYY under overload.

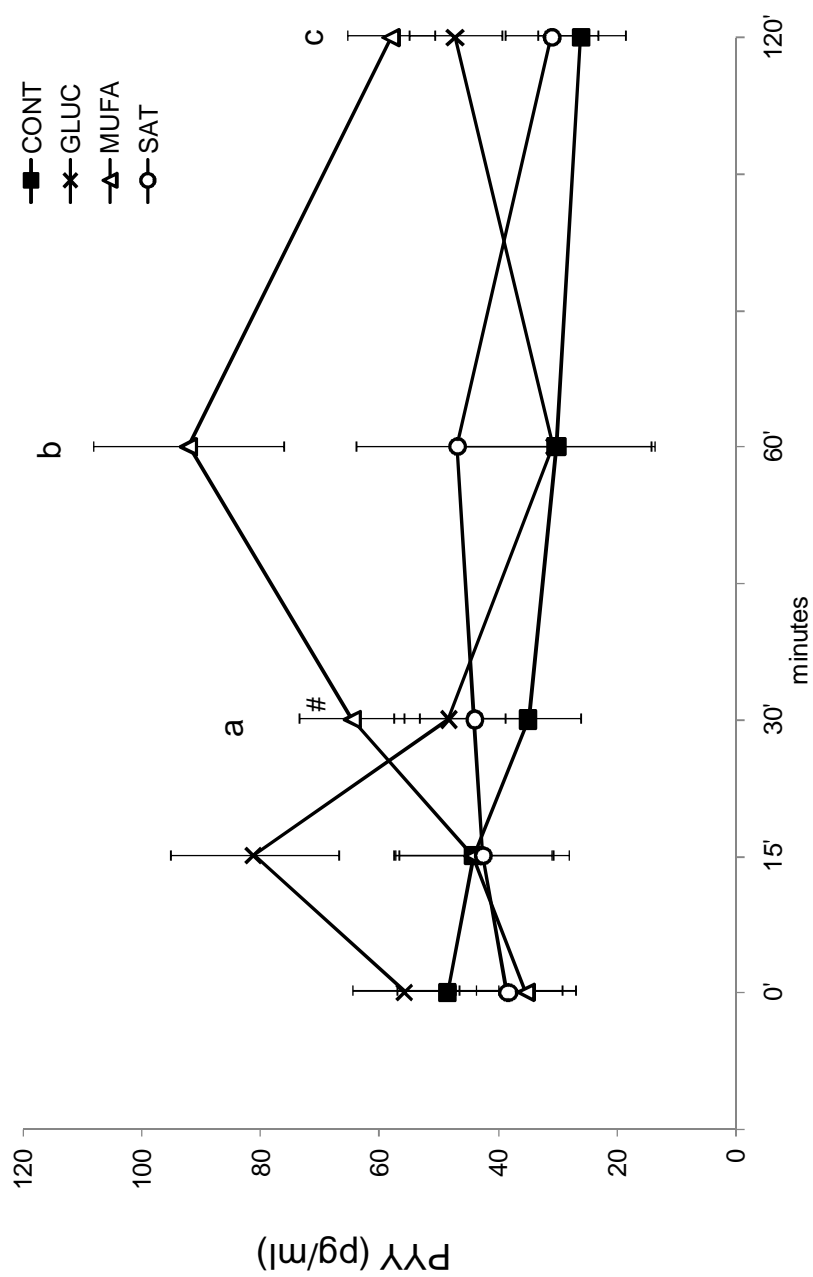


Fig. 2b: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. $p < 0,05$: "a" MUFA vs CONT; "b" MUFA vs CONT and GLUC; "c" MUFA vs CONT and SAT. (#) MUFA (60') $p = 0,042$, in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group (8 for GLUC and SAT). $F(6,96, 67,29) = 3,67$, $p = 0,002$.

Figure 3a. Area under the curve of Glycemia

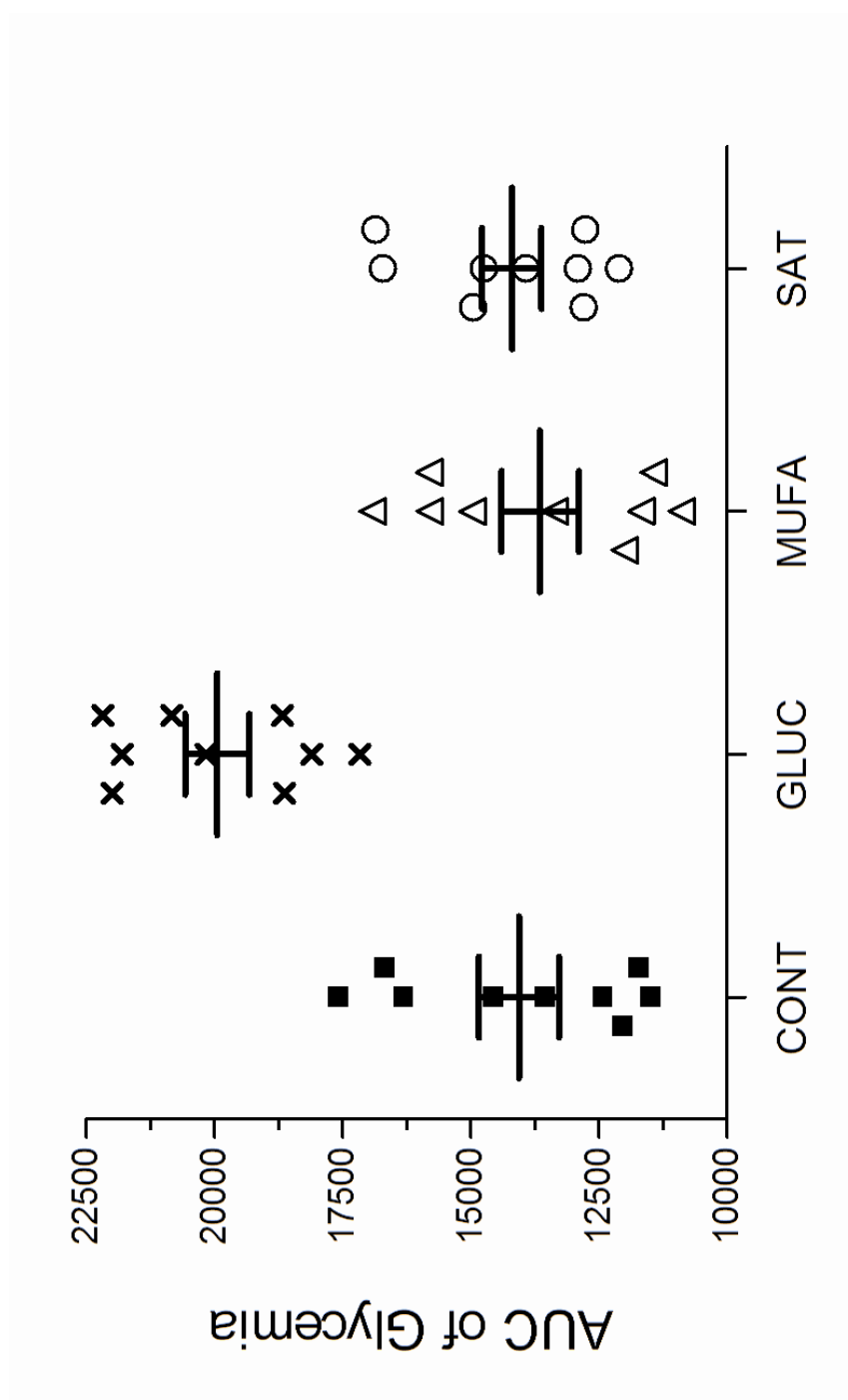


Fig. 3a: The GLUC group presented greater AUC_{0-120 mins} of glycemia in relation to others groups. ANOVA followed by Tukey post hoc, n = 9 per group. Values are mean \pm SE. ***p \leq 0.001. $F(3, 35) = 18.89$, p \leq 0.001

Figure 3b. Secretory response of glycemia under overload

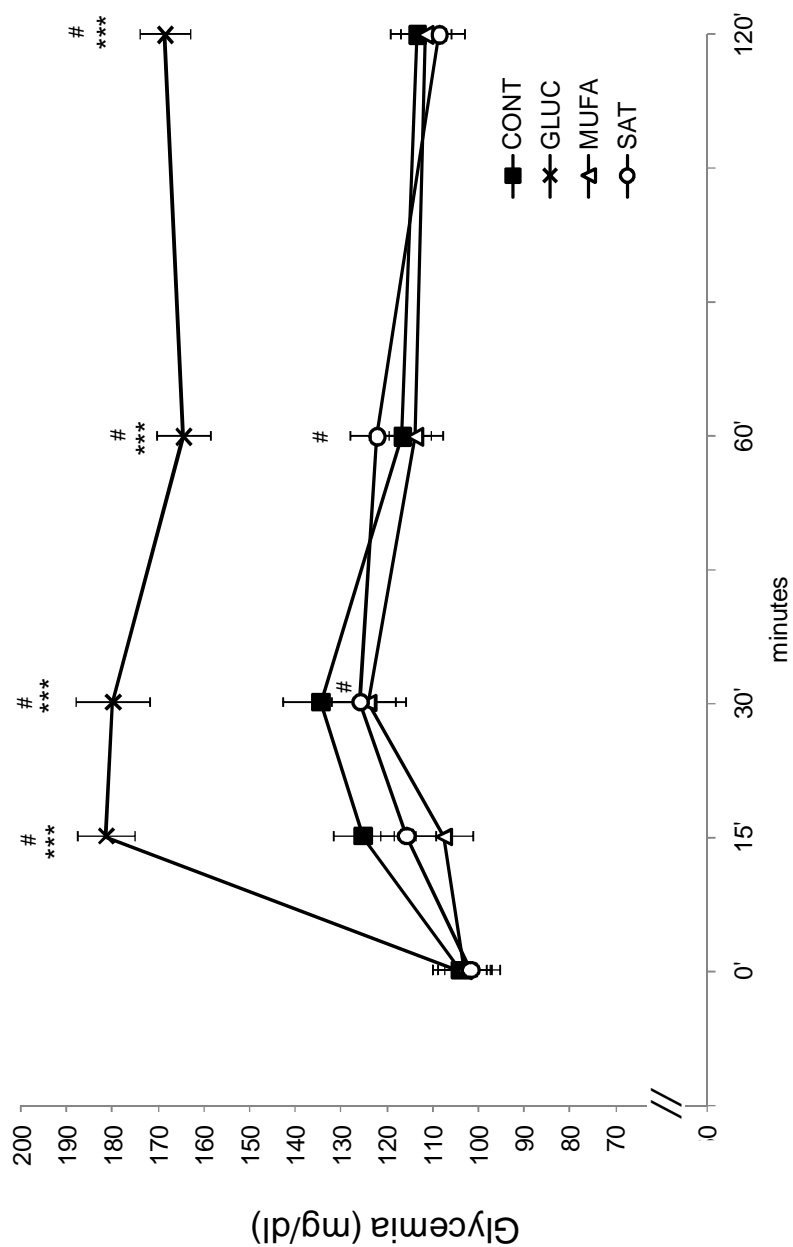


Fig. 3b: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. $p < 0.001$ (***) of GLUC in relation to others groups. (#GLUC (15', 30', 60', 120') $p < 0.001$; CONT (30', 60') $p < 0.03$; and SAT (30') $p = 0.03$ in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group (8 for CONT). $F(12, 120) = 12.01$.

Figure 4.a. Area under the curve of Insulin.

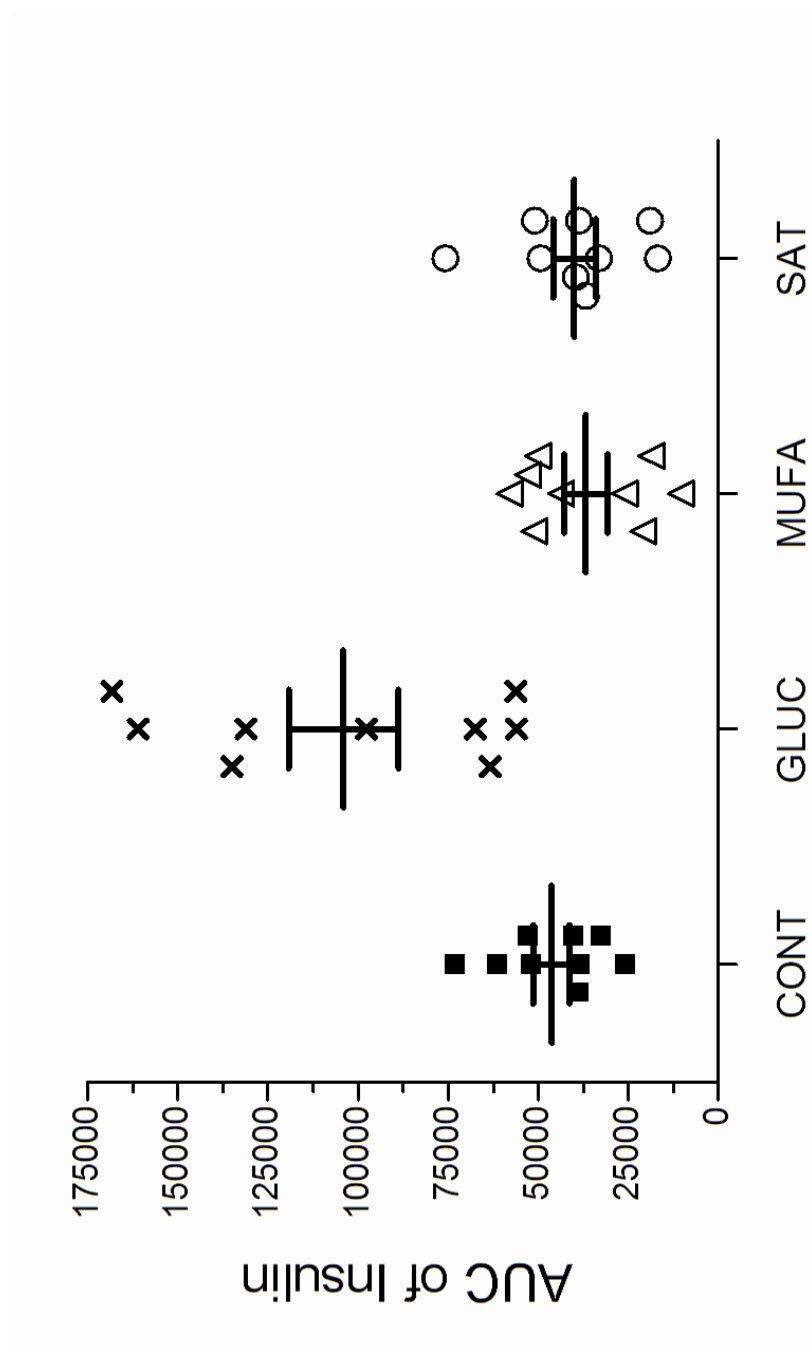


Fig. 4a: The GLUC group presented greater $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of insulin in relation to others groups. ANOVA followed by Tukey post hoc, $n = 9$ per group. Values are mean \pm SE. $F(3, 35) = 12.31$. *** $p < 0.001$.

Figure 4b. Secretory response of insulin under overload

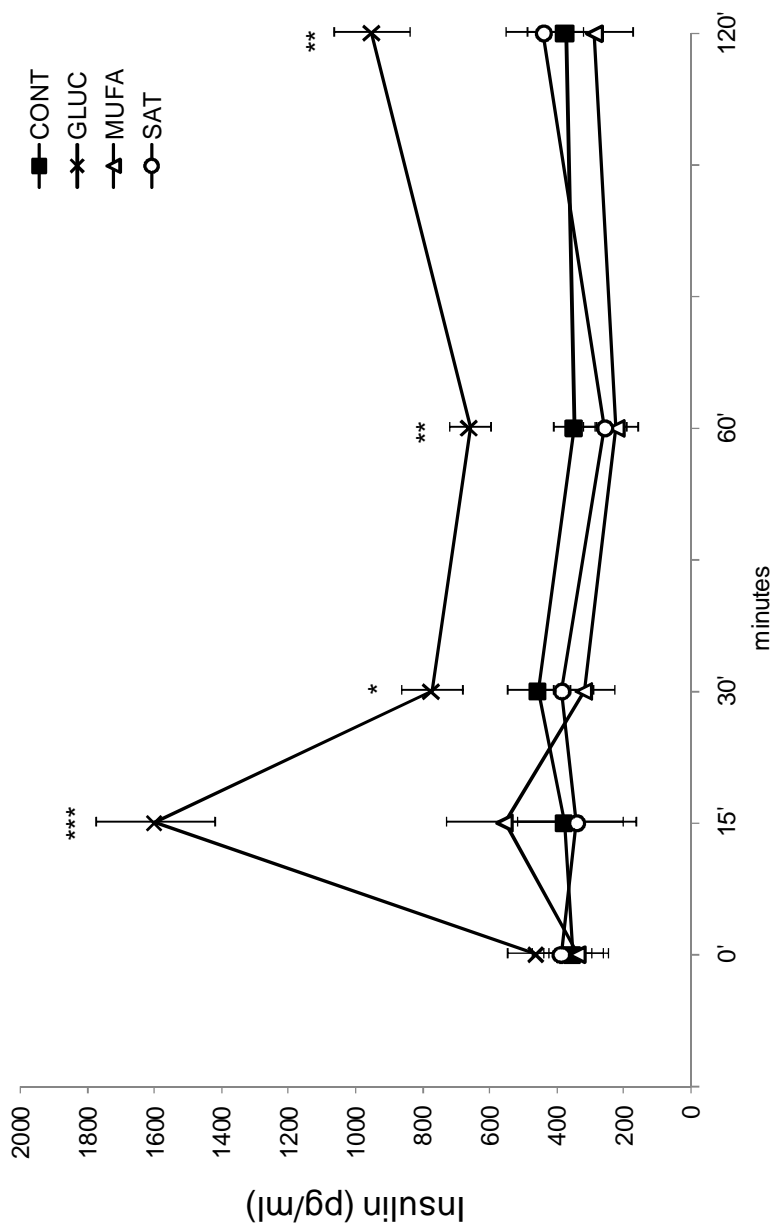


Fig. 4b: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. $p < 0.05$ (*); $p < 0.005$ (**); $p < 0.001$ (***) of GLUC in relation to others groups. (#) GLUC (15'), $p = 0.003$, in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group. $F(8.33, 86.05) = 5.37$.

Table 2. Peak secretion of PYY and GLP-1 expressed as means \pm standard error.

	CONT (n=9)	GLUC (n=9)	MUFA (n=9)	SAT (n=9)	<i>p</i>
GLP-1 (pg/ml)	144,7 (\pm 11,0)	170,1 (\pm 18,6)	184,1 (\pm 18,1)	158,7 (\pm 16,1)	0,38
PYY (pg/ml)	46,6 (\pm 6,7)	78,8 (\pm 22,9)	111,1 (\pm 26,9)	57,5 (\pm 6,3)	0,8

Figure 5a. Correlation between the basal levels of GLP-1 and PYY.

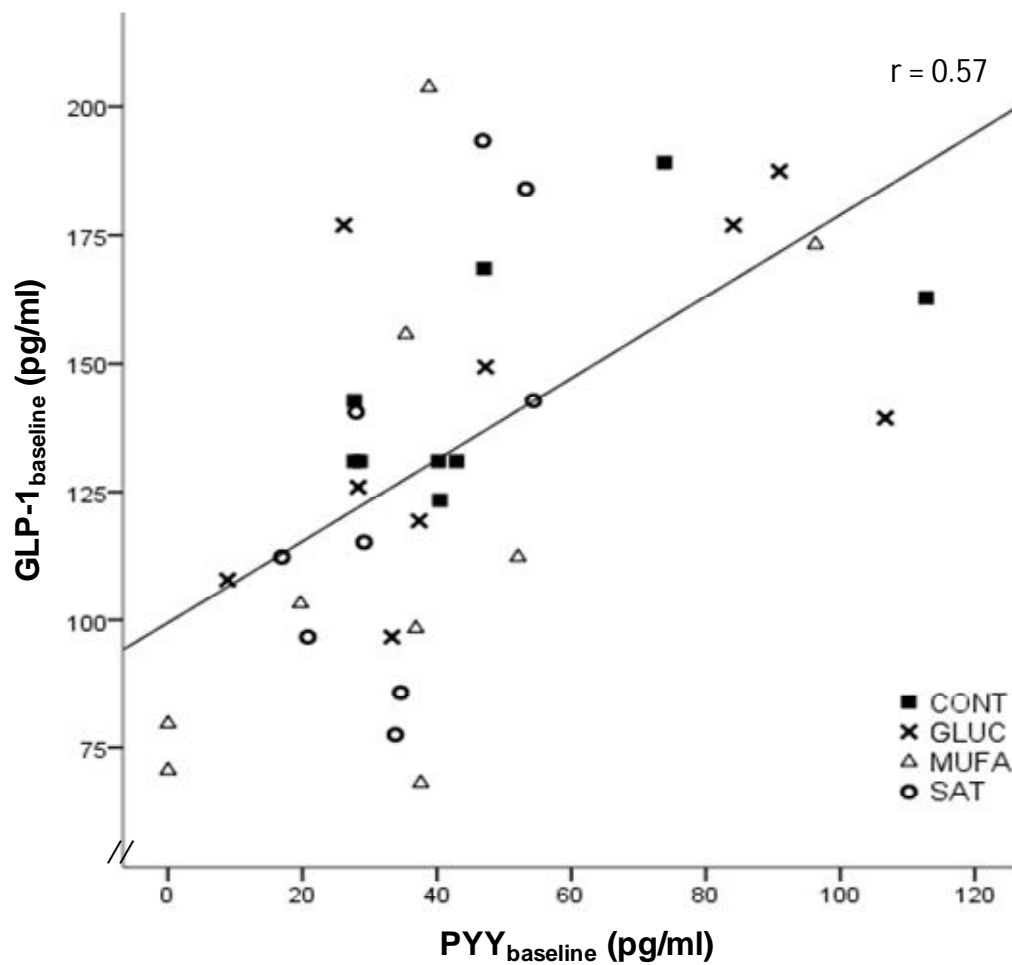


Fig.5a: Pearson correlation between GLP-1 and PYY at baseline indicate strong correlation at global, $r(34) = 0.57$, $p < 0.001$ There was no correlation when groups were evaluated separately.

Figure 5b. Correlation between the AUC's of GLP-1 and PYY.

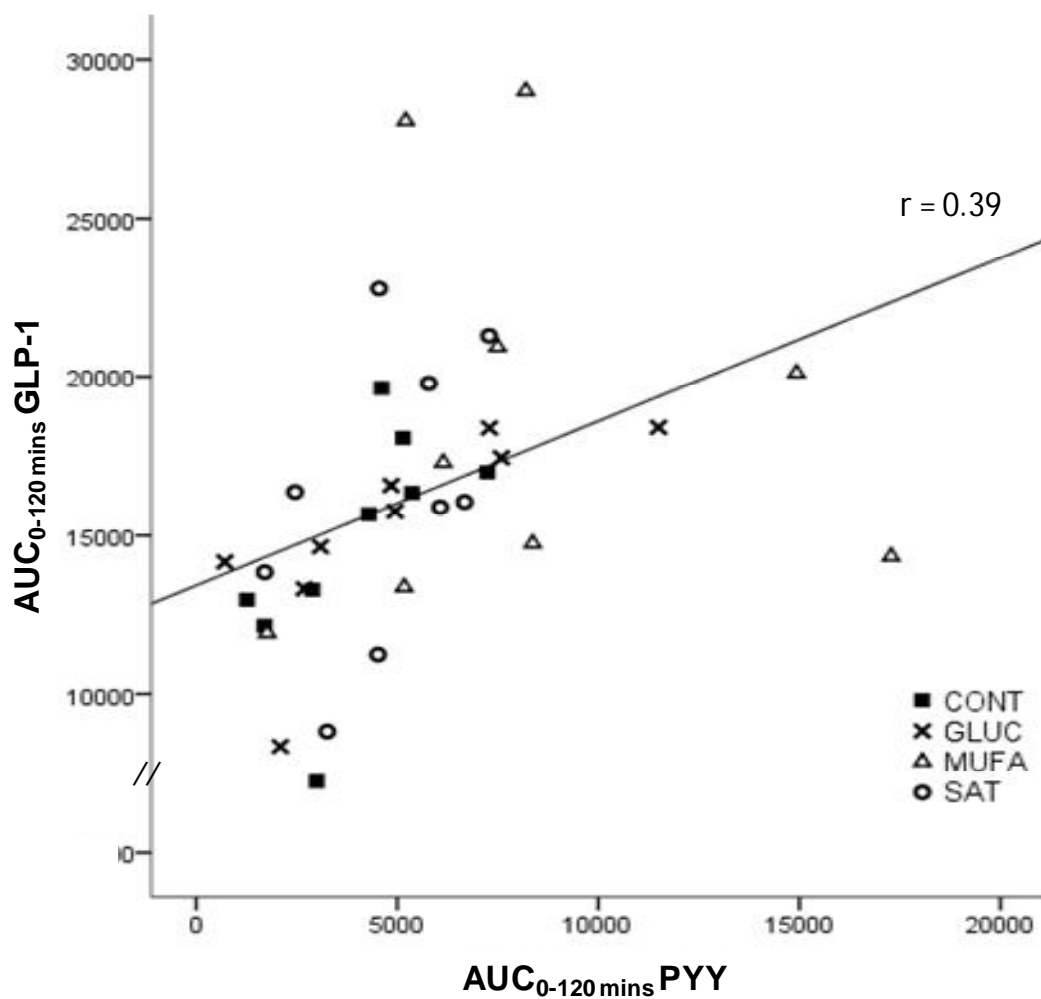


Fig.5b: Pearson correlation between AUC_{0-120 mins} of GLP-1 and PYY indicate regular correlation at global $r(34) = 0.39$, $p = 0.018$. When the groups were evaluated separately, the two variables were strongly correlated only in the GLUC group $r(7) = 0.75$, $p = 0.02$.

References

1. Nishida C, Ko GT, Kumanyika S. Body fat distribution and noncommunicable diseases in populations: overview of the 2008 WHO Expert Consultation on Waist Circumference and Waist-Hip Ratio. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:2-5.
2. Sartorelli DS, Franco LJ. [Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition]. *Cad Saude Publica* 2003;19 Suppl 1:S29-36.
3. Holst JJ, Orskov C, Nielsen OV, Schwartz TW. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett* 1987;211:169-74.
4. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* 1997;273:E981-8.
5. Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology* 1988;123:2009-13.
6. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, et al. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 2000;49:741-8.
7. Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* 1999;48:2358-66.
8. Dossat AM, Lilly N, Kay K, Williams DL. Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake. *J Neurosci* 2011;31:14453-7.
9. Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract Project Directly to the Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens to Control for Food Intake. *Endocrinology* 2011.
10. Onaga T, Zabielski R, Kato S. Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract. *Peptides* 2002;23:279-90.
11. Acosta A, Hurtado MD, Gorbatyuk O, et al. Salivary PYY: a putative bypass to satiety. *PLoS One* 2011;6:e26137.

12. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002;418:650-4.
13. Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* 1998;50:143-50.
14. Iakoubov R, Ahmed A, Lauffer LM, Bazinet RP, Brubaker PL. Essential role for protein kinase Czeta in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion in vivo in the rat. *Endocrinology* 2011;152:1244-52.
15. Sloth B, Due A, Larsen TM, Holst JJ, Heding A, Astrup A. The effect of a high-MUFA, low-glycaemic index diet and a low-fat diet on appetite and glucose metabolism during a 6-month weight maintenance period. *Br J Nutr* 2009;101:1846-58.
16. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, Whiteside CI, Brubaker PL. Protein kinase Czeta is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 2007;148:1089-98.
17. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 2009;58:1058-66.
18. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005;11:90-4.
19. Little TJ, Feinle-Bisset C. Oral and gastrointestinal sensing of dietary fat and appetite regulation in humans: modification by diet and obesity. *Front Neurosci* 2010;4:178.
20. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010;23:270-99.
21. Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept* 2008;150:26-32.
22. Maas MI, Hopman WP, Katan MB, Jansen JB. Release of peptide YY and inhibition of gastric acid secretion by long-chain and medium-chain triglycerides but not by sucrose polyester in men. *Eur J Clin Invest* 1998;28:123-30.

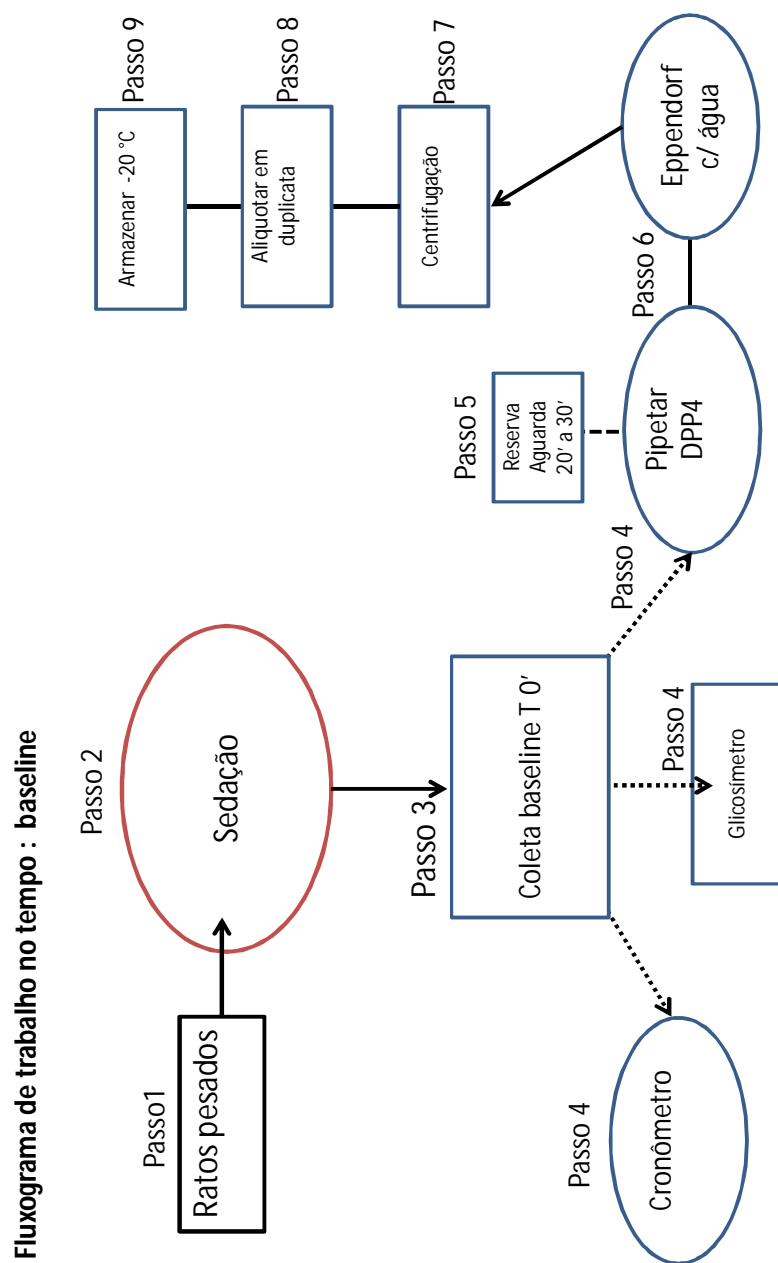
23. Aponte GW, Park K, Hess R, Garcia R, Taylor IL. Meal-induced peptide tyrosine tyrosine inhibition of pancreatic secretion in the rat. *FASEB J* 1989;3:1949-55.
24. Burdyga G, de Lartigue G, Raybould HE, et al. Cholecystokinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach. *J Neurosci* 2008;28:11583-92.
25. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg* 2006;16:651-8.
26. Serrano P, Yago MD, Manas M, Calpena R, Mataix J, Martinez-Victoria E. Influence of type of dietary fat (olive and sunflower oil) upon gastric acid secretion and release of gastrin, somatostatin, and peptide YY in man. *Dig Dis Sci* 1997;42:626-33.
27. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2003 Mar;77(3):605-11.
28. Paniagua JA, Sacristana AG, Sa´nchez E, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr.* 2007 Feb; 26(5):434–444.

7 Considerações Finais

O presente estudo demonstrou que sobrecarga oral de fontes de ácidos graxos saturados e monoinsaturados pode estimular em diferentes graus a resposta secretória de GLP-1 e PYY em roedores. Tal nutriente promoveu um pico de secreção do GLP-1 de forma rápida e no que diz respeito ao PYY, o pico foi mais sustentado. Esse fato pode ocorrer devido à capacidade dos ácidos graxos de cadeia longa em estimular as células-L enteroendócrinas no íleo distal. Os efeitos do GLP-1 sobre a secreção de insulina em pacientes diabéticos e/ou insulino-resistentes, bem como o seu papel e o do PYY nos mecanismos de controle do apetite em pacientes portadores de excesso de peso, podem desempenhar um importante papel no tratamento da obesidade e suas co-morbidades. No entanto, estudos adicionais são necessários afim de se avaliar o efeito de fontes distintas de lipídeos da dieta sobre a secreção destes peptídeos.

7 ANEXOS

7.1 Fluxograma de Trabalho:



Fluxograma de trabalho nos tempos : 15', 30', 60' e 120'

