

GISELLE MOCELLIN PERUZZO

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLP-1 NOS ESTADOS DE JEJUM E PÓS-  
PRANDIAL DURANTE A GESTAÇÃO EM MULHERES NÃO  
DIABÉTICAS**

CAMPO GRANDE

2010

GISELLE MOCELLIN PERUZZO

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLP-1 NOS ESTADOS DE JEJUM E PÓS-  
PRANDIAL DURANTE A GESTAÇÃO EM MULHERES NÃO  
DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Ayach

CAMPO GRANDE

2010

GISELLE MOCELLIN PERUZZO

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLP-1 NOS ESTADOS DE JEJUM E PÓS-PRANDIAL DURANTE A GESTAÇÃO EM MULHERES NÃO DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Ayach

Resultado \_\_\_\_\_

Campo Grande(MS), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho

A Deus pela vida, pelas derrotas e vitórias, pelas oportunidades e experiências vividas, e principalmente, pela graça de mais uma conquista. Obrigada.

Aos meus pais, Enio e Marlene, que sempre dedicaram suas vidas, mesmo a distância, em prol da minha formação acadêmica e pessoal. Sem eles nada seria possível.

À minha irmã pela paciência e companheirismo.

Ao meu namorado pela compreensão, dedicação e carinho.

Aos meus amigos, companheiros de desabafos e grandes motivadores.

## Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que colaboraram, direta ou indiretamente, com a realização deste estudo, em especial:

A todas as gestantes que aceitaram participar da pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Wilson Ayach, pelo tempo dedicado, mesmo quando não disponível, por todo aprendizado, pela confiança depositada e pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Tatiana Mary Sakamoto pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de trabalho Rozilda Pulquério Sales, Maína de Oliveira Nunes, Sandra Maura Agüena, Marli Marques de Oliveira, Terezinha Verdin e José Vicente de Oliveira Neto, pelo incentivo, paciência, colaboração e compreensão.

A Gabriela Moraes e Silva e Vanessa Marcon de Oliveira, colegas de mestrado, pelo apoio e desenvolvimento de uma grande amizade.

A Ana Carolina de Melo Miranda e Mariana Nalesco pela colaboração e apoio.

Aos funcionários do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia e do Departamento de Tecnologia de Alimentos do Hospital Universitário, sempre prestativos e dedicados.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo apoio no desenvolvimento experimental.

A família e namorado pela motivação, por acreditarem na minha capacidade, mesmo quando eu duvidava, e por todo carinho e amor oferecidos.

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,  
mas lutamos para que o melhor fosse feito.  
Não somos o que deveríamos ser,  
não somos o que iremos ser..  
mas Graças a Deus,  
não somos o que éramos."

(Martin Luther King)

## RESUMO

**Introdução:** As incretinas são hormônios produzidos pelas células intestinais que atuam no pâncreas estimulando a secreção de insulina. O GLP-1 é o principal representante desses hormônios. Estudos revelam que os níveis desse peptídeo estão diminuídos em pacientes com diabetes melito tipo 2. **Objetivo:** Descrever o comportamento do GLP-1 durante a gestação em mulheres não diabéticas. **Pacientes e Método:** Trata-se de estudo descritivo longitudinal prospectivo elaborado para análise dos níveis plasmáticos de GLP-1 no primeiro, segundo e terceiro trimestre da gestação, no jejum e 30 minutos após refeição de 401 kcal. **Resultados:** A mediana do GLP-1 no jejum foi de 3,15 pmol/L, 3,16 pmol/L e 3,28 pmol/L no primeiro, segundo e terceiro trimestres, respectivamente. No período pós-prandial, os valores do primeiro, segundo e terceiro trimestre foram de respectivamente 3,95 pmol/L, 3,94 pmol/L e 4,60 pmol/L. A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre os resultados. **Conclusão:** Os resultados sugerem que não há alteração dos níveis de GLP-1 durante a gestação em mulheres não diabéticas.

**Palavras-chave:** Incretinas; GLP-1; gestantes, diabetes gestacional.

## ABSTRACT

**Introduction:** Incretin hormones are produced by intestinal cells that act by stimulating the pancreas to secrete insulin. GLP-1 is the main representative of these hormones. Studies show that levels of this peptide are decreased in patients with type 2 diabetes mellitus. **Objective:** To describe the behavior of GLP-1 during pregnancy in non diabetic women. **Patients and Method:** This is a prospective longitudinal descriptive study prepared for analysis of plasma levels of GLP-1 in the first, second and third trimester of pregnancy, fasting and 30 minutes after meal of 401 kcal. **Results:** The median fasting GLP-1 was respectively 3.15 pmol/L, 3.16 pmol/L and 3.28 pmol/L in the first, second and third quarters. In the postprandial period, the values of the first, second, and third quarter were respectively 3.95 pmol/L, 3.94 pmol/L and 4.60 pmol/L. Statistical analysis showed no significant difference between the results. **Conclusion:** The results suggest that there is no change in the levels of GLP-1 during pregnancy in non diabetic women.

**Key-words:** Incretin, GLP-1, pregnant, gestational diabetes.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Número e porcentagem de gestantes de acordo com a faixa etária, paridade, número de aborto e antecedentes pessoais, n=14, Campo Grande-MS.....	46
Tabela 2-	Índice de massa corporal (IMC) nos três trimestres de gestação, em gestantes não diabéticas, Campo Grande-MS.....	47
Tabela 3-	Mediana e intervalo dos níveis de GLP-1 em cada trimestre de gestação em jejum e após 30 minutos (pmol/L), n=14, Campo Grande-MS.....	48
Tabela 7-	Teste de <i>Wilcoxon</i> com as diferenças dos dados emparelhados, n=14, Campo Grande-MS.....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Processo pós-translacional do pró-glucagon.....	22
Figura 2-	Processamento do proGIP.....	25
Figura 3-	Mecanismo de ação do GLP-1 na secreção de insulina.....	31
Figura 4-	Esquema da dosagem do GLP-1 pelo método de ELISA.....	43

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AC	Adelinato ciclase
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP-IV	Enzima dipeptidil peptidase-IV
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	Enteroglucagon
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay – Ensaio imunoenzimático
GHR	Hormônio do crescimento
GIP	Peptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
GLP-2	Peptídeo-2 semelhante ao glucagon
GIPR	Receptor do Peptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1R	Receptor do Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
GLP-2R	Receptor do Peptídeo-2 semelhante ao glucagon
GPCR	Proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina
GRP	Peptídeo liberador da gastrina
GRPP	Peptídeo pancreático relacionado à glicetina
hPL	Hormônio lactogênio placentário humano
HU/UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
IMC	Índice de massa corpórea
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MUP	Fosfato de metil umbeliferona

NEP	Endopeptidase neutra
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
PC1/3	Pró-hormônio convertase 1/3
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Pdx-1	Homeobox pâncreato-duodenal-1
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PPG	Pré-pró-glucagon
PG	Pró-glucagon
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
pmol	Picomol
pmol/L	Picomol por litro
nm	Nanômetro
nmol/L	Nanomol por litro
g	Gramma
mg/kg/min	Miligramma por quilogramma por minuto
kg/m <sup>2</sup>	Quilogrammas por metro ao quadrado
kcal	Quilocaloria
kDa	Quilodalton
kb	Qulibase
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio ionizado
β	Beta
α	Alfa
≥	Maior e igual
<	Menor

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 Insulina</b> .....	17
<b>2.2 Adaptações do organismo materno</b> .....	18
<b>2.3 Incretinas</b> .....	20
2.3.1 <u>Características estruturais e metabólicas das incretina</u> .....	21
2.3.1.1 Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1).....	21
2.3.1.2 Peptídeo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2).....	24
2.3.1.3 Polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP).....	25
2.3.2 <u>Liberação dos hormônios incretinas</u> .....	26
2.3.3 <u>Receptores e ações das incretinas</u> .....	28
2.3.3.1 Receptores e ações do GLP-1 .....	28
2.3.3.2 Receptores e ações do GLP-2 .....	32
2.3.3.3 Receptores e ações do GIP .....	33
<b>2.4 Importância clínica no diabetes melito tipo 2 e gestacional</b> .....	34
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1 Geral</b> .....	37
<b>3.2 Específicos</b> .....	37
<b>4 PACIENTES E MÉTODO</b> .....	38
<b>4.1 Tipo de estudo</b> .....	38
<b>4.2 Aspectos éticos</b> .....	38
<b>4.3 Comunicado aos profissionais de saúde</b> .....	38
<b>4.4 População estudada</b> .....	39
4.4.1 <u>Critérios de inclusão</u> .....	39
4.4.2 <u>Critérios de exclusão</u> .....	39
4.4.3 <u>Critérios de descontinuidade</u> .....	39
<b>4.5 Casuística</b> .....	39
<b>4.6 Variáveis pesquisadas</b> .....	40
<b>4.7 Abordagem das gestantes</b> .....	40

<b>4.8 Análise estatística</b> .....	41
<b>4.9 Procedimento de coleta de dados</b> .....	42
4.9.1 <u>Coleta de sangue para dosagem de GLP-1</u> .....	42
4.9.2 <u>Procedimento para dosagem de GLP-1</u> .....	42
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
<b>5.1 Características da população estudada</b> .....	45
<b>5.2 Resultados do GLP-1</b> .....	47
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>APÊNDICES</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a gravidez o corpo da mulher sofre várias modificações para adaptar-se ao embrião e à placenta e assegurar o desenvolvimento adequado do feto. Ocorrem adaptações hemodinâmicas, metabólicas e nutricionais. Dentre as alterações hemodinâmicas destacam-se a vasodilatação sistêmica e útero-placentária, o aumento do débito e trabalho cardíaco, do fluxo plasmático renal e da ventilação pulmonar (REZENDE; MONTENEGRO, 2006a).

Durante a gestação normal as alterações hormonais e metabólicas ocorrem em resposta ao aumento na demanda de nutrientes, tanto do feto como da mãe. Dentre estas, destacam-se a elevação dos níveis de estrogênios, prolactina, hormônio lactogênio placentário, progesterona e cortisol circulantes, que resultam em insulino-resistência. Estas adaptações metabólicas e hormonais modificam a homeostase no sentido de aumentar a produção e diminuir a utilização de glicose nos tecidos maternos, o que proporciona maior oferta deste carboidrato ao feto (REZENDE; MONTENEGRO 2006b; SBEM, 2006).

No trato gastro-intestinal o aumento dos níveis séricos de progesterona resulta em relaxamento da musculatura, diminuição da secreção gástrica e, conseqüente aumento do tempo de digestão e do trânsito intestinal. Ocorre, também, progressivo aumento da resistência à insulina, que senão acompanhado do correspondente aumento da secreção pancreática de insulina, pode desencadear o diabete melito gestacional (BRAUNSTEIN, 2008).

O diabete gestacional é importante fator de risco para o desenvolvimento do diabete melito tipo 2 na vida futura. Isto sugere que o diabete melito, gestacional e tipo 2, possam ter fisiopatologia semelhante e sejam causados pela mesma desordem metabólica. Ambos se caracterizam pelo distúrbio na ação e/ou secreção de insulina e aumento da resistência periférica a este hormônio. No diabete melito tipo 2, a diminuição da secreção de insulina pode ser causada, além da perda da função das células  $\beta$  secundária à glicotoxicidade, pela redução da secreção e/ou ação das incretinas (CYPRYK *et al.*, 2008).

Incretinas são hormônios produzidos no trato gastrointestinal cuja função é o aumento da secreção de insulina dependente do estímulo glicose. O peptídeo semelhante ao glucagon-1



(GLP-1) é o principal representante. O GLP-1 estimula a secreção de insulina, desacelera o esvaziamento gástrico, suprime a secreção de glucagon, aumenta a secreção de somatostatina e a saciedade, o que diminui o consumo de alimentos (CHACRA, 2006; FORTI, 2006). Essas ações reduzem a glicemia e a lipotoxicidade características do diabetes tipo 2, o que aumenta a sobrevida e a função das células  $\beta$  pancreáticas.

A diminuição do efeito incretina pode ser causada pela redução na secreção gastrointestinal destes peptídeos ou por insensibilidade das células  $\beta$  à ação insulínica das incretinas (NAUCK *et al.*, 1993) e que, conseqüentemente diminui a secreção de insulina e pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2.

Pacientes com diabetes melito tipo 2 são um dos objetos de estudo dos pesquisadores em relação aos hormônios incretinas, principalmente pela possibilidade terapêutica com agonistas do GLP-1 e com inibidores da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV). A influência da gestação normal na síntese e secreção de incretinas, entretanto, não é bem conhecida.

Em gestantes que desenvolveram o diabetes gestacional já se observou que não houve alteração dos níveis plasmáticos de incretinas. Entretanto estes estudos fizeram dosagem única do GLP-1 no terceiro trimestre da gestação, sem, contudo, compará-lo aos níveis observados nos trimestres anteriores (FORBES *et al.*, 2005; MEIER *et al.*, 2005; CYPRYCK *et al.*, 2007). Diante disso, optou-se por descrever o comportamento de uma das incretinas nos três trimestres em gestantes não diabéticas, o que permitiria estudar a influência das alterações fisiológicas da gestação na produção e secreção deste peptídeo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Insulina

A insulina foi isolada e purificada em 1921, mas desde 1889 os pesquisadores Minkowski e Von Mering já suspeitavam que uma substância secretada pelo pâncreas fosse a responsável pelo controle metabólico dos carboidratos. Em 1952 a sequência de aminoácidos da insulina foi descrita (BLISS, 1993 citado por WILCOX, 2005, p.20).<sup>1</sup>

A insulina é um hormônio peptídico com massa molecular de aproximadamente 5.800 Dalton, secretada pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas. É composta por 51 aminoácidos, distribuídos em uma cadeia A, com 21 aminoácidos, e uma cadeia B, com 30 aminoácidos, ligadas por duas pontes dissulfeto (KNUDSON; WEINSTOUR, 2008).

Além do controle dos níveis de glicose no sangue, a insulina regula o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, e participa do controle do mecanismo da fome-saciedade (VOLP; REZENDE; ALFENAS, 2008).

A insulina exerce seus efeitos em vários órgãos, principalmente no fígado, tecido adiposo e músculos esqueléticos e cardíaco. No fígado, inibe a produção e liberação de glicose e promove o aumento do estoque de glicogênio. Estimula o aporte celular de glicose nos tecidos muscular e adiposo. No músculo, aumenta as reservas de glicogênio e no tecido adiposo inibe a liberação de ácidos graxos livres (VOLP; REZENDE; ALFENAS, 2008).

É sintetizada a partir da pré-pró-insulina, a qual é clivada por ações de proteases dando origem a pró-insulina, que é armazenada no complexo de Golgi. Quando há um estímulo para a secreção de insulina, as enzimas pró-hormônios convertases I (PC1), II (PC2) e III (PC3) promovem a hidrólise de duas ligações peptídicas na cadeia da pró-insulina, formando a

---

<sup>1</sup> Bliss M. The history of insulin. Diabetes Care. 1993; 16: Suppl 3: 4-7. In: Wilcox G. Insulin and insulin resistance. Clin Biochem Rev. 2005; 26(2): 19-39.

insulina e o peptídeo C (EL-BACHA, 2006). Deste modo, o peptídeo C e a insulina são secretados em quantidades equimolares, embora a razão no soro seja de cinco a 15 por um.

A secreção de insulina é influenciada pelo tipo de dieta, pela característica da distribuição da gordura corporal, por alterações hormonais e, principalmente, pela concentração plasmática de glicose. Dentre os hormônios que regulam a secreção de insulina, destacam-se as incretinas: peptídeo-1 semelhante ao glucagon e polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GLP-1 e GIP), que estimulam a sua secreção dependente da concentração de glicose.

O aumento dos níveis de glicose induz a liberação da insulina dos grânulos das células  $\beta$ . A glicose entra nas células por ação das glucoquinases, que fosforilam a glicose gerando Adenosina Trifosfato (ATP). Os canais de potássio dependentes de ATP são fechados resultando na despolarização da membrana e, ativação dos canais de Cálcio. Isto causa aumento do Cálcio intracelular, desencadeando a secreção pulsátil de insulina. (WILCOX, 2005).

Os hormônios, do crescimento, prolactina, lactogênio placentário e GLP-1 além de estimularem a secreção de insulina aumentam a proliferação das células  $\beta$ . A somatostatina, por sua vez, tem efeito antagônico. Os hormônios contra-regulatórios, glucocorticóides, além das catecolaminas, aumentam a resistência à insulina (WILCOX, 2005; KAPUSTIN, 2008).

Na gestação, em virtude da resposta adaptativa e dos efeitos dos hormônios lactogênio placentário humano (hPL), progesterona, estrogênio e cortisol, o aumento da resistência à insulina é característica, principalmente no terceiro trimestre (REZENDE; MONTENEGRO, 2006b).

## **2.2 Adaptações do organismo materno**

No organismo materno, com o objetivo de suprir as necessidades requeridas para o crescimento do feto, acontecem adaptações metabólicas e estruturais.

Em todos os sistemas do organismo ocorrem alterações durante a gestação. Dentre estas se destacam as alterações cardio-circulatórias, as nutricionais e as metabólicas. A

atividade cardiovascular durante a gestação se eleva comparada ao período não gestacional (BATISTA *et al.*, 2003). Dentre as alterações nutricionais, destacam-se o aumento do tempo de digestão e trânsito do bolo alimentar, secundários ao relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal por efeito da progesterona. (BRAUNSTEIN, 2008). Logo, por efeito da ação da progesterona e do aumento uterino que desloca o piloro para cima e para trás, o esvaziamento gástrico é mais lento (REIS, 1993).

As principais alterações hormonais são o aumento da produção e secreção de cortisol, estrogênio, progesterona, prolactina, hormônio de crescimento, insulina, glucagon e, em especial da secreção de lactogênio placentário humano (SANTOS; CÂNDIDO; SALA, 2004; REZENDE; MONTENEGRO, 2006b). O hPL promove aumento da resistência à insulina e, quando as reservas das células beta-pancreáticas não forem adequadas, sobrevém o diabetes gestacional.

No trato gastrointestinal, por ação da progesterona, há relaxamento da musculatura lisa. Estas alterações aumentam o tempo de esvaziamento gástrico, reduzem tônus do esfíncter esofágico inferior e a motilidade do intestino. Como consequência, há maior prevalência de refluxo gastro-esofágico e constipação intestinal. A diminuição da motilidade da vesícula biliar leva ao aumento do seu volume e redução do esvaziamento da bile após as refeições, que resulta em mais bile litogênicas e aumento das colelitíases durante a gestação (BRAUNSTEIN, 2008).

O aumento dos níveis de estrogênio e progesterona produzidos pelo corpo lúteo e depois pela placenta promove hiperplasia das células  $\beta$  pancreáticas e, conseqüentemente, aumento da produção e secreção de insulina, resultando no aumento da utilização periférica de glicose, na elevação dos estoques de glicogênio nos tecidos, na queda da produção hepática de glicose e na diminuição da glicemia de jejum o que explica a hipoglicemia de jejum, típica da primeira metade da gestação (SANTOS; CÂNDIDO; SALA, 2004).

Isto, aliado ao fato de que o feto extrai glicose e aminoácidos da gestante, até mesmo no período prolongado de jejum, promovendo alteração no metabolismo materno. Como está submetida à permanente demanda de glicose, o organismo materno reduz o consumo indiscriminado deste carboidrato, que é, então, transferido rapidamente ao feto por difusão facilitada (SOARES; FORTUATO; MOREIRA, 2002). Na segunda metade da gestação ocorre aumento dos hormônios contra-insulínicos, que elevam a maior resistência periférica à

insulina, diminuem a tolerância à glicose, aumentam a glicogenólise e reduzem os depósitos hepáticos. Nos últimos meses, principalmente no final do 3º trimestre, o aumento da resistência à insulina pode chegar a 50% e a captação de glicose pelo feto é cerca de 6mg/kg/min, aumentando a produção materna em 0,3mg/kg/min (SANTOS; CÂNDIDO; SALA, 2004).

A glicose no sangue fetal é de cerca de 70% dos níveis maternos. Em uma gravidez normal, a absorção de glicose a partir da placenta é equivalente à utilização de glicose fetal e o fígado e rins fetais não produzem glicose (BEARDSALL; DIDERHOLM; DUNGER, 2008).

Deste modo, a resistência à insulina começa, usualmente, no início do segundo trimestre e aumenta progressivamente até o final da gestação, enquanto a sensibilidade à insulina reduz a 80%. No terceiro trimestre, após a ingestão de glicose, ocorre um hiperinsulinismo pós-prandial devido aos hormônios contra-insulares (REZENDE; MONTENEGRO, 2006b). Mulheres com limitada capacidade de sintetizar e secretar a insulina desenvolvem o diabetes gestacional.

O diabetes gestacional, portanto, é causado por uma resistência à ação da insulina ou pela deficiência de sua secreção. Como a secreção de insulina é influenciada, também pelos níveis séricos de incretinas e durante a gestação ocorrem alterações do trato gastro-intestinais que poderiam alterar a produção destes peptídeos, a redução da secreção de incretinas, em especial do GLP-1, pode ser, como no diabetes melito tipo 2, uma das causas do desenvolvimento do diabetes gestacional.

### **2.3 Incretinas**

"O termo incretina foi criado por Zunz e La Barre (1929 apud Orskov 1992, p.701)<sup>2</sup>, para denominar uma classe especial de secretinas produzidas no trato gastrointestinal cuja

---

<sup>2</sup> Zunz E, La Barre J. Contributions à l' étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancreas: relation entre les sécrétions externe et interne du pancreas. Arch Inter nat Physiol

função é o estímulo à secreção de insulina dependente de glicose, também chamado de efeito incretina.

O efeito incretina transforma as células endócrinas do intestino em sistema de controle secundário ao metabolismo da glicose (PREITNER *et al.*, 2004). Este efeito corresponde a aproximadamente 50 a 70% da insulina total secretada após sobrecarga oral de glicose (BAGGIO; DRUCKER, 2007; GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008).

A diminuição do efeito incretina, causada pela redução na secreção e/ou por insensibilidade das células  $\beta$  à ação insulínica das incretinas (NAUCK *et al.*, 1993) e que, conseqüentemente diminui a secreção de insulina, pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2.

As principais incretinas são os peptídeos semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e 2 (GLP-2) e o insulínico glicose-dependente (GIP), sendo que o GLP-1 é predominante, e representa cerca de 80% do efeito intestinal das incretinas (VELASQUEZ-MIEYER *et al.*, 2003).

### 2.3.1 Características estruturais e metabólicas das incretinas

#### 2.3.1.1 Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP1) é produzido a partir da cadeia de secreção do glucagon. Esta cadeia inicia-se pela síntese do pré-pró-glucagon (PPG) em um gene do braço longo do cromossomo dois humano, composto de seis éxons e cinco íntrons. O PPG é um peptídeo de 160 aminoácidos. A clivagem do PPG dá origem ao Pró-glucagon (PG) que é o precursor imediato do GLP-1 (BAGGIO; DRUCKER, 2007; GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008; DEACON; HOLST, 2009).

O GLP-1 é composto por 30 aminoácidos, liberado pelas células L do íleo e cólon, após um processo pós-translacional do pró-glucagon intestinal por enzimas pró-hormônio convertases - PC1 e PC3 - (localizado nas células L do intestino) em resposta ao consumo de alimentos, principalmente carboidratos e componentes de gordura (VELASQUEZ-MIEYER *et al.*, 2003).

O processo pós-translacional do PG ocorre no pâncreas e no intestino. Nas células  $\alpha$  do pâncreas, o pró-glucagon dá lugar ao pró-glucagon 1-30 – o peptídeo pancreático relacionado à glicetina (GRPP), pró-glucagon 33-61 – idêntico ao glucagon, pró-glucagon 64-69 e pró-glucagon 77-158 (ALONSO, 2001).

Nas células L do intestino, o processo pós-translacional dá lugar ao pró-glucagon 1-69 – glicetina/enteroglucagon (EG), ao pró-glucagon 33-69 ou oxintomodulina, ao GLP-1 – pró-glucagon 76-107 – e GLP-2 – pró-glucagon 126-158, conforme figura 1. O processo Pós-translacional intestinal é o responsável pela síntese de GLP-1 (ALONSO, 2001; JASLEEN *et al.*, 2002).

A concentração plasmática do GLP-1 no jejum é de 2 a 15 pmol/L e no estado pós-prandial a concentração de 20 a 50 pmol/L pode ser considerada fisiológica (NAUCK, 1998).

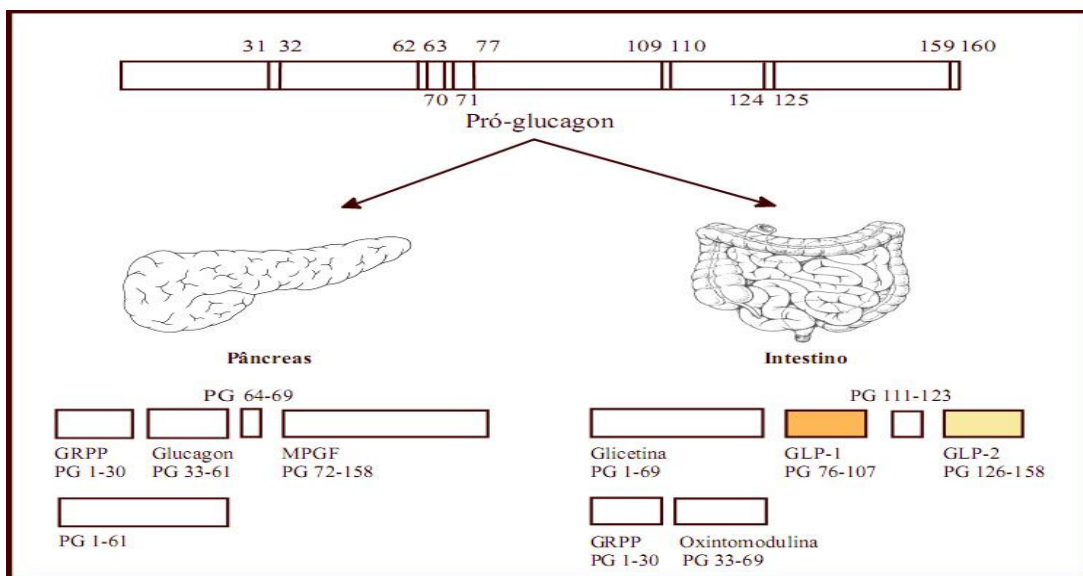


Figura 1- Processo pós-translacional do pró-glucagon.

O GLP-1 é um peptídeo que possui várias isoformas – GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>, GLP-1 (7-37), GLP-1 (1-36)NH<sub>2</sub> e GLP-1 (1-37) – que se diferenciam no número e tipo de aminoácidos. O GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>, forma amida (N-terminal truncado), é a mais predominante e com maior atividade insulínica (NAUCK, 1998). Já o GLP-1 (7-37) diferencia-se da anterior na posição final, onde a Arginina liga-se a Glicina-OH, mas também tem atividade insulínica.

O GLP-1 (1-36)NH<sub>2</sub> diferencia-se da forma GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> pelo acréscimo de seis aminoácidos no início da sequência. Por sua vez o GLP-1 (1-37) se distingue da anterior na posição final, onde a Arginina liga-se a Glicina-OH, essas últimas são, provavelmente, inativas (ORSKOV, 1992).

O GLP-1 é clivado pela enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) - também conhecida como CD26, presente na corrente sanguínea e membranas celulares (DOYLE; EGAN, 2007) - em metabólitos inativos GLP-1 (9-37) e GLP-1(9-36)NH<sub>2</sub>, que são eliminados tanto pelo fígado como pelos rins (VELASQUEZ-MIEYER *et al.*, 2003; BAGGIO; DRUCKER, 2004).

O GLP-1 é degradado primeiramente na posição N-terminal, nos dois primeiros aminoácidos, pela DPP-IV resultando na forma biologicamente inativa des(His-Ala)-GLP-1, ou seja, GLP-1 (9-36) amida (ELAHI *et al.*, 2008).

O tempo de meia-vida do GLP-1 biologicamente ativo é menor que dois minutos, enquanto que a de seu metabólito foi estimado em cerca de 5 minutos, como resultado da depuração renal (BAGGIO; DRUCKER, 2004).

A endopeptidase neutra (NEP) também pode degradar, em menor escala, o GLP-1 *in vivo*, juntamente com a depuração renal (DEACON, 2005). Plamboeck *et al.* (2005) confirmaram o papel da NEP no metabolismo do GLP-1 *in vivo*, sugerindo que até 50% do GLP-1 que entra na circulação pode ser degradado pela NEP.

A DPP-IV é uma serina-protease sintetizada no gene humano localizado no braço longo do cromossomo dois, que contem 26 éxons variando em tamanho de 45 kb para 1,4 kb. É uma proteína transmembrana tipo 2 com seis aminoácidos N-terminal no citoplasma e um domínio extracelular com um pequeno segmento flexível, regiões ricas em açúcar e cisteína, e



uma região C-terminal catalítico com uma serina-protease tipo centro catalítico (MENTLEIN, 1999).

A DPP-IV é amplamente expressa e pode ser encontrada em vários tecidos e tipos celulares, incluindo os rins, pulmões, glândulas supra-renais, fígado, testículo, intestino, baço, pâncreas e sistema nervoso central, bem como na superfície dos linfócitos, macrófagos e células endoteliais (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

“A DPP-IV tem um importante papel na regulação nutricional, resposta imune e metabolismo de hormônios peptídicos” (GORRELL, 2001 citado por MCKILLOP *et al.*, 2008, p.79)<sup>3</sup>. Essa enzima cliva especificamente dipeptídeos, oligopeptídeos ou proteínas que contêm um resíduo de alanina e prolina na posição dois, a partir do fim da cadeia de aminoácidos, modificando ou inibindo sua atividade (MENTLEIN, 1999; MCKILLOP *et al.*, 2008).

A DPP-IV é inibida por enzimas serinas inibidores que modificam covalentemente seus sítios de ação. Os principais inibidores são o fluorofosfatado diisopropilo, metais como Chumbo, Mercúrio e Zinco são bons inibidores. Inibidores de outras classes de proteases como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1,10-fenantrolina, n-etilmaleimida, leupeptina ou bestatina são ineficazes, assim como o sulfonilfluorodeido fenilmetano (MENTLEIN, 1999).

#### 2.3.1.2 Peptídeo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2)

O GLP-2 é um peptídeo de 33 aminoácidos, co-secretado junto com GLP-1 nas células L endócrinas do intestino, conforme figura 1. A DPP-IV também cliva GLP-2 reduzindo a

---

<sup>3</sup> Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2001; 54: 249-264. In: Mckillop AM, Duffy NA, Lindsay JR, O'Harte FPM, Bell PM, Flatt PR. Decreased dipeptidil peptidase-IV activity an glucagon-like peptide-1(7-36)amide degradation in type 2 diabetic subjects. *Diabet Res Clin Pract.* 2008; 79: 79-85.

alanina na posição dois, que produz o respectivo peptídeo inativo GLP-2 (3–33), com tempo de meia-vida variando de 5-10 minutos (BAGGIO; DRUCKER, 2004).

### 2.3.1.3 Polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP)

GIP foi a primeira incretina descrita, sendo denominado de polipeptídeo inibitório gástrico, mas como o efeito inibitório na secreção de ácido gástrico foi observado apenas em doses farmacológicas e na concentração fisiológica sua ação predominante é o estímulo a secreção de insulina, o GIP foi rebatizado de polipeptídeo insulínico dependente de glicose, para refletir sua ação e manter a sigla (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

GIP é um polipeptídeo de 42 aminoácidos derivado do processamento do precursor denominado proGIP de 153 aminoácidos cujo gene de 10 kilobase, composto de 6 exóns está localizado no braço longo do cromossomo 17 humano (GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008). O gene proGIP codifica um peptídeo sinal, um peptídeo N-terminal, GIP e um peptídeo C-terminal, conforme figura 2.

A sequência de aminoácidos da molécula do GIP é altamente conservada entre as espécies de humano, camundongo, rato, suínos e bovinos exibindo mais de 90% de identidade na sequência de aminoácidos (BAGGIO; DRUCKER, 2007). É sintetizado e secretado pelas células K, localizadas principalmente no duodeno e parte proximal do jejuno.

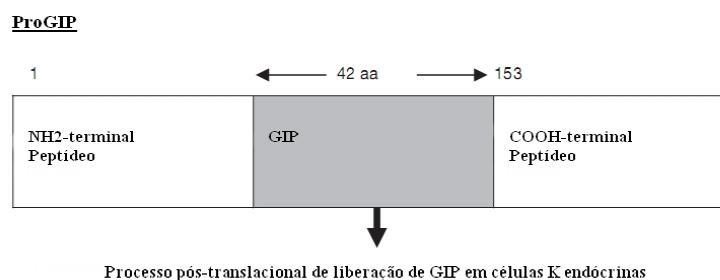


Figura 2- Processamento do proGIP.

Adaptado de: Gautier; Choukem; Girard, 2008.

Os níveis basais de GIP na circulação variam entre 0,06 e 0,1 nmol/L e aumenta para 0,2-0,5 nmol/L após a ingestão de alimentos (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

Deacon *et al.* (2000) demonstraram que GIP endógeno e exógeno são rapidamente degradados na posição N-terminal pela DPP-IV, formando um metabólito truncado por dois aminoácidos GIP(3-42), coerente com a ação da enzima DPP-IV. Isto porque GIP tem um resíduo de alanina na posição dois que é um alvo para a DPP-IV. A meia-vida de GIP na forma intacta é de 7 minutos.

### 2.3.2 Liberação dos hormônios incretinas

Por serem liberados após o consumo de alimentos, é importante salientar que nutrientes podem servir como reguladores exógenos da secreção e inativação dos hormônios incretinas com influências benéficas sobre a homeostase da glicose e lipídeos (GUNNARSSON *et al.*, 2006).

A secreção de GLP-1 pelas células L intestinais é estimulada por uma variedade de fatores nutricionais, neural e endócrino. Devido a localização distal das células L do trato gastrointestinal, a liberação de GLP-1 para a circulação é mais controlada indiretamente por fatores neurais e endócrinos, iniciada pela entrada de nutrientes no trato gastrointestinal proximal, em vez de diretamente estimulada pelo contato das células L com nutrientes (GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008).

GLP-1 é liberado rapidamente na circulação após a ingestão de nutrientes, e esta secreção ocorre em duas fases, iniciando entre 10-15 minutos e uma segunda fase de 30-60 minutos (HERMANN *et al.*, 1995, citado por BAGGIO; DRUCKER 2007). Segundo Vilsboll *et al.* (2003) o primeiro pico ocorre em 15-30 minutos e o pico mais tardio em 90-120 minutos.

O neurotransmissor peptídeo liberador da gastrina (GRP), a acetilcolina, a estimulação do ramo celíaco do nervo vago, a calcitonina e a leptina estimulam a secreção de GLP-1,

enquanto que a insulina, somatostatina podem inibir a secreção do GLP-1 de células L intestinais *in vitro* e *in vivo* (PLAISANCIE *et al.*, 1994; BAGGIO; DRUCKER, 2007).

A ingestão de gorduras e carboidratos é o primeiro estímulo para secreção de GLP-1, mas sua liberação pode ser estimulada por refeições mistas ou de nutrientes individuais, incluindo a glicose e outros açúcares, ácidos graxos, aminoácidos essenciais, e de fibras dietéticas. Gunnarsson *et al.* (2006) estudaram, em ratos, os efeitos da ingestão de gorduras e proteínas sobre os hormônios GLP-1 e GIP e concluíram que a infusão endovenosa de glicose isoladamente e a associação de glicose e proteína aumentam os níveis de GLP-1, mas não os de GIP. Entretanto, a infusão de ácido oléico em associação com glicose não tem efeito na secreção desses peptídeos. A administração isolada de proteínas aumenta os níveis de GIP e GLP-1 intactos na circulação, sugerindo que fatores da dieta – proteínas e gorduras - podem modular a bioatividade dos níveis das incretinas. A atividade dos hormônios incretinas não depende somente do estímulo dos alimentos, mas também da sua ligação aos seus respectivos receptores.

Knapper *et al.* (1995) investigaram a ação de nutrientes sobre o estímulo de GIP e GLP-1. Foram infundidos uma dieta normal, solução salina, glicose, gordura separadamente e uma combinação de glicose e gordura por um tubo inserido no duodeno de três suínos. Os autores demonstraram que as ingestões de glicose e de gordura, separadas ou combinadas, causaram elevação significativamente maior nos níveis plasmáticos de GLP-1 e GIP em comparação àquela resultante da ingestão de solução salina. Segundo Todd e Bloom (2007), a ingestão oral de carboidratos e lipídeos eleva de 10-20 vezes a concentração plasmática de GIP.

Em 2004, Paris *et al.* (2004) ao estudarem os níveis de GLP-2 em suínos com dieta estabelecida, observaram que os níveis plasmáticos de GLP-2 foram influenciados pelo tipo de dieta e foi maior em animais alimentados com ração polimérica infantil suplementada com proteína bovina concentrada.

O GIP é sintetizado e liberado pelas células K, a maioria localizada no duodeno e jejuno proximal, com um pequeno número ocorrendo em todo intestino delgado. É secretado em resposta a secreção de nutrientes, principalmente glicose e gordura. A secreção de GIP é reduzida em indivíduos com má-absorção intestinal ou que fazem uso de fármacos que prejudiquem a absorção intestinal. (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

### 2.3.3 Receptores e ações das incretinas

#### 2.3.3.1 Receptores e ações do GLP-1

Os efeitos do GLP-1 e do GIP são mediados por ações específicas da proteína G ligada à epítomos dos receptores transmembrana nas regiões N-terminal e C-terminal dos peptídeos, mas para ambos os hormônios, o N-terminal do receptor é crucial para a sua ativação (DEACON, 2005).

O receptor de GLP-1 (GLP-1R) é uma proteína de 64kDa. GLP-1R é um receptor acoplado à proteína ligada ao nucleotídeo guanina (proteína G), específico de sete transmembranas (GPCR). Os GPCRs são agrupados em quatro classes (A, B, C e D) baseados na similaridade da seqüência de aminoácidos, sendo o GLP-1R membro da classe B, que pertence a uma subclasse da família do receptor do glucagon. Esta subclasse inclui, também, os receptores de GLP-2 (GLP-2R), de GIP (GIPR), hormônio do crescimento (GHR) e secretina (SR) (DOYLE; EGAN, 2007).

O gene responsável pela síntese do GLP-1R humano está localizado no braço longo do cromossomo 6p21e foi clonado e seqüenciado no início da década de 1990. Possui 463 aminoácidos (THORENS, 1992) - apresenta 90% de identidade de seqüência de aminoácidos do receptor de ratos, mede 40kd, sendo composto de pelo menos sete exons (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

Os receptores de GLP-1 (GLP-1 R) são amplamente distribuídos pelo organismo. São expressos nas células  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\delta$  do pâncreas, pulmões, coração, rins, estômago, pele, intestino, hipófise, gânglios do nervo vago, em certas áreas do cérebro (THORENS, 1992; NAUCK, 1998) e, na região portal hepática. Vahl *et al.* (2007) demonstraram abundância de GLP-1R nos gânglios, indicando que os nervos aferentes das vísceras abdominais tenham papel relevante na sua síntese. O RNA mensageiro do GLP-1R foi detectado nos gânglios, ilhotas pancreáticas, pulmões, estômago e rins.

A expressão do GLP-1R é regulada em resposta à dexametasona, elevada concentração de glicose, ativação da proteína quinase C (PKC) e GLP-1 (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

A ligação do GLP-1 ao seu receptor é muito específica, sem reatividade cruzada com outros peptídeos, com exceção do glucagon, que se liga ao GLP-1R com 100 a 1000 vezes menos afinidade que o GLP-1 (FEHMANN *et al.*, 1994 citado por DOYLE; EGAN, 2007). A região N-terminal dos aminoácidos das posições 1, 4 e 7 da molécula de GLP-1 são cruciais para o reconhecimento do receptor e atividade biológica (GALLWITZ *et al.*, 1996).

Os membros da família do glucagon são acoplados à subunidade  $G\alpha_s$  com conseqüente ativação da adenilato ciclase (AC I-IX), seguida da produção do AMPc, embora alguns, incluindo o GLP-1R, sejam capazes de sinalização por meio das subunidades adicionais da proteína G (THORENS, 1992).

A ligação do GLP-1 ao seu receptor na célula beta pancreática ativa a adenilato ciclase que promove imediata liberação de AMPc (THORENS, 1992). Hansen *et al.* (1998), observaram que a forma truncada (7-37) do GLP-1 era a mais potente dos peptídeos examinados na estimulação de AMPc em glândulas gástricas de ratos e em células gástricas cancerígenas humanas (HGT-I).

Subseqüente à produção de AMPc, há o estímulo à secreção de insulina, cujos mecanismos são: Inibição direta dos canais de potássio, aumento da despolarização da membrana celular, aumento da síntese de ATP mitocondrial e ativação dos canais de cálcio (MONTROSE-RAFIZADEH; EGAN; ROTH, 1994). Isto resulta no maior influxo celular de cálcio, o que promove a exocitose dos grânulos de insulina, conforme a figura 3. Além disso, o GLP-1 estimula diretamente a exocitose destes grânulos (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

O GLP-1 também pode promover a transcrição do gene de insulina, estabilidade do mRNA e biosíntese, e portanto, tem o potencial para reabastecer os estoques de insulina das células  $\beta$  e evitar o esgotamento das reservas das mesmas (DRUCKER *et al.*, 1987). Os mecanismos pelos quais o agonista de GLP-1 aumenta a transcrição e biosíntese do gene de insulina são ativação das vias de sinalização independentes e dependentes de AMPc e PKA e o aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular. O fator nuclear de células T ativadas (NFAT) pode também ser um importante mediador do GLP-1 e da transcrição gênica de insulina GLP-1-induzida (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

O GLP-1 aumenta a transcrição do gene Homeobox pâncreato-duodenal-1 (Pdx-1), fator de transcrição essencial para o desenvolvimento embrionário do pâncreas e função das células  $\beta$ , e aumenta a sua ligação ao gene promotor da secreção de insulina (WANG *et al.*, 1999).

O GLP-1 tem efeito citoprotetor, de estímulo à diferenciação e neogênese e anti-apoptótico nas células  $\beta$  pancreáticas. Farilla *et al.*, (2003) observaram que o GLP-1 melhorou a viabilidade das células  $\beta$  e a função das ilhotas, sugerindo que GLP-1 não é apenas um fator para o crescimento das células  $\beta$ , mas também um potente agente anti-apoptose. Os mecanismos pelos quais GLP-1 exerce estas ações ainda não são bem definidos, mas envolvem a ativação da proteína quinase B (PKB) - Akt1- e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (WANG; BRUBAKER, 2002), bem como a interação sinérgica com a transformação do fator  $\beta$  de crescimento e regulação do fator de transcrição (KEMP; HABENER, 2001). A inibição dependente de GLP-1 da apoptose das células  $\beta$  está associada com a diminuição dos níveis de proteínas pró-apoptóticas incluindo a caspase 3 (BAGGIO e DRUCKER, 2007).

O GLP-1 também inibe o esvaziamento gástrico e secreção de glucagon e grelina, tem efeito sobre a saciedade e estimula a secreção de somatostatina (DRUCKER, 2003). O efeito estimulatório de GLP-1 sobre a secreção de somatostatina provavelmente é causado pela interação direta com os receptores de GLP-1 sobre as células  $\delta$  pancreáticas secretoras de somatostatina. Já o mecanismo pelo qual GLP-1 inibe a secreção de glucagon das células  $\alpha$  pancreáticas é menos claro e pode envolver a ação direta aos receptores das células  $\alpha$ , pode ser mediado indiretamente por estimulação de insulina e/ou secreção de somatostatina (HELLER; KIEFFER; HABENER, 1997). Os efeitos insulínotropicos de GLP-1 podem reduzir os níveis de grelina, o que contribui para seus efeitos anoréxicos (HAGEMANN *et al.*, 2007).

Os receptores de GLP-1 também estão presentes nas células adiposas com alta afinidade, melhorando a sinalização de insulina e a resposta à insulina por meio da síntese de ácidos graxos (EGAN *et al.*, 1994).

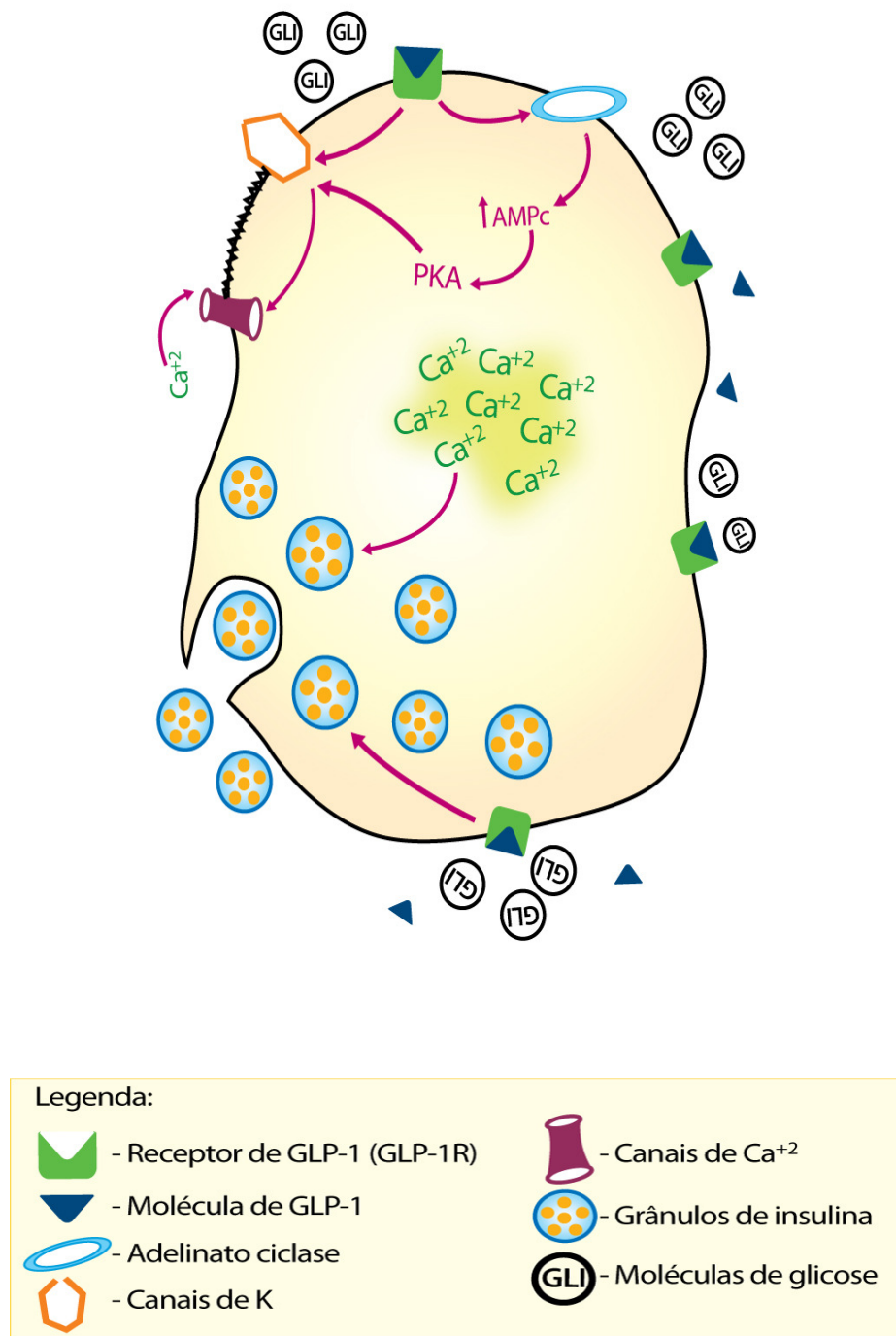


Figura 3 - Mecanismo de ação do GLP-1 na secreção de insulina.



### 2.3.3.2 Receptores e ações do GLP-2

Os receptores de GLP-2 são, predominantemente, expressos no trato gastrointestinal e cérebro. Guan *et al.* (2006) determinaram a localização de GLP-2R através da reação de polimerase em cadeia (PCR).

A expressão de GLP-2R mRNA foi localizada nas células epiteliais e no plexo mesentérico no jejuno proximal. O GLP-2R foi co-localizado em neurônios entéricos. O GLP-2 exerce diversas ações no trato gastrointestinal como: o aumento da sobrevivência e proliferação das células epiteliais da circulação sanguínea da mucosa intestinal, supressão da motilidade e secreção gástrica (GUAN *et al.*, 2006), regula a homeostase energética e os efeitos crônicos sobre a motilidade intestinal e absorção de nutrientes, regula o transporte intestinal de glicose, do alimento ingerido e da secreção de ácido gástrico (BAGGIO; DRUCKER, 2004).

Além de estimular a proliferação das células epiteliais, o GLP-2 inibe a apoptose das criptas intestinais, por isso é considerado um importante regulador da proliferação epitelial intestinal sob condições fisiológicas e patológicas (BRUBAKER; DRUCKER, 2004).

O GLP-2 também reduz a reabsorção óssea e promove a proliferação e sobrevivência neuronal (LOVSHIN *et al.*, 2001 citado por BAGGIO; DRUCKER, 2007, p.2134)<sup>4</sup>. Jasleen *et al.* (2002) examinaram os efeitos de GLP-2 sobre 3 diferentes linhas de células intestinais epiteliais: Caco-2, T84, e IEC-6 e concluíram que o peptídeo tem um efeito mitogênico direto sobre as células epiteliais intestinais humanas *in vitro*.

Meier *et al.* (2006) concluíram que GLP-2 aumenta as concentrações de glucagon durante jejum e ingestão de alimentos, inibe a secreção de ácido gástrico, mas não tem efeito sobre o esvaziamento gástrico. Além disso, o aumento pós-prandial nas concentrações de

---

<sup>4</sup> Lovshin J, Estall J, Yusta B, Brown TJ, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 action in the murine central nervous system is enhanced by elimination of GLP-1 receptor signaling. *J Biol Chem* 2001; 276:21489–21499. In: Baggio LL, Drucker DJ. *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. *Gastroenterol.* 2007; 132(6): 2131-57.

triglicérides e ácido graxo livre em resposta à administração de GLP-2 parece indicar uma melhora na absorção intestinal de lipídeos e contribui para os efeitos anabólicos do peptídeo.

### 2.3.3.3 Receptores e ações do GIP

O receptor de GIP (GIPR) também é um membro da superfamília de receptores heterotriméricos acoplados à proteína G. (BAGGIO; DRUCKER, 2007)

Segundo Almind *et al.* (1998) os genes do receptor humano de GIP contem 14 exons. Seu estudo demonstrou que a variante do códon 354 não confere um aumento no risco de diabetes tipo 2. O gene do receptor de GIP está localizado no cromossomo 19, banda q13.3 (BAGGIO; DRUCKER, 2007). O gene GIPR tem 13,8kb de tamanho e contém 14 exons (YAMADA *et al.*, 1995).

O receptor de GIP mRNA é distribuído amplamente em órgãos periféricos, inclusive o pâncreas, intestino, tecido gorduroso, coração, córtex adrenal e cérebro. Também estão presentes na traquéia, osso, células endoteliais, tireóide, testículos, baço, timo, pulmões e rins. Desse modo, pode ter outros efeitos além da estimulação da secreção de insulina (YIP; WOLFE, 2000).

Assim como o GLP-1, a ativação do receptor de GIP aumenta os níveis de AMPc, os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular (DING; GROMADA, 1997). A ação do GIP é mediada pela ativação de AMPc/PKA e AMPc/Epac2, além das vias de sinalização da fosfolipase  $A_2$  e uma proteína-quinase específica (EHSES *et al.*, 2001).

O GIP é responsável pelo efeito incretina e aumento da secreção de insulina induzido pela ingestão de carboidrato (TODD; BLOOM, 2007) e pode estimular a secreção de glucagon (MEIER *et al.*, 2006). Porém, segundo Gautier; Chouken; Girard (2008), o hormônio GIP não influencia a secreção de glucagon das células- $\alpha$  pancreáticas em humanos, nem afeta o esvaziamento gástrico.

Segundo Gespach; Emami; Rosselin (1984), o GIP regula a secreção gástrica por mecanismos diretos, semelhante ao mecanismo que ocorre em ratos. O GIP está presente em extrato de placenta de ratos e sua produção é estimulada pela placenta e assim pode

normalizar a secreção de ácido gástrico estimulado pela pentagastrina no fim da gestação (CHEN *et al.*, 1995).

Os receptores de GIP também estão presentes nos adipócitos e sua indução é mantida em todo processo de maturação dos adipócitos (SONG *et al.*, 2007), por isso, o GIP pode regular o seu metabolismo, incluindo a liberação de insulina estimulada pela incorporação de ácidos graxos em triglicerídeos, estimulação da atividade da lipase lipoprotéica, a estimulação da síntese de ácidos graxos (GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008). O mecanismo pelo qual o GIP exerce seu efeito sobre o tecido adiposo parece não ser por meio da adenilato ciclase e sim por um efeito célula-específica (SONG *et al.*, 2007).

A ingestão de gordura é um potente estimulador da secreção de GIP em humanos e os níveis plasmáticos de GIP estão aumentados em obesos. Os efeitos anabólicos de GIP na gordura incluem estimulação da síntese de ácidos graxos e reesterificação, acentuamento da incorporação estimulada pela insulina, de ácidos graxos em triglicerídeos, regulação da síntese da lipoproteína lípase e a redução da lipólise estimulada pelo glucagon (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

Assim como o GLP-1, o GIP é capaz de regular tanto o crescimento como a morte das células  $\beta$ , por meio do controle dinâmico da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e pela inibição da atividade da caspase 3 (EHSES *et al.*, 2003).

## **2.4 Importância clínica no diabetes melito tipo 2 e gestacional**

Pelo fato do diabetes melito tipo 2 se associar a doenças cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal, amputações de membros, má-formação fetal, além do alto índice de hospitalizações, representam alto custo para os sistemas de saúde e por isso merece um importante controle.

Os hormônios incretinas desempenham um papel muito importante no controle da glicemia pós-prandial. O GIP além de estimular a secreção de insulina regula o metabolismo dos adipócitos (TODD; BLOOM, 2007; GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008),

resultando em um melhor controle da glicemia e obesidade, fatores de grande importância na patogênese do diabetes.

GLP-1 estimula a secreção de insulina, ajuda no controle da saciedade, e atua na sobrevivência das células  $\beta$ , contribuindo para a proliferação da massa das células  $\beta$  e para o seu efeito anti-apoptótico (WANG *et al.*, 1993; WANG; BRUBAKER, 2002; DRUCKER, 2003; BAGGIO; DRUCKER, 2007). Assim, além de participar do metabolismo da glicose, o GLP-1 restaura as células  $\beta$  pancreáticas, alvo de destruição da disfunção gerada pelo diabetes.

Alguns estudos têm demonstrado que a diminuição da secreção ou ação destes hormônios tem relação com o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2 (NAUCK *et al.*, 1993; VILSBOLL *et al.*, 2002; VILSBOLL, 2004; FORBES *et al.*, 2005).

A diminuição da eficácia do GIP contribui para o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2, (NAUCK *et al.*, 1993) pois um defeito na ação de GIP pode prejudicar a função das incretinas (VILSBOLL *et al.*, 2002).

Pacientes com intolerância oral à glicose, em estudo realizado por Rask *et al.* (2004) demonstraram sensibilidade à insulina diminuída em relação aos hormônios GLP-1 e GIP. O mesmo acontece em pacientes obesos comparados à pacientes com peso normal. Muscelli *et al.* (2008) demonstraram que o efeito incretina sobre a secreção de insulina total é menor com o aumento do IMC, assim como o efeito incretina sobre a sensibilidade das células  $\beta$ .

Mulheres com diabetes gestacional apresentaram concentração de glicose plasmática maior que mulheres saudáveis após a ingestão de 75g de glicose, sendo maior depois de duas horas da ingestão. Além disso, a resposta ao GLP-1 de 0-30 minutos foi mais baixa em mulheres com diabetes gestacional (FORBES *et al.*, 2005).

Deste modo, características como intolerância oral à glicose, diabetes gestacional e obesidade são indícios de defeito dos níveis hormônios incretinas, como causa ou consequência da patogênese do diabetes, sendo importante o rastreamento de pacientes com tais características, analisando quantitativamente os níveis desses hormônios, por meio de técnicas específicas como testes imunoenzimáticos, para posterior prevenção e tratamento.

Novas medicações que mimetizam as ações do GLP-1 e inibem a DPP-IV podem ajudar na recuperação da homeostase glicêmica dos pacientes com diabetes melito tipo 2. O *Exenatida* é um mimético do GLP-1 com 50% de igualdade na sequência de aminoácidos,

capaz de reduzir a glicemia pós-prandial e de jejum e os níveis de hemoglobina glicada (DRUCKER, 2003). O exendin-4 é sintetizado pelas glândulas salivares do *Heloderma Suspectum* ou lagarto monstro do Gila, nativo do Arizona (Estados Unidos da América) e não possui o local de reconhecimento da DPP-IV, tornando-se um importante agente insulínico (DOYLE; EGAN, 2007). Enquanto os inibidores da DPP-IV, sitagliptin e vildagliptin, aumentam os níveis de GLP-1 endógeno por inibir a degradação enzimática do GLP-1 (DAVIDSON; PARENTE; GROSS, 2008)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

- Analisar os níveis séricos da incretina GLP-1 durante a gestação nos estados de jejum e pós-prandial em gestantes atendidas no Hospital Universitário de Campo Grande-MS.

#### **3.2 Específicos:**

- Comparar os níveis de GLP-1 no jejum no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gestação em mulheres não diabéticas.
- Comparar os níveis de GLP-1 no período pós-prandial no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gestação em mulheres não diabéticas.

## **4 PACIENTES E MÉTODO**

### **4.1 Tipo de estudo**

Foi realizado o estudo descritivo observacional do tipo longitudinal, prospectivo.

### **4.2 Aspectos éticos**

A aprovação do projeto foi solicitada ao Comitê de Ética e Pesquisa da UFMS, de acordo com a Resolução 196/96 (Conselho Nacional de Saúde), que foi obtida com o protocolo nº. 1133 de 29 de maio de 2008 (Anexo A). A declaração de uso de material biológico foi adequadamente preenchida (Anexo B).

A aprovação do projeto também foi solicitada ao Conselho Diretivo do Núcleo do Hospital Universitário da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, a qual foi obtida com a resolução nº 6 de 17 de fevereiro de 2009 (Anexo C).

### **4.3 Comunicado aos profissionais de saúde**

Um comunicado sobre o projeto, com os devidos documentos de aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa, foi enviado aos profissionais dos ambulatórios de Ginecologia e Obstetrícia do HU/UFMS para ciência destes.

## **4.4 População estudada**

### 4.4.1 Critérios de inclusão

Foram considerados sujeitos da pesquisa, pacientes que se encontravam no primeiro trimestre de gestação (idade gestacional < 13 semanas) e não diabéticas.

### 4.4.2 Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão: diagnóstico de diabetes melito, idade menor que 18 anos, indígena, doenças mentais, institucionalização em unidades de detenção.

### 4.4.3 Critério de descontinuidade

O desenvolvimento do diabetes gestacional foi considerado critério de descontinuidade.

## **4.5 Casuística**

Durante o período da pesquisa, 20 gestantes que atendiam aos critérios de inclusão foram convidadas a participar, sendo que três gestantes recusaram por motivos pessoais e 17 aceitaram. Foram coletadas amostras sanguíneas de 17 pacientes e foram incluídas na análise estatística as amostras de 14 gestantes atendidas no ambulatório Gestação do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, da UFMS, durante o período de junho de 2009 a fevereiro de 2010. Do total de gestantes que aceitaram participar, três foram excluídas, duas por desenvolverem diabetes gestacional e uma por apresentar idade gestacional superior aos critérios da pesquisa.



#### **4.6 Variáveis pesquisadas**

Variável dependente: GLP-1. Foram consideradas as medianas das dosagens de GLP-1 no jejum e pós-prandial no primeiro, segundo e terceiro trimestres.

Variáveis independentes: idade gestacional, peso, história de diabetes na família, abortos, número de gestações.

A idade gestacional foi calculada em semanas, considerando a data da última menstruação e ultrassom, e categorizada em primeiro trimestre (zero a 13 semanas), segundo trimestre (13 semanas e um dia a 26 semanas) e terceiro trimestre (26 semanas e um dia até o termo da gestação).

Para definir o índice de massa corpórea (IMC) foram utilizados os parâmetros antropométricos, calculando-se o IMC a partir do peso (quilogramas) e da altura (metros), por meio da fórmula  $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ .

A classificação do peso seguiu o critério da Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) que indica o IMC de acordo com a idade gestacional (Brasil, 2008), (Anexo D).

Os dados referentes a histórico de diabete na família, número de aborto e número de gestações antecedentes foram informados pelas participantes durante a primeira abordagem.

#### **4.7 Abordagem das gestantes**

Antes da consulta médica, as gestantes foram abordadas individualmente para a exposição de informações sobre o projeto e procedeu-se o convite de participação. No total, 20 gestantes que atendiam aos critérios de inclusão foram convidadas e 17 aceitaram participar do estudo enquanto três gestantes não aceitaram devido à indisponibilidade de tempo. Para aquelas que aceitaram participar, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice A). Posteriormente responderam junto à pesquisadora um formulário, que foi atualizado a cada trimestre (Apêndice B).

Após adesão voluntária, as pacientes foram submetidas a protocolo específico, incluindo anamnese dirigida, cálculo da idade gestacional, ultra-sonografia obstétrica, e exames da rotina de pré-natal. A anamnese foi realizada na primeira consulta da assistência pré-natal para identificar os critérios de inclusão e exclusão. O cálculo da idade gestacional, assim como a ultra-sonografia obstétrica e os dados referentes aos exames de rotina foram realizados pelos profissionais responsáveis pelo pré-natal. Antecedente pessoal de diabetes gestacional, antecedente familiar de diabetes melito, macrosomia, óbito fetal sem causa aparente, abortamento habitual foram informados pelas pacientes durante a primeira abordagem.

Para avaliar a possibilidade de diabetes melito foram realizadas as dosagens de glicemia de jejum em cada trimestre e as gestantes que apresentavam glicemia superior a 90 mg/dL foram submetidas ao teste de tolerância à glicose (TTG) e as que apresentaram teste compatível com diabetes melito foram excluídas da pesquisa.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram processados pelos programas Excel, o *software* estatístico *Minitab* Versão 14 *for Windows* e realizou-se também a estatística descritiva, sendo algumas variáveis apresentadas em forma de tabelas. Para todos os testes foram considerados o valor de p de 0,05.

Para a comparação dos níveis de GLP-1 entres os trimestres, foi escolhido o teste de Wilcoxon, que é um teste não paramétrico para dados pareados obtidos em ocasiões diferentes. Baseia-se no sentido e na magnitude das diferenças entre os pares (AYRES *et al.*, 2003). Trata-se, portanto de um estudo de dados emparelhados (o mesmo indivíduo é submetido a duas medidas: antes e depois).

## **4.9 Procedimento de coleta de dados**

### **4.9.1 Coleta de sangue para dosagem do GLP-1**

Para coleção do plasma, o sangue foi coletado em tubos refrigerados de Vacutainer® EDTA. Imediatamente foi acrescentado 10µl do inibidor DPP-IV para cada ml de sangue total, conforme as orientações do fabricante do kit GLP-1 (Milipore – www.milipore.com). As amostras foram centrifugadas imediatamente em centrífuga refrigerada (Sigma 4k15) a 4000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. O plasma foi separado, distribuído em eppendorff e estocado a -20 °C até a análise do GLP-1.

As coletas foram realizadas a cada trimestre de gestação, sendo em jejum e 30 minutos após um café da manhã padronizado, de 401,33 ±1,33 kcal, sendo aproximadamente 59,4% de carboidrato, 16% de proteína e 24,6% de gordura, previamente calculados (Apêndice D), baseado em uma dieta normal de 2000 kcal, seguindo as recomendações da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 360 de 23 de dezembro de 2003 da Agência de Vigilância Sanitária.

### **4.9.2 Procedimento para dosagem do GLP-1**

As dosagens do hormônio GLP-1 foram realizadas com o apoio da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas-SP.

As análises foram feitas em duplicata, seguindo as instruções do fornecedor do kit Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA (EGLP-35K), Linco da Milipore. Este kit é não altamente específico para medir imunologicamente as formas ativas de GLP-1, GLP-1 (7-36 amida) e GLP-1 (7-37) em plasma e outros meios biológicos.

O teste foi realizado pelo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) sanduíche, sendo o método de detecção o fluorimétrico. O princípio do ELISA sanduíche consiste na captura de antígenos por anticorpos específicos impregnados na microplaca. O conjugado (anticorpo anti-antígeno marcado por uma enzima) interage com o antígeno capturado para proporcionar especificidade à reação. O fluorocromo (fluoróforo), substância que interage

com conjugado, emite fluorescência à reação após ser degradado pela enzima que marca o conjugado. A intensidade de fluorescência emitida é medida por um espectrofotômetro e corresponde à quantidade da substância pesquisada.

Assim, a análise do GLP-1 foi baseada sequencialmente em (Figura 4):

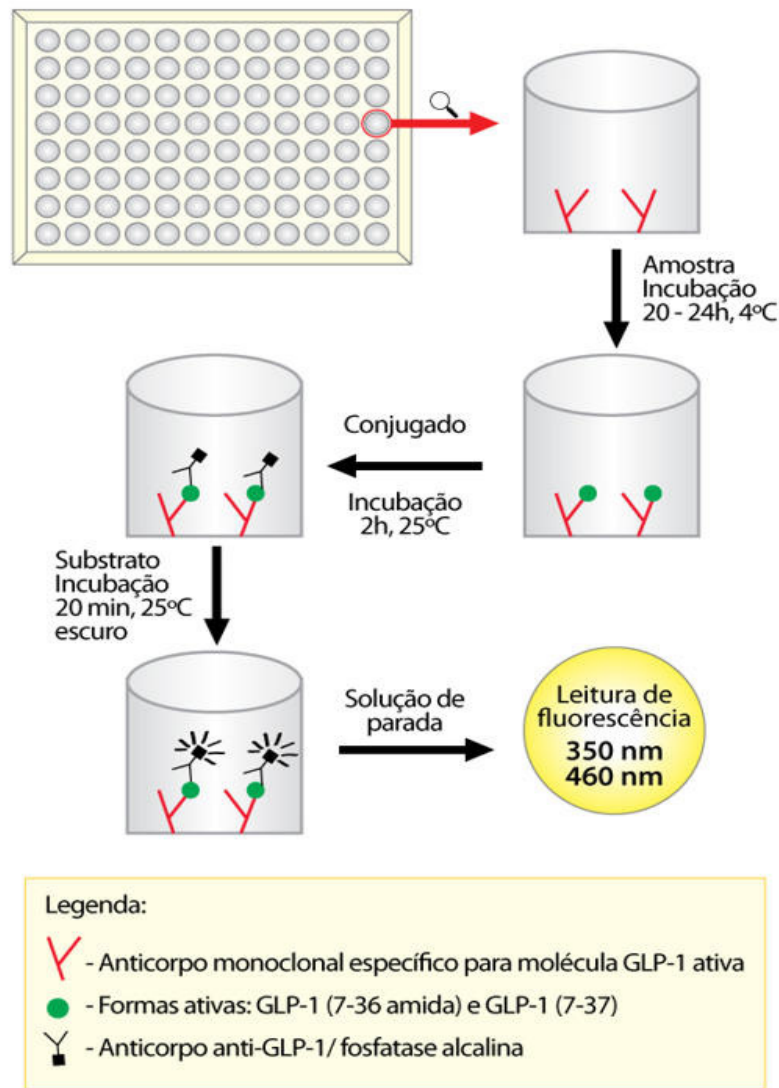


Figura 4 - Esquema da dosagem do GLP-1 pelo método de ELISA

Primeiro ocorreu a captura do GLP-1 ativo da amostra por um anticorpo monoclonal imobilizado nos poços da microplaca, o qual ligou-se especificamente na região N-terminal da molécula de GLP-1 ativo. Depois a microplaca foi lavada para remoção das substâncias não ligadas. Então, adicionou-se o conjugado, anti-GLP-1 fosfatase alcalina, o qual se ligou ao GLP-1 capturado. A microplaca foi lavada novamente para remoção do conjugado não ligado.

Após foi adicionado o substrato 4-metil umbelifeil fosfato (MUP), que na presença da fosfatase alcalina forma um produto fluorescente que é o metil umbeliferona (MU) – fluoróforo.

A quantidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do GLP-1 ativo e foi medida no leitor Biostack Ready, da Biot.

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados nas tabelas de um a sete. No período de junho de 2009 a fevereiro de 2010, 20 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo. Dezesete pacientes aceitaram o convite. Foram coletadas amostras sanguíneas de 17 pacientes e, dentre estas, foram analisadas os resultados de 14 gestantes. Os dados de três mulheres não foram incluídos na análise estatística devido ao desenvolvimento de diabetes gestacional em duas pacientes e erro no cálculo da idade gestacional em uma paciente.

### 5.1 Características da população estudada

As coletas das variáveis independentes e as dosagens do GLP-1 foram realizadas no 1º, 2º e 3º trimestre entre a 10ª e 13ª semanas (média de 12 semanas), 20ª e 25ª semanas (média de 22 semanas) e 27ª e 31ª semanas (média de 29 semanas), respectivamente.

Dentre os sujeitos da pesquisa seis (42,85%) apresentaram idade igual ou superior a 30 anos, sendo apenas uma com idade superior a 40 anos. A maioria (57,14%) teve idade inferior a 30 anos. Em relação a gestações anteriores, duas gestantes eram multíparas e a metade (50,00%) primigesta. Cinco gestantes relataram aborto em gestação anterior, sendo que uma (7,14%) apresentou dois abortos. O antecedente de diabetes melito na família, e pessoal de pré-eclâmpsia e macrossomia estiveram presentes em 71,43%, 7,14% e 7,14%, respectivamente, conforme a tabela 1.

Tabela 1 – Número e porcentagem de gestantes de acordo com a faixa etária, paridade, número de aborto e antecedentes pessoais, n=14, Campo Grande-MS.

Variáveis	Número	(%)
<b>Idade (anos)</b>		
20-29	08	57,14
30-40	05	35,71
>40	01	7,14
<b>Paridade</b>		
Primigesta	07	50,00
Secundigesta	05	35,71
Múltipara	02	14,29
<b>Abortos</b>		
0	09	64,29
1	04	28,57
2	01	7,14
<b>Antecedentes Pessoais</b>		
Diabete melito	10	71,43
Pré-eclâmpsia	01	7,14
Macrossomia	01	7,14

Durante o primeiro trimestre, seis gestantes (42,86%) apresentaram sobrepeso -  $IMC > 25,5$ , sendo que apenas uma gestante foi classificada como obesa em todos os trimestres. No segundo e terceiro trimestres metade das gestantes apresentaram sobrepeso com  $IMC > 26,7$  e  $IMC > 27,7$ , respectivamente. Os resultados do IMC em cada trimestre estão representados na tabela 2.

Tabela 2 – Índice de massa corporal (IMC) nos três trimestres de gestação, em gestantes não diabéticas, Campo Grande-MS.

Paciente	IMC		
	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre
1	18	18,9	19,7
2	28	30,9	29,4
3	26,7	28,6	30
4	42,1	41,2	40,9
5	26,4	27,6	30,4
6	24,4	28,8	28,8
7	23,1	25,7	27,5
8	23	25,7	25,2
9	21	21,5	24,1
10	17,5	20,2	21,5
11	20	19,7	21,6
12	26,7	28,9	28,9
13	28,2	29,9	32
14	24,6	25,7	25,7

## 5.2 Resultados do GLP-1

As medianas das dosagens plasmáticas de GLP-1 no jejum foram estatisticamente semelhantes nos três trimestres da gestação. No período pós-prandial observou-se um pequeno aumento da concentração do GLP-1 no terceiro trimestre, em relação aos trimestres anteriores.



Tabela 3 – Mediana e intervalo dos níveis de GLP-1 em cada trimestre de gestação em jejum e após 30 minutos (pmol/L), n=14, Campo Grande-MS.

Tempo (min)	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre
Jejum	3,15 (2,03-7,19)	3,16 (2,60-10,82)	3,28 (2,92-13,15)
Pós-prandial	3,95 (2,74-12,34)	3,94 (2,63-7,89)	4,60 (3,04-5,69)
Pós-prandial – jejum	0,80	0,78	1,32

Para a análise dos resultados do GLP-1 entre os trimestres foi realizado, primeiramente, o teste de normalidade com o objetivo de saber se a amostra tinha distribuição normal e determinar qual teste estatístico seria o mais adequado. Foi realizado o teste de normalidade dos dados através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Foram analisados os dados referentes aos três períodos de análise (três trimestres) inclusive em jejum e após 30 minutos da primeira refeição.

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* constatou normalidade nos dados referentes ao 2º trimestre de gestação após 30 minutos ( $P > 0,150$ ), sendo que nos demais períodos os dados não apresentaram distribuição normal. Diante desses resultados optou-se pela aplicação de testes não paramétricos para as análises estatísticas.

A comparação entre as diferenças das medianas entre 2º e 1º, 3º e 1º e 3º e 2º não demonstrou diferença estatística para as dosagens realizadas no jejum. No período pós-prandial houve elevação no terceiro trimestre de gestação.

Tabela 4 - Teste de *Wilcoxon* com as diferenças dos dados emparelhados, n=14, Campo Grande-MS.

Estado	Período	Wilcoxon	Mediana	Inferior	Superior	P
Jejum	2º - 1º trimestre	59,0	0,17	-0,39	1,01	0,706
	3º - 1º trimestre	64,0	0,16	-0,24	0,81	0,490
	3º - 2º trimestre	58,0	0,07	-0,72	0,50	0,754
Pós prandial	2º - 1º trimestre	43,5	-0,24	-1,29	0,35	0,594
	3º - 1º trimestre	71,5	0,34	-0,19	0,98	0,245
	3º - 2º trimestre	85,0	0,59	0,10	1,27	0,045

## 6 DISCUSSÃO

As ações do GLP-1 no organismo são importantes para manter o equilíbrio glicêmico e a sobrevivência das células  $\beta$ . Alguns estudos têm demonstrado que a diminuição da secreção ou ação destes hormônios tem relação com o desenvolvimento do diabetes melito tipo 2 (NAUCK *et al.*, 1993; VILSBOLL *et al.*; 2002, VILSBOLL 2004; FORBES *et al.*, 2005). Estudos mais recentes indicam que a deficiência desses hormônios é secundária ao diabetes e não sua causa (KNOP *et al.*, 2007; HOJBERG *et al.*, 2008; VOLLMER *et al.*, 2008).

Dentre as incretinas, o GLP-1 é a principal responsável pelo efeito incretina. É o GLP-1 o principal mediador do estímulo à secreção de insulina glicose-mediado (VELASQUEZ-MIEYER *et al.*, 2003), o que justificou sua seleção para o estudo. A secreção de GLP-1 é estimulada pela glicose ingerida na forma de carboidratos simples e complexos. Embora as células L intestinais estejam localizadas, principalmente, no íleo distal e cólon, a secreção fisiológica de GLP-1 apresenta o primeiro pico em 15-30 minutos após o início da ingestão de alimentos seguido de um pico mais tardio entre 90-120 minutos (VILSBOLL *et al.*, 2003). Por esse motivo optou-se pela dosagem plasmática do GLP-1 em jejum e 30 minutos após refeição de aproximadamente 400 kcal.

O tempo de coleta de 30 minutos após a refeição utilizado neste estudo foi baseado em pesquisas anteriores (VILSBOLL *et al.*, 2003; RASK *et al.*, 2004; FORBES *et al.*, 2005) que demonstraram pico da secreção basal de GLP-1 em 30 minutos ou alguma observação importante neste mesmo período. Isto também foi registrado em estudos mais recentes (VOLLMER *et al.*, 2008; LINDGREN *et al.*, 2009, PALA *et al.*, 2010).

Já foi demonstrado que os alimentos funcionam como estimuladores exógenos da secreção dos hormônios incretinas, sendo influenciados, principalmente, pelos carboidratos, gorduras e proteínas (KNAPPER *et al.*, 1995; GUNNARSSON *et al.*, 2006). A pesquisa foi baseada em uma dieta normal (2000 kcal), para uma refeição de café da manhã (401,33  $\pm$  1,33 kcal) com aproximadamente 59,4% de carboidrato, 16% de proteína e 24,6% de gordura.

Ahbén *et al.* (2003) utilizaram um café da manhã de 450 kcal composto de 50% de carboidratos, 23% de gordura e 27% de proteínas e obtiveram o pico de GLP-1 em 30 e 90

minutos após a refeição. As concentrações de GLP-1, analisadas por radioimunoensaio, durante a infusão salina foram de 1,9 pmol/L em jejum e 5,6 pmol/L após a alimentação e assim como no presente estudo, a concentração de GLP-1 pós-prandial foi inferior ao valor de referência. Toft-Nielsen *et al.* (2001) encontraram, pelo método de radioimunoensaio, concentrações de GLP-1 em jejum de 6,6 pmol/L para diabéticos tipo dois e 4,9 pmol/L para pacientes com intolerância à glicose e com tolerância normal à glicose e os valores após 240 minutos foram, respectivamente, de 907 pmol/L, 1927 pmol/L e 1587 pmol/L.

Viltsboll *et al.* (2003) demonstraram que o valor calórico da refeição influencia no resultado pós-prandial da GLP-1. Encontraram valores estatisticamente superiores utilizando refeições de 520 kcal (GLP-1intacto =  $1742 \pm 329$ ) em comparação aos encontrados após refeição com 260 kcal (GLP-1intacto =  $1544 \pm 306$ ). Isto justificou a padronização da refeição utilizada neste estudo.

Em todos estes estudos observam-se grandes diferenças na concentração de GLP-1. Isto pode ser devido ao teste laboratorial utilizado para a dosagem. Segundo Deacon *et al.* (2009) a análise dos hormônios GLP-1 e GIP por ensaios imunológicos é difícil, porque o metabolismo das moléculas precursoras desses hormônios origina vários peptídeos diferentes, como as isoformas de GLP-1, que podem reagir de forma cruzada durante o teste e, conseqüentemente, alterar o seu resultado. O teste de radioimunoensaio, por detectar não só a região N-terminal da molécula de GLP-1, mas também a região C-terminal, tende a superestimar a concentração do hormônio. O ideal seria a extração dos peptídeos interferentes antes da análise. O teste de ELISA sanduíche, por sua vez, não detecta a região C-terminal e, por isso, reflete com maior fidedignidade, os níveis plasmáticos de GLP-1 intacto, que é o responsável pelos efeitos endócrinos de GLP-1. Entretanto, alguns interferentes ainda podem ser encontrados, mas em menor quantidade que no radioimunoensaio.

O teste de ELISA possui alta especificidade e o kit utilizado, Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA (EGLP-35K), é altamente específico para medir imunologicamente as formas ativas de GLP-1, GLP-1 (7-36 amida) e GLP-1 (7-37) em plasma e outros fluidos biológicos. Desse modo, somente essas formas foram detectadas, enquanto em outros estudos podem ter sido detectados, também, outros metabólitos.

Outros interferentes dos testes para dosagem de GLP-1 são a rápida degradação, a necessidade da utilização de inibidores, aparelhos refrigerados, que além de prejudicar o teste, o encarecem ainda mais.

Os resultados encontrados nesta pesquisa demonstram que durante a gestação, não houve alteração dos níveis de GLP-1 na maior parte dos resultados, tanto no jejum como no período pós-prandial. Estes resultados permitem algumas suposições: a gestação não interfere na síntese e secreção de GLP-1; a amostra foi pequena; o momento da coleta não foi adequado para testar os objetivos da pesquisa.

O tempo de coleta, como já mencionado, foi baseado em estudos anteriores, cujos resultados apontaram para um primeiro pico de 30 minutos. Porém o ideal seria fazer uma curva de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos e observar se os níveis pós-prandiais de GLP-1 estariam dentro dos valores indicados. Na pesquisa foram encontrados valores de aproximadamente 3 a 5 pmol/L, tanto para o período de jejum quanto para o pós-prandial.

Pala *et al.*, (2010), usando o mesmo teste – Linco, também encontraram valores inferiores ao de referência no pico de 30 minutos ( $\pm 10$  pmol/L para o grupo controle,  $\pm 3$  pmol/L para o grupo com diabetes melito tipo 2 e  $\pm 5$  pmol/L para o grupo com tolerância diminuída à glicose).

Já no estudo de Han *et al.*, (2010) o nível de GLP-1 intacto para o grupo com diabetes melito foi de aproximadamente 6 pmol/L, no pico correspondente a 20 minutos, e para o grupo não diabético, foi de  $\pm 5$  pmol/L para o pico de 30 minutos, utilizando o mesmo teste de ELISA e refeição de 556 kcal.

Por outro lado, Carr *et al.*, (2010) analisaram a concentração de GLP-1 em jejum e após sobrecarga de glicose e alimentação de 560 kcal. Em jejum, a concentração de GLP-1 em pacientes magros foi de 4 pmol/L enquanto em obesos foi de 2,3 pmol/L. Após a sobrecarga de glicose os níveis encontrados foram, respectivamente, 2380 pmol/L e 1310 pmol/L. Já os níveis após a refeição foram de 1800 pmol/L e 360 pmol/L, respectivamente.

Os estudos envolvendo mulheres com diabetes gestacional e mulheres saudáveis também apresentaram resultados divergentes.

Forbes *et al.* (2005) estudaram os níveis de insulina e de GLP-1 em 11 mulheres com diabetes gestacional e 11 mulheres saudáveis, em jejum e nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a ingestão 75 g de glicose, com o objetivo de observar se a diminuição da secreção de GLP-1 está relacionada à progressão do diabetes melito tipo 2 e por sua vez, com o diabetes gestacional. A resposta da concentração de GLP-1 de 0-30 minutos foi mais baixa em mulheres com diabetes gestacional e os autores concluíram que a deficiência do GLP-1 tem importância no desenvolvimento do diabetes.

No mesmo ano (2005), Meier *et al.* ao estudarem 20 mulheres com história de diabetes gestacional e 20 gestantes saudáveis encontraram resultados diferentes. Não observaram diferença na secreção de GLP-1 depois da ingestão de glicose nas mulheres com história de diabetes gestacional e sugeriram que a secreção dos hormônios incretinas é normal em mulheres com antecedente de diabetes gestacional.

Segundo Cypryck *et al.* (2007) a secreção de GLP-1 e GIP parece não desempenhar um papel importante na patogênese do diabetes gestacional. Isto porque, no estudo com 13 mulheres com diabetes gestacional e 13 saudáveis, após a sobrecarga de 75g de glicose, a concentração de GLP-1 em jejum foi mais alta em mulheres com diabetes gestacional, embora não tenha sido observada diferença significativa da resposta de GLP-1 entre os grupos, no decorrer dos tempos de 0 a 120 minutos. Além disso, foi demonstrada uma correlação positiva entre GLP-1 de jejum e concentração de insulina e resistência à insulina.

As adaptações do organismo da mulher durante a gestação poderiam influenciar na secreção dos hormônios incretinas, como por exemplo: o retardo do esvaziamento gástrico pode contribuir para a demora da chegada do alimento até as células L intestinais, diminuindo a produção de GLP-1, embora este seja controlado, também, por mecanismos neurais e endócrinos (GAUTIER; CHOUKEN; GIRARD, 2008). A insulina é um fator de regulação da secreção de GLP-1 (PLAISANCIE *et al.*, 1994) e durante a gestação ocorre hiperinsulinemia que poderia contribuir, como feedback negativo, para a diminuição da secreção do GLP-1. Neste estudo, não se observou, contudo, alteração nos níveis plasmáticos de GLP-1 no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gestação de mulheres não diabéticas.

A idade materna e o IMC são fatores importantes a respeito do diabetes gestacional. Sabe-se que a idade materna superior a 25 anos é um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes melito gestacional (ANNA *et al.*, 2008). Em relação às incretinas, em um estudo

realizado em homens idosos e jovens, foi observado que não houve efeito da idade sobre as concentrações de GLP-1 e GIP (MACLINTOSH *et al.*, 2001).

A obesidade tem associação com a resistência à insulina. O tecido adiposo central é mais fortemente ligado a essa resistência (BUSE; POLONSKY; BURANT, 2008). Velasquez-Mieyer *et al.*, (2003) observaram que a concentração de GLP-1 é maior em indivíduos de menor peso comparado aos de maior peso. Schou *et al.*, (2005) ao estudarem pacientes com baixo peso ao nascer demonstraram que resposta das células  $\beta$  à glicose e ao GLP-1 e GIP é normal, assim como a secreção desses hormônios.

Na pesquisa praticamente não houve diferença significativa dos níveis de GLP-1 entre os trimestres, embora tenha ocorrido diferença significativa entre o 3º e 2º trimestre no período pós-prandial, essa diferença foi pequena e próxima da normalidade, tendo a probabilidade de fazer parte dos 5% de erro inerente a todo teste estatístico. Portanto, ainda são necessários estudos que demonstrem o comportamento dos hormônios incretinas na gestação tanto em mulheres saudáveis quanto em diabéticas, visto que não está bem definido o papel destes hormônios durante a gestação.

## 7 CONCLUSÕES

- Na análise dos níveis séricos de GLP-1 durante a gestação foi observado um pequeno aumento da concentração de GLP-1 no último trimestre.
- Ao comparar os níveis de GLP-1 no período de jejum não houve diferença significativa entre os trimestres.
- Na comparação dos níveis de GLP-1 no período pós-prandial entre os trimestres observou-se uma diferença significativa entre o 2º e 3º trimestres, não observando diferença significativa nos demais trimestres.

## REFERÊNCIAS

Ahbén B, Holst JJ, Mari A. characterization of GLP-1 effects on  $\beta$ -cell function after meal ingestion in humans. *Diabet Car.* 2003; 26(10): 2860-4.

Almind K, Ambye L, Urhammer SA, Hansen T, Echwald SM, Holst JJ, et al. Discovery of amino acid variants in the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor: the impact on the pancreatic beta cell responses and functional expression studies in Chinese hamster fibroblast cells. *Diabetol.* 1998; 41(10): 1194-8.

Alonso IV. El GLP-1, incretina antidiabética con potencial terapéutico. *Av Diabetol.* 2001; 17(4):191-8.

Anna V, van der Ploeg HP, Cheung NW, Huxley RR, Bauman AE. Sociodemographic Correlates of the Increasing Trend in Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus in a Large Population of Women Between 1995 and 2005. *Diabet Car.* 2008; 31:2288–93.

Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AAS. Duas amostras relacionadas. In: \_\_\_\_\_. *BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas da ciências biológicas e médicas.* Belém: Sociedade Civil Mamirauá/ MTC-CNPq/ Conservation International; 2003. p. 124.

Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004; 18(4): 531-54.

Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterol.* 2007; 132(6): 2131-57.

Batista DC, Chiara VL, Gugelmin AS, Martins PD. Atividade física e gestação: saúde da gestante não atleta e crescimento fetal. *Rev. Bras. Saúde Matern Infant.* 2003; 3 (2): 151-158.



Beardsall K, Diderholm BMS, Dunger DB. Insulin and carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008; 22: 41-55.

Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância Alimentar e Nutricional: SISVAN. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

Braunstein GD. Endocrine changes in pregnancy. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology.* Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 741-754.

Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinol.* 2004; 145(6): 2653-9.

Buse JB, Polonsky KS, Burant CF. Type 2 Diabetes Mellitus. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology.* Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 1329-1389.

Carr RD, Larsen MO, Jelic K, Lindgren O, Vikman J, Holst JJ, et al. Secretion and dipeptidyl peptidase-4-mediated metabolism of incretin hormones after a mixed meal or glucose ingestion in obese compared to lean, nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(2): 872-8.

Chacra A R. Efeito Fisiológico das Incretinas. *Adv Stud Med.* 2006; 6 (7B): 613-17.

Chen TS, Yeh CH, Pu HF, Doong ML, Lu CC, Liu SR et al. Gastric inhibitory polypeptide and gastric acid secretion in pregnant rats. *Placent.* 1995; 16: 85-92.

Cypryk K, Vilsboll T, Nadel I, Smyczyn'Ska J, Holst JJ, Lewin'Ski A. Normal secretion of the incretin hormones glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 during gestational diabetes mellitus. *Ginecol Endocrinol.* 2007; 23(1): 58-62.

Cypryk K, Szymczak W, Czupryniak L, Sobczak M, Lewiński A. Gestational diabetes mellitus — an analysis of risk factors. *Pol J Endocrinol* 2008; 59 (5): 393–397.

Davidson JA, Parente EB, Gross JL. Incretin mimetics and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: innovative treatment therapies for type 2 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; 52(6): 1039-49.

Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hücking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(10): 3575-81.

Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept.* 2005; 128(2): 117-24.

Deacon CF, Holst JJ. Immunoassays for the incretin hormones GIP and GLP-1. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23: 425–432.

Ding W G, Gromada J. Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide [abstracts]. *Diabet.* 1997; 46(4): 615-21.

Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 2007; 113(3): 546-93.

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chicko W, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Nat Acad Sci.* 1987; 84: 3434-8.

Drucker DJ. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabet Car.* 2003; 26(10): 2929-40.

Egan JM, Montrose-Rafizadeh C, Wang Y, Bernier M, Roth J. Glucagon-like peptide- 1(7-36) amide (GLP- 1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: one of several potential extrapancreatic sites of GLP- 1 action. *Edocrinol.* 1994; 135(5): 2070-5.

Ehnes JA, Lee SST, Pederson RA, McIntosh CHS. A New Pathway for Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Receptor Signaling. *J Biol Chemist.* 2001; 276(26): 23667–73.

Ehnes JA, Casilla VR, Doty T, Pospisilik JA, Winter KD, Demuth HU. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes  $\beta$ -(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinol.* 2003; 144(10): 4433–45.

Elahi D, Egan JM, Shannon RP, Meneilly GS, Khatri A, Habener JF, et al. GLP-1 (9–36) amide, cleavage product of GLP-1 (7–36) amide, is a glucoregulatory peptide. *Obesit.* 2008; 16(7): 1501–9.

El-Bacha T. Insulina. In: Poian A. T. e Carvalho-Alves P. C. *Hormônios e Metabolismo. Integração e correlações Clínicas.* São Paulo: Atheneu; 2006, p. 27-55.

Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Calzi SL, Khoury N, Noushmehr H, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinol.* 2003; 144(12): 5149-58.

Fehmann HC, Jiang J, Schweinfurth J, Dorsch K, Wheeler MB, Boyd AE, et al. Ligand-specificity of the rat GLP-I receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO-) cells. *Z Gastroenterol.* 1994; 32:203–207.

Forbes S, Moonan M, Robinson S, Anyaoku V, Patterson M, Murphy K G, et al. Impaired circulating glucagon-like peptide-1 response to oral glucose in women with previous gestational diabetes. *Clin Endocrinol.* 2005; 62: 51-5.

Forti, A. C. Estratégias Terapêuticas Baseadas nas Vias do GLP-1. *Advanc Stud Med.* 2006; 6(7B): 618-26.

Gallwitz B, Wih M, Morys-Wortmann C, Fölsch UR, Schmidt WE. GLP-1/GIP chimeric peptides define the structural requirements for specific ligand-receptor interaction of GLP-1. *Regul Pept.* 1996; 63: 17-22.

Gautier JF, Choukem SP, Girard J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. *Diabet Metab.* 2008; 34(Suppl 2): S65-72.

Gespach C, Emami S, Rosselin G. Gastric inhibitory peptide (GIP), pancreatic glucagon and vasoactive intestinal peptide (VIP) are camp-inducing hormones in the human gastric cancer cell line hgt-1. Homologous desensitization of VIP receptor activity. *Biochem Biophys Res Communicat.* 1984; 120(2): 641-649.

Guan X, Karpen HE, Stephens J, Bukowski JT, Niu S, Zhang G, et al. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterol.* 2006; 130: 150-64.

Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, Jelic K, Carr RD et al. Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinol.* 2006; 147 (7): 3173-80.

Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, Meier JJ. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regul Pept.* 2007; 143: 64–68.

Han SJ, Kima HJ, Choi SE, Kang Y, Lee KW, Kima DJ. Incretin secretion and serum DPP-IV activity in Korean patients with type 2 diabetes. *Diab Res Clin Pract.* 2010; 89(3): 49-52.

Hansen AB, Gespach CP, Rosselin GE, Holst JJ. Effect of truncated glucagon-like peptide 1 on cAMP in rat gastric glands and HGT-1 human gastric cancer cells. *Federat Eur Biochem Socie.* 1998; 236: 119-122.

Heller RS, Kieffer TJ, Habener JF. Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas [abstracts]. *Diabet.* 1997; 46(5):785-91.

Hermann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion.* 1995;56:117–126.

Hojberg PV, Zander M, Vilsboll T, Knop FK, Krarup T, Volund A, et al. Near normalisation of blood glucose improves the potentiating effect of GLP-1 on glucose-induced insulin secretion in patients with type 2 diabetes. *Diabetol.* 2008; 51(4): 632-40.

Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007; 87: 1409–1439. In: Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol.* 2009; 578(1): 27-32.

Jasleen J, Ashley SW, Shimoda N, Zinner MJ, Whang EE. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. *Dig Dis Sci.* 2002; 47(5): 1135-40.

Kapustin JF. Postpartum management for gestational diabetes mellitus: Policy and practice implications. *J Ame Acad Nur Practit.* 2008; 20: 547–554.

Kemp DM, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) activation of insulin gene promoter inhibited by p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinol.* 2001; 142(3): 1179–87.

Knapper JM, Heath A, Fletcher JM, Morgan LM, Marks V. GIP and GLP-1(7-36)amide secretion in response to intraduodenal infusions of nutrients in pigs. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1995; 111(3): 445-50.

Knop FK, Vilsbøll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced Incretin effect in type 2 diabetes: Cause or consequence of the diabetic state? *Diabet.* 2007; 56: 1951–1959.

Knudson P. E. e Weinstour R. S. Carboidratos. In: Henry J. B. *Diagnósticos Clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.* Barueri-SP: Manole; 2008. p. 245-258.

Lindgren O, Mari A, Deacon CF, Carr RD, Winzell MS, Vikman J, et al. Differential islet and incretin hormone responses in morning versus afternoon after standardized meal in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(8): 2887–92.

MacIntosh CG, Horowitz M, Verhagen MAMT, Smout AJPM, Wishart J, Morris H, et al. Effect of small intestinal nutrient infusion on appetite, gastrointestinal hormone release, and gastric myoelectrical activity in young and older men. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96(4): 997-1007.

Meier JJ, Gallwitz B, Askenas M, Vollmer K, Deacon CF, Holst JJ, et al. Secretion of incretin hormones and the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in women with a history of gestational diabetes. *Diabetol*. 2005; 48: 1872–1881.

Meier JJ, Nauck MA, Pott A, Heinze K, Goetze O, Bulut K, et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterol*. 2006; 130: 44-54.

Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999; 85: 9–24.

Mckillop AM, Duffy NA, Lindsay JR, O’Harte FPM, Bell PM, Flatt PR. Decreased dipeptidil peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1(7-36)amide degradation in type 2 diabetic subjects. *Diabet Res Clin Pract*. 2008; 79: 79-85.

Montrose-Rafizadeh C, Egan JM, Roth J. Incretin Hormones regulate glucose-dependent insulin secretion in RIN 1046-38 cells: mechanisms of action. *Endocrinol*. 1994; 135(2): 589-94.

Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, et al. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008; 57(5): 1340-8.

Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 91: 301-7.

Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* 1998; 35(3): 117-29.

Orskov C. Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetol.* 1992; 35(8): 701-11.

Pala L, Ciani S, Dicembrini I, Bardini G, Cresci B, Pezzatini A, et al. Relationship between GLP-1 levels and dipeptidyl peptidase-4 activity in different glucose tolerance conditions. *Diabet Med.* 2010; 27: 691–5.

Paris MC, Fuller PJ, Carstensen B, Nagy E, Taylor RG, Sourial M, et al. Plasma GLP-2 levels and intestinal markers in the juvenile pig during intestinal adaptation: effects of different diet regimens. *Dig Dis Sci.* 2004; 49(10): 1688-95.

Plaisancie P, Bernard C, Chayvialle JA, Cuber JC. Regulation of Glucagon-Like Peptide-1-(7-36) Amide Secretion by Intestinal Neurotransmitters and Hormones in the Isolated Vascularly Perfused Rat Colon. *Endocrinol.* 1994; 135 (6): 2398-403.

Plamboeck A, Holst JJ, Carr RD, Deacon CF. Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig. *Diabetol.* 2005; 48: 1882–1890.

Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, et al. Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *J Clin Invest.* 2004; 113(4): 635-45.

Rask E, Olsson T, Söderberg S, Holst JJ, Tura A, Pacini G, et al. Insulin secretion and incretin hormones after oral glucose in non-obese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism.* 2004; 53(5): 624-31.



Reis GFF. Alterações Fisiológicas Maternas da Gravidez. *Rer Bras Anest.* 1993; 43: 3-9.

Rezende J, Montenegro CAB. Endocrinologia da gravidez. Trocas materno-ovulares. In: \_\_\_\_\_. *Obstetrícia Fundamental.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.; 2006a. p. 52-69.

Rezende J, Montenegro CAB. Modificações do organismo materno. In: \_\_\_\_\_. *Obstetrícia Fundamental.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.; 2006b. p. 74-87.

Santos MC, Cândido DF, Sala MM. Diabetes Mellitus. In: Corrêa MD, Melo VH, Aguiar RALP, Jr. Corrêa MD. *Noções práticas de obstetrícia.* Belo Horizonte: COOPMED, 2004. p. 471-487.

Schou JH, Pilgaard K, Vilsboll T, Jensen CB, Deacon CF, Holst JJ, et al. Normal secretion and action of the gut incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in Young men with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(8): 4912-19.

Soares S, Fortunato S, Moreira LA. Adaptações morfo-funcionais na mulher grávida [apostila]. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Serviço de Fisiologia; 2002.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. *Diabetes Mellitus Gestacional.* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2006.

Song DH, Getty–Kaushik L, Tseng E, Simon J, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide enhances adipocyte development and glucose uptake in part through Akt activation. *Gastroenterol.* 2007;133:1796–1805.

Thorens B. Expression cloning of the pancreatic J8 cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 8641-5.

Todd JF, Bloom RS. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabet Med.* 2007; 24(3): 223-32.

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(8): 3717-28.

Vahl TP, Tauchi M, Durler TS, Elfers EE, Fernandes TM, Bitner RD, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinol.* 2007; 148(10): 4965-73.

Velasquez-Mieyer PA, Cowan PA, Umpierrez GE, Lustig RH, Cashion AK, Burghen GA. Racial differences in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentrations and insulin dynamics during oral glucose tolerance test in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27(11): 1359-64.

VilSBoll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetol.* 2002; 45(8): 1111-9.

VilSBoll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, Juul AG, et al. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(6): 2706-13.

Vilsboll T. On the role of the incretin hormones GIP and GLP-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Dan Med Bull.* 2004; 51: 364-70.

Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabet.* 2008; 57:678–687.

Volp ACP, Rezende FAC, Alfenas RCG. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Rev Bras Nutr.* 2008; 23(2): 158-164.

Wang X, Cahill CM, Piñeyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cells transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinol.* 1999; 140(10): 4904-7.

Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetol.* 2002; 45:1263–1273.

Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26(2): 19-39.

Yamada Y, Hayami T, Nakamura K, Kaisaki PJ, Someya Y, Wang CZ, et al. Human gastric inhibitory polypeptide receptor:cloning of the gene (GIPR) and cDNA. *Genomics.* 1995; 29: 773–776.

Yip, RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sci.* 2000; 66(2): 91-103.

APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido.

## **CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO (RES. CONEP 196/96)**

### **Níveis de GLP-1 durante a gestação em mulheres não diabéticas**

Eu, ..... abaixo assinado, aceito participar, como voluntária, no estudo acima citado, desenvolvido neste ambulatório de pré-natal, sob responsabilidade da farmacêutica-bioquímica Giselle Mocellin Peruzzo (CRF: 2946). Declaro que este consentimento foi-me entregue para leitura e depois, lido e esclarecido de maneira a não restarem dúvidas sobre a minha participação na pesquisa, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- A) Fui informada que estou grávida, e que posso freqüentar este serviço de pré-natal, com direito ao atendimento médico, independente de participar do trabalho em questão.
- B) Fui informada que minha participação neste estudo é inteiramente voluntária.
- C) Fui informada que o diabetes melito é uma doença que complica três a cinco por cento das gestações, podendo acarretar riscos à minha saúde e à saúde de meu filho.
- D) Fui informada que existem algumas formas de se pesquisar esta doença durante a gravidez. Uma delas é a dosagem da glicemia de jejum associada à presença de fatores de risco para o diabetes. A outra forma é a dosagem da glicemia plasmática uma, duas e três horas após a ingestão de 100 gramas de açúcar (TTG 100g).
- E) Fui informada que, nesta gravidez, estes exames serão realizados em duas oportunidades - antes de 20 semanas de gravidez e entre a 24<sup>a</sup> e a 28<sup>a</sup> semanas da gestação.
- F) Fui informada que, para realização do TTG 100g, precisarei comparecer no dia agendado, para coleta de sangue para a glicose em jejum. Em seguida, deverei ingerir 100g de açúcar diluído em água com limão e, então, serão realizadas mais três coletas de sangue para dosagens da glicose, uma, duas e três horas após a ingestão do açúcar.
- G) Fui informada que deverei permanecer no laboratório por três horas, em repouso e em jejum, sem poder beber ou ingerir qualquer alimento ou fumar.
- H) Fui informada que os hormônios GIP e GLP-1 são substâncias que atuam na secreção de insulina e que estão diminuídos no diabetes melito tipo 2.

- I) Fui informada que esses hormônios ainda não foram estudados em gestantes saudáveis e que a pesquisa pode contribuir para um melhor conhecimento sobre a fisiologia do diabetes na gravidez.
- J) Fui informada que para a realização das dosagens de GLP-1 precisarei comparecer, nos dias agendados, no laboratório da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e em jejum, para a coleta de sangue. Estes dias corresponderão a um a cada trimestre da gestação.
- K) Fui informada que após a coleta do sangue em jejum, receberei um lanche e que após meia hora será coletada nova amostra de sangue. Estas coletas corresponderão uma a cada trimestre da gestação, nos mesmos dias da coleta em jejum.
- L) Fui informada que não terei ônus financeiro com a realização destes exames.
- M) Fui informada que a minha participação neste estudo não será paga e que os resultados obtidos serão utilizados apenas cientificamente, para ajudar outras pacientes, no futuro.
- N) Fui informada que posso desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo aos cuidados médicos que vou receber.
- O) Fui informada que tenho garantia de receber resposta a qualquer pergunta, dúvida ou esclarecimento que julgue necessário acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa. Assim poderei entrar em contato pelos telefones (67) 3345-3173 – farmacêutica-bioquímica Giselle – ou (67) 33457187 – Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos.
- P) Por meio da minha participação neste estudo obterei benefício pessoal de ser informada e esclarecida sobre diabetes melito e que esta pesquisa poderá contribuir para o diagnóstico precoce desta doença, assim como novos métodos de prevenção e tratamento.

Desta forma, uma vez lidos e entendidos tais esclarecimentos, dato e assino este Consentimento Livre e Informado em duas vias, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, ficando uma em minha posse.

Campo Grande, MS, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008

---

Participante (maior de idade), pais ou responsável (se a gestante for menor de idade).

---

Pesquisadora

## APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa.

**FORMULÁRIO DE PESQUISA**

1. NÚMERO PACIENTE: \_\_\_\_\_
2. Data de Nascimento: \_\_\_\_\_
3. Idade Gestacional: \_\_\_\_\_
4. Profissão: \_\_\_\_\_
5. Naturalidade: \_\_\_\_\_
6. Escolaridade: \_\_\_\_\_
7. Renda mensal: \_\_\_\_\_
8. Primeira Gestação ( ) não ( )sim
  - Aborto ( ) não ( )sim
  - Morete fetal ( ) não ( )sim
  - Feto  $\geq$  4Kg ( ) não ( )sim
9. Gestação Atual:
  - pré-eclâmpsia ( ) não ( )sim

	<b>1º trimestre</b>	<b>2º trimestre</b>	<b>3º trimestre</b>
<b>PA</b>			
<b>Peso</b>			

10. OBS.: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

11. Dados Laboratoriais:

TTOG: \_\_\_\_\_

	1º trimestre		2º trimestre		3º trimestre	
	jejum	pós-prandial	jejum	pós-prandial	jejum	pós-prandial
<b>GLP-1</b>						



## APÊNDICE D – Tabelas das combinações do lanche.

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Pêssego Mais	1un.	26	0	0	105
Bisnaguinha Saborzito	2 1/2un.	29	3,2	1,4	148
Queijo Minas Frescal Flori	34g	2,26	10,2	11,33	147,33
		57,26	13,4	12,73	400,33

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Maracujá Kapo	1un	23	0	0	93
Bisnaguito Pulman	2 1/2un	29	3,2	2,2	148
Queijo Minas Frescal Trem Minas	60g	4	14	10	160
		56	17,2	12,2	401

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Maracujá Kapo	1un.	23	0	0	93
Bisnaguinha Saborzito	2 1/2un	29	3,2	1,4	148
Queijo Minas Frescal Trem Minas	60g	4	14	10	160
		56	17,2	11,4	401

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Laranja Kapo	1un.	22	0	0	87
Bisnaguito Pulman	2 1/2un.	29	3,2	2,2	148
Queijo Minas Frescal Trem Minas	62g	4,13	14,46	10,33	165,33
		55,13	17,66	12,53	400,33

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Laranja Kapo	1un.	22	0	0	87
Bisnaguito Saborzito	2 1/2un.	29	3,2	1,4	148
Queijo Minas Frescal Trem Minas	62g	4,13	14,46	10,33	165,33
		55,13	17,66	11,73	400,33

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Abacaxi Kapo	1un.	22	0	0	88
Bisnaguito Pulman	2 1/2un.	29	3,2	2,2	148
Queijo Minas Frescal Trem Minas	62g	4,13	14,46	10,33	165,33
		55,13	17,66	12,53	401,33

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Abacaxi Kapo	1un.	22	0	0	88
Bisnaguito Saborzito	2 1/2un.	29	3,2	1,4	148
Queijo Minas Frescal Trem Minas	62g	4,13	14,46	10,33	165,33
		55,13	17,66	11,73	401,33

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Uva Mais	1un.	29	0	0	116
Bisnaguinha tradicional Salma	2 1/2un.	25,25	2,75	1,5	125
Queijo Minas Frescal Trem Minas	60g	4	14	10	160
		58,25	16,75	11,5	401

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Maracujá Kapo	1un	23	0	0	93
Bisnaguito Pulman	2 1/2un	29	3,2	2,2	148
Queijo Minas Flori	37g	2,46	11,1	12,33	160,33
		54,46	14,3	14,53	401,33

Produto	Quantidade	Carboidratos	Proteínas	Gorduras Totais	VCT
Suco Uva Mais	1un.	29	0	0	116
Bisnaguinha tradicional Salma	2 1/2un.	25,25	2,75	1,5	125
Queijo Minas Frescal Flori	37g	2,46	11,1	12,33	160,33
		56,71	13,85	13,83	401,33

## ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética.



**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**



*Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1133 da Pesquisadora Giselle Mocellin Peruzzo intitulado “Níveis de GLP 1 e GIP durante a gestação em mulheres não diabéticas”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 29 de maio de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*


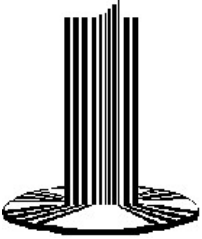
*Prof. ~~Odair Pimentel Martins~~*

*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 4 de junho de 2008.*

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cen/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187

## ANEXO B - Declaração de Uso de Material Biológico e Dados Coletados.

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL</p> <p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS/CEP</p>	
---	---	---

**DECLARAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS COLETADOS**

Declaramos, para os devidos fins, que o material biológico (sangue), os dados e as informações coletadas serão usados exclusivamente para os fins previstos no protocolo intitulado: “**Níveis de GLP-1 e GIP durante a gestação em mulheres não diabéticas**”. Todo o material biológico será desprezado, conforme os procedimentos do laboratório, logo após o resultado de todas as análises.

Campo Grande, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

---

Investigador Principal

ANEXO C – Resolução do Conselho Diretivo do Núcleo do Hospital Universitário da  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação


Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 06 DE 17 DE FEVEREIRO DE 2009.

**O Presidente do Conselho Diretivo do Núcleo de Hospital Universitário da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, no uso de suas atribuições legais, em reunião ordinária realizada no dia 17 de fevereiro de 2009, resolve:

Aprovar o Projeto de Pesquisa intitulado: Níveis de GLP1 e GIP durante a gestação em mulheres não diabéticas, sob a Coordenação de Gisele Mocellin Peruzzo e Orientação do Prof. Wilson Ayash.

  
Gualberto Nogueira de Leles

## ANEXO D – Tabela do IMC segundo a idade gestacional do Ministério da Saúde.

**Classificação do estado nutricional da gestante segundo Índice de Massa Corporal - IMC por semana gestacional:**

Semana gestacional	Baixo peso (BP) IMC ≤	Adequado (A) IMC entre		Sobrepeso (S) IMC entre		Obesidade (O) IMC ≥
6	19,9	20,0	24,9	25,0	30,0	30,1
7	20,0	20,1	25,0	25,1	30,1	30,2
8	20,1	20,2	25,0	25,1	30,1	30,2
9	20,2	20,3	25,1	25,2	30,2	30,3
10	20,2	20,3	25,2	25,3	30,2	30,3
11	20,3	20,4	25,3	25,4	30,3	30,4
12	20,4	20,5	25,4	25,5	30,3	30,4
13	20,6	20,7	25,6	25,7	30,4	30,5
14	20,7	20,8	25,7	25,8	30,5	30,6
15	20,8	20,9	25,8	25,9	30,6	30,7
16	21,0	21,1	25,9	26,0	30,7	30,8
17	21,1	21,2	26,0	26,1	30,8	30,9
18	21,2	21,3	26,1	26,2	30,9	31,0
19	21,4	21,5	26,2	26,3	30,9	31,0
20	21,5	21,6	26,3	26,4	31,0	31,1
21	21,7	21,8	26,4	26,5	31,1	31,2
22	21,8	21,9	26,6	26,7	31,2	31,3
23	22,0	22,1	26,8	26,9	31,3	31,4
24	22,2	22,3	26,9	27,0	31,5	31,6
25	22,4	22,5	27,0	27,1	31,6	31,7
26	22,6	22,7	27,2	27,3	31,7	31,8
27	22,7	22,8	27,3	27,4	31,8	31,9
28	22,9	23,0	27,5	27,6	31,9	32,0
29	23,1	23,2	27,6	27,7	32,0	32,1
30	23,3	23,4	27,8	27,9	32,1	32,2
31	23,4	23,5	27,9	28,0	32,2	32,3
32	23,6	23,7	28,0	28,1	32,3	32,4
33	23,8	23,9	28,1	28,2	32,4	32,5
34	23,9	24,0	28,3	28,4	32,5	32,6
35	24,1	24,2	28,4	28,5	32,6	32,7
36	24,2	24,3	28,5	28,6	32,7	32,8
37	24,3	24,5	28,7	28,8	32,8	32,9
38	24,5	24,6	28,8	28,9	32,9	33,0
39	24,7	24,8	28,9	29,0	33,0	33,1
40	24,9	25,0	29,1	29,2	33,1	33,2
41	25,0	25,1	29,2	29,3	33,2	33,3
42	25,0	25,1	29,2	29,3	33,2	33,3