

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**PERDA DA RESPOSTA SECRETÓRIA INTESTINAL DE PYY À SOBRECARGA
ORAL DE GORDURA SATURADA APÓS INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À
INSULINA POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM RATOS WISTAR.**

LUCIANA DA CONCEIÇÃO ANTUNES

Orientador: Prof. Dr. MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção do
título de Doutor

Porto Alegre, dezembro de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

da Conceição Antunes, Luciana
PERDA DA RESPOSTA SECRETÓRIA INTESTINAL DE PYY À
SOBRECARGA ORAL DE GORDURA SATURADA APÓS INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA À INSULINA POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM
RATOS WISTAR / Luciana da Conceição Antunes. -- 2014.
138 f.

Orientador: Marcello Casaccia Bertoluci.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. resistência insulínica. 2. PYY. 3. ácidos
graxos saturados. 4. ácidos graxos monoinsaturados.
I. Casaccia Bertoluci, Marcello, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Deciomar e Jane Antunes
Ao meu marido Tiago Cardinal

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina - FAMED/UFRGS por ter me proporcionado uma formação acadêmica de excelência. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de doutorado neste período. Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa-FIPE do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA pelo financiamento do projeto desenvolvido. À Pró-Reitoria de Pesquisa - PROPESQ pelo auxílio financeiro para apresentar uma parte dos dados no XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pela confiança depositada ao decidir orientar-me; pelo incentivo, apoio, dedicação e pelo aprendizado proporcionado nesta trajetória.

Aos meus pais, Deciomar e Jane Antunes, por fomentar a minha natureza questionadora e por ensinar-me o quão valiosa é a busca pelo conhecimento, características essenciais para gerar ciência.

Ao meu marido, companheiro e melhor amigo, Tiago Cardinal, pelo seu amor, valorização e investimento incondicionais, tanto em mim quanto em minha vida acadêmica-profissional, deixo-lhe o meu sincero obrigada.

Aos amigos e confidentes cujo apoio foi essencial nesta trajetória: Leticia Ramalho, Manoela Neves da Jornada Pinto, Rodrigo Grassi de Oliveira e Carla Herve Moram Bicca deixo-vos o meu sincero reconhecimento pela importante participação na minha vida e por terem tornado esta etapa mais suave.

A todos os profissionais e estudantes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os quais, direta ou indiretamente, auxiliaram-me, em especial, à bolsista Jessica Lorenzi Elkfury, pelo auxílio e pela intensa dedicação a essa pesquisa. Ao Dr. Enrico que cortesmente cedeu-nos o Laboratório Nobel para as análises dos peptídeos, bem como ao Prof. Dr. Rafael Noal Moresco, à Profa. Dra. Ivana Beatrice Manica e seus doutorandos, Etiane Tatsch, Guilherme Bocchi, Thais Algarve pela parceria nos experimentos de estresse oxidativo e ensaio cometa.

“O que dá o verdadeiro sentido ao encontro é a busca e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto.”

José Saramago

(1922-2010)

RESUMO

Introdução: O PYY é um peptídeo regulador da saciedade produzido pelas células intestinais em resposta à chegada intraluminal de nutrientes. **Objetivos:** O presente estudo objetivou avaliar o efeito de sobrecargas agudas de gorduras saturadas (SAT) e monoinsaturadas (MUFA) na secreção aguda de PYY em ratos Wistar normais e após insulinoresistência induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Em experimento controlado, ratos Wistar foram submetidos a uma dieta altamente gordurosa (HFD) (55% de gordura) por 19 semanas (n=15) ou à dieta normal (GC) pelo mesmo tempo (ração *ad libitum*) (n=15). Ao final de 14 semanas foi realizado um experimento cross-over onde foi avaliada a resposta secretória de PYY sérico nos tempos basal e 60 minutos após sobrecarga oral lipídica isovolumétrica, por meio de gavagem, ajustadas para o peso, administrada de forma aleatória, em dias diferentes, constituídas por ácidos graxos saturados (SAT-banha de porco) ou monoinsaturados (MUFA-óleo de oliva) ou água (CONT). Diferenças entre médias e grupos foram avaliadas por meio de ANOVA de medidas repetidas e associação por regressão linear simples. **Resultados:** Em relação ao PYY, no grupo com dieta normal, ambas sobrecargas MUFA e SAT elevaram a resposta secretória de PYY significativamente em relação aos seus respectivos basais: MUFA-Basal 2,18 (\pm 0,24) vs. MUFA-60min 2,30 (\pm 0,26) pg/ml e SAT-basal 2,21 (\pm 0,25) pg/ml vs. SAT-60min 2,29 (\pm 0,22) pg/ml ANOVA múltiplas entradas $p= 0,019$ intragrupos; entretanto, sem diferença entre grupos MUFA e SAT (ANOVA múltiplas entradas entre-grupos $p= 0,314$). No grupo HFD por outro lado, a sobrecarga SAT reduziu o PYY: SAT-basal 2,16 (\pm 0,21) pg/ml vs. SAT-60min 2,11 (\pm 0,30) pg/ml ($p= 0,01$, intragrupos) enquanto a sobrecarga MUFA manteve o mesmo aumento MUFA-basal 2,15pg/ml vs. MUFA-60min 2,22 (\pm 0,22) pg/ml. $p=0,019$ (intragrupos). A administração de água (CONT) também reduziu o PYY em relação ao basal, tanto com na dieta normal ($p= 0,0091$) como na dieta (HFD) ($p= 0,0091$), mas sem diferença entre os grupos ($p= 0,7433$). **Conclusão:** Em ratos Wistar, as sobrecargas lipídicas, tanto de MUFA como de gordura saturadas, aumentam agudamente a secreção de PYY. Entretanto, em ratos Wistar tornados insulinoresistentes através de uma dieta altamente rica em gordura saturada, a mesma sobrecarga de gordura saturada perde a capacidade de estimular os níveis de PYY, enquanto à resposta ao MUFA segue preservada. Esta resposta paradoxal a gorduras saturadas poderia

representar um dano celular causado pela insulinoresistência ao tecido intestinal interferindo no aparato secretor de PYY em resposta a este nutriente. Estudos no tecido intestinal precisam ser realizados para identificar possíveis fatores envolvidos e suas implicações no controle da saciedade pelo PYY em indivíduos insulinoresistentes.

Palavras-chave: PYY; Gordura saturada; Gordura Monoinsaturada, Resistência Insulínica

ABSTRACT

Background: PYY is a gut peptide released by L-cells from the intestine after a meal. **Objective:** The present study aimed to evaluate the effect of acute overloads of saturated fatty acids (SAT) and monounsaturated fatty acids (MUFA) on PYY release in normal and diet induced insulin resistant wistar rats. **Methods:** a nineteen weeks experiment was conducted with 30 wistar rats that were allocated into two groups: high fat diet (HFD group) (n=15) with diet composition of 55% of lard and 45% standard chow and control group (CG) (n=15). Both groups received water and food *ad libitum*. Later a cross-over experiment was conducted to evaluate PYY secretory response 60 minutes after two different lipid overloads (SAT-lard; MUFA-olive oil) and water (CONT), adjusted by weight, all isovolumetric and lipids were isocaloric, randomly administered in different days. Mean differences were analyzed by repeated measures ANOVA and association by simple linear regression. **Results:** Both MUFA and SAT overloads significantly increased PYY release in the CG in comparison with baselines: MUFA-Baseline $2,18 \pm 0,24$ vs. MUFA-60min $2,30 \pm 0,26$ pg/ml and SAT-baseline $2,21 \pm 0,25$ pg/ml vs. SAT-60min $2,29 \pm 0,22$ pg/ml ANOVA multiple entry $p=0,019$ intra-group, however without difference between MUFA and SAT (ANOVA multiple entry inter-group $p=0,314$). In the other hand, HFD SAT overload significantly decreased PYY release: SAT-baseline $2,16 \pm 0,21$ pg/ml vs. SAT-60min $2,11 \pm 0,30$ pg/ml ($p=0,01$, intra-group) while MUFA overload was able to keep the increase on PYY release MUFA-baseline $2,15$ pg/ml vs. MUFA-60min $2,22 \pm 0,22$ pg/ml. $p=0,019$ (intra-group). Water overload (CONT) also reduced PYY release in comparison with baseline in both CG ($p=0,0091$) and HFD ($p=0,0091$), without difference between them ($p=0,7433$). **Conclusion:** MUFA and SAT overloads increase PYY release after 60 minutes in normal wistar rats. However, when became high fat diet induced insulin resistant the SAT overload loses the capacity to stimulate PYY release, while MUFA response keeps preserved. This paradoxal finding to saturated fatty acids could indicate a cellular damage caused by insulin resistance in the intestinal tissue which compromises PYY secretory apparatus in response to this nutrient. Studies in the intestinal tissue must be conducted in order to identify possible factors involved and its implications in satiety signals PYY mediated in insulin resistance individuals.

Keywords: PYY, saturated fatty acid; monounsaturated fatty acid, insulin resistance

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da composição da dieta e ração padrão.....	122
--	-----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estratégias de busca na literatura.....	16
Figura 2. Principais regiões hipotalâmicas envolvidas no controle da fome e saciedade.....	18
Figura 3. <i>Cross-Talk</i> intestino-hipotálamo no controle da fome e saciedade.....	20
Figura 4. Estrutura da família Y.....	21
Figura 5. Célula-L intestinal.....	25
Figura 6. Receptores da célula-L envolvidos na secreção de peptídeos incretínicos.....	29
Figura 7. Mecanismos de sinalização da insulina.....	33
Figura 8. Fisiopatologia da resistência à insulina.....	35
Figura 9. Mapa Conceitual.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido araquidônico	IP3: 1,4,5 trifosfato de inositol
AgRP: proteína relacionada à Agouti	IRS-1: substrato receptor de insulina 1
Akt: proteína quinase B	IRS-2: substrato receptor de insulina 2
ALA: ácido alfa linolênico	JNK: c-Jun amino- terminal kinase
alfa-MSH: hormônio alfa-melanócito	LA: ácido linoleico
AMPc: 3'-5' adenosina monofosfato cíclico	LCFA: long chain fatty acids
ARC: núcleo arqueado	LPS: lipopolissacarídeo
ATF6: activating transcription factor 6	MAPK: mitogen activated protein kinase
CART: fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente	NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
CCK: colicistoquinina	nPKC: protein kinase C
COX-2: ciclo-oxigenase-2	NPY: neuropeptídeo Y
DM2: diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	NTS: núcleo do trato solitário
DHA: ácido docosahexaenóico	OEA: oleiletanolamida
DAG: 1,2 diacilglicerol	OMS: Organização Mundial de Saúde
eIF2α: eukaryotic translation initiation factor 2, alpha subunit	PI3-q: fosfatidilinositol 3-quinase
EPA: ácido eicosapentaenóico	PIP2: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
ERAD: ER-associated degradation	PKC proteína cinase C
G _{αi} : subunidade alfa da proteína de ligação G _i	POMC: pró-opiomelanocorticotropina
G _{αq} : proteína G _q	PP: polipeptídeo polipancreático
GLP-1: glucagon like peptide-1	PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados
GLUT4: transportadores de glicose	PVN: núcleo paraventricular
GPRs: G-protein coupled receptors	PYY: peptídeo YY
HFD: dieta hiperlipídica	RE: retículo endoplasmático
IKK: I B kinase	RI: resistência à insulina
IL-1: interleucina-1	SCFA: short chain fatty acids
IL-6: interleucina-6	SNC: sistema nervoso central
IMC: índice de massa corporal	TGs: triglicerídeos
iNOS: óxido nítrico-sintase induzida	TGI: trato gastrointestinal
	TLR: toll like receptor
	TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa
	UPR: unfolded protein response

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 ESTRATÉGIAS DE BUSCA DA INFORMAÇÃO	16
2.2 O CONTROLE DA FOME E DA SACIEDADE	17
<i>Mecanismos centrais de controle de fome e saciedade</i>	17
<i>Mecanismos periféricos potencialmente envolvidos no controle da fome e saciedade (Cross-Talk intestino-hipotálamo)</i>	19
2.3 PEPTÍDEOS GASTROINTESTINAIS	20
<i>Aspectos específicos do PYY</i>	21
<i>Descrição molecular</i>	21
<i>Ações do PYY</i>	22
<i>Secreção de PYY</i>	24
<i>A célula-L intestinal</i>	24
<i>Receptores para ácidos graxos livres de cadeia curta</i>	26
<i>Receptores para ácidos graxos livres de cadeia média e longa</i>	27
<i>Metabolização do PYY</i>	29
2.4 DIETA HIPERLIPÍDICA, INFLAMAÇÃO INTESTINAL E RESISTÊNCIA À INSULINA: POTENCIAL IMPACTO NA FISIOLOGIA DO PYY	30
<i>Resistência à Insulina</i>	30
<i>Sinalização normal do receptor da insulina</i>	31
<i>Mecanismos de resistência à insulina</i>	33
<i>Dieta hiperlipídica e os modelos experimentais de resistência à Insulina</i>	35
<i>Teorias unificadoras sobre resistência à insulina</i>	36
<i>Estresse de retículo endoplasmático</i>	36
<i>A via inflamatória</i>	37
<i>O papel da microbiota intestinal</i>	37
<i>Associação entre redução da saciedade e a hipótese de resistência à insulina hipotalâmica</i>	38
<i>Relações entre inflamação intestinal e resistência à insulina</i>	39
<i>Modificações da fisiologia do PYY com dieta hiperlipídica</i>	40
2.5 CONCLUSÃO	42

2.6 MAPA CONCEITUAL.....	43
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	44
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	44
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
5. ARTIGOS	60
5.1 LOST OF PYY INTESTINAL RESPONSE AFTER AN ACUTE SATURATED FATTY ACIDS OVERLOAD IN HIGH-FAT DIET-INDUCED INSULIN RESISTANT WISTAR RATS.....	60
5.2 VALIDATION OF HOMA-IR IN A MODEL OF HIGH-FAT DIET-INDUCED HEPATIC INSULIN RESISTANCE IN WISTAR RATS	84
5.3 FASTING GHRELIN BUT NOT PYY ₍₃₋₃₆₎ IS ASSOCIATED WITH INSULIN-RESISTANCE INDEPENDENTLY OF BODY WEIGHT IN WISTAR RATS (SUBMETIDO NA ARQUIVOS BRASILEIROS DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA)	96
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
7. APÊNDICES.....	114
8. ANEXOS	117
8.1PRÊMIO SBD	117
8.2 ACUTE EFFECT OF MONOUNSATURATED AND SATURATED FATTY ACID OVERLOAD IN SERUM GLP-1, PYY AND INSULIN SECRETION IN WISTAR RATS.	118

1. INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), desde 1980 a prevalência mundial da obesidade, praticamente, duplicou. Dados de 2008, mostram que 1,4 bilhões de indivíduos, com idade maior ou igual a 20 anos, apresentam sobrepeso. Deste contingente, mais de 200 milhões de homens e, cerca de 300 milhões de mulheres, (a totalizar 10% da população mundial) são obesos. O sobrepeso e a obesidade constituem a quinta causa de morte mundial. As estimativas mostram que, ao menos, 2,8 milhões de adultos morrem anualmente em decorrência da obesidade. Além disso, o impacto da obesidade no custo das principais doenças para as quais constitui fator de risco atinge 44% no diabetes, 23% nas doenças cardiovasculares isquêmicas e entre 7 a 41% em certos tipos de câncer.

A resistência à insulina (RI), definida como um estado de menor resposta metabólica à insulina circulante, está frequentemente associada à obesidade e comumente, além de dieta hipercalórica, associa-se também ao envelhecimento, ao sedentarismo e a complicações vasculares. Devido à forte associação entre obesidade e resistência insulínica, faz-se necessário explorar mecanismos de respostas metabólicas frente a fisiopatologia da resistência à insulina. Pouco se conhece sobre a influência da resistência à insulina nos mecanismos de controle da fome e saciedade.

O trato gastrointestinal é capaz de secretar uma série de hormônios que desempenham papel relevante no metabolismo e no controle da saciedade. Nos últimos anos, crescente interesse no conhecimento do efeito de peptídeos intestinais envolvidos no controle do comportamento alimentar e balanço energético tem emergido. Os peptídeos PYY e GLP-1 são peptídeos secretados pelas células enteroendócrinas sob o estímulo de nutrientes da dieta com efeito importante sobre a saciedade, os quais tem sido alvo de pesquisas que procuram embasar a teoria do *cross-talk* entre o intestino e os núcleos da fome e saciedade no hipotálamo. Ainda restam, entretanto, muitas lacunas acerca do comportamento hormonal destes peptídeos relacionados à ingestão alimentar no balanço energético, em situações patológicas e adaptativas como a resistência à insulina.

Devido às associações entre distúrbios da saciedade, obesidade e resistência à insulina, faz-se necessário conhecer melhor o comportamento destes peptídeos

gastrointestinais na situação de resistência à insulina. Recentes estudos começam a sugerir uma nova teoria, onde ácidos graxos da dieta, atuando como ligantes dos receptores TLR4/ NFκB no intestino, são capazes de promover um processo inflamatório intestinal subclínico, o qual, teoricamente, poderia levar à resistência à insulina sistêmica mediada por citocinas inflamatórias. Esta teoria foi reforçada recentemente pela observação em camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta rica em gordura durante 9 dias, os quais apresentaram ativação do receptor TLR4 associado a um processo inflamatório intestinal caracterizado pela presença de macrófagos. Se esta inflamação é capaz de produzir resistência à insulina em outros tecidos ainda é matéria de debate.

Muito menos estudado ainda é o efeito crônico de uma dieta altamente gordurosa na capacidade das células intestinais em secretar PYY . Supondo a presença de inflamação subclínica intestinal induzida por ácidos graxos da dieta, formulamos a teoria de que esta inflamação poderia comprometer a capacidade destas células em secretar PYY mediante estímulo, uma vez que as vias pós-receptor para ácidos graxos podem estar alteradas pelo processo inflamatório intestinal. Se esta hipótese for verdadeira, esperamos observar uma atenuação do pico de PYY após uma sobrecarga de lipídios, o qual é observado em ratos wistar em situação normal. Isto poderia ter repercussões importantes se considerarmos que o PYY é um importante indutor de saciedade. Desta forma, teoricamente, a deficiência de PYY poderia então contribuir para uma menor saciedade favorecendo ganho de peso e a obesidade.

O presente trabalho busca, desta forma, avançar um pouco mais no entendimento da secreção intestinal de PYY em uma situação experimental em um modelo induzido de resistência à insulina. Em um primeiro momento avaliamos a resposta secretória de PYY e GLP-1 a uma sobrecarga aguda de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Posteriormente desenvolvemos e validamos um modelo experimental de resistência à insulina induzido por dieta hiperlipídica em ratos Wistar em 19 semanas. Neste modelo, realizamos um segundo experimento agudo, onde avaliamos novamente a resposta do PYY à sobrecarga de ácidos graxos. Além disso, procuramos determinar o grau de estresse oxidativo no intestino, fígado e músculo além de realizamos avaliação histológica do intestino com estudo da imunohistoquímica para TNF-alfa para avaliar a presença de

inflamação intestinal induzida pela dieta gordurosa e suas relações com as alterações secretórias do PYY em resposta à sobrecarga oral de gordura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias de busca da informação

Nesta revisão da literatura, abordamos a relação entre mecanismos de saciedade, peptídeos intestinais e resistência à insulina. As bases de dados *MEDLINE* (site *Pubmed*) (1960-2013) e Embase foram consultadas. Com a finalidade de localizar outras referências não contempladas na busca, as citações dos artigos localizados também foram revisadas e incluídas quando pertinentes. Os idiomas adotados foram o inglês; o português e o italiano. Um total de 199 artigos foram selecionados por conter as especificações traçadas pelos descritores. Os passos adotados para a obtenção da informação encontram-se presentes na figura1.

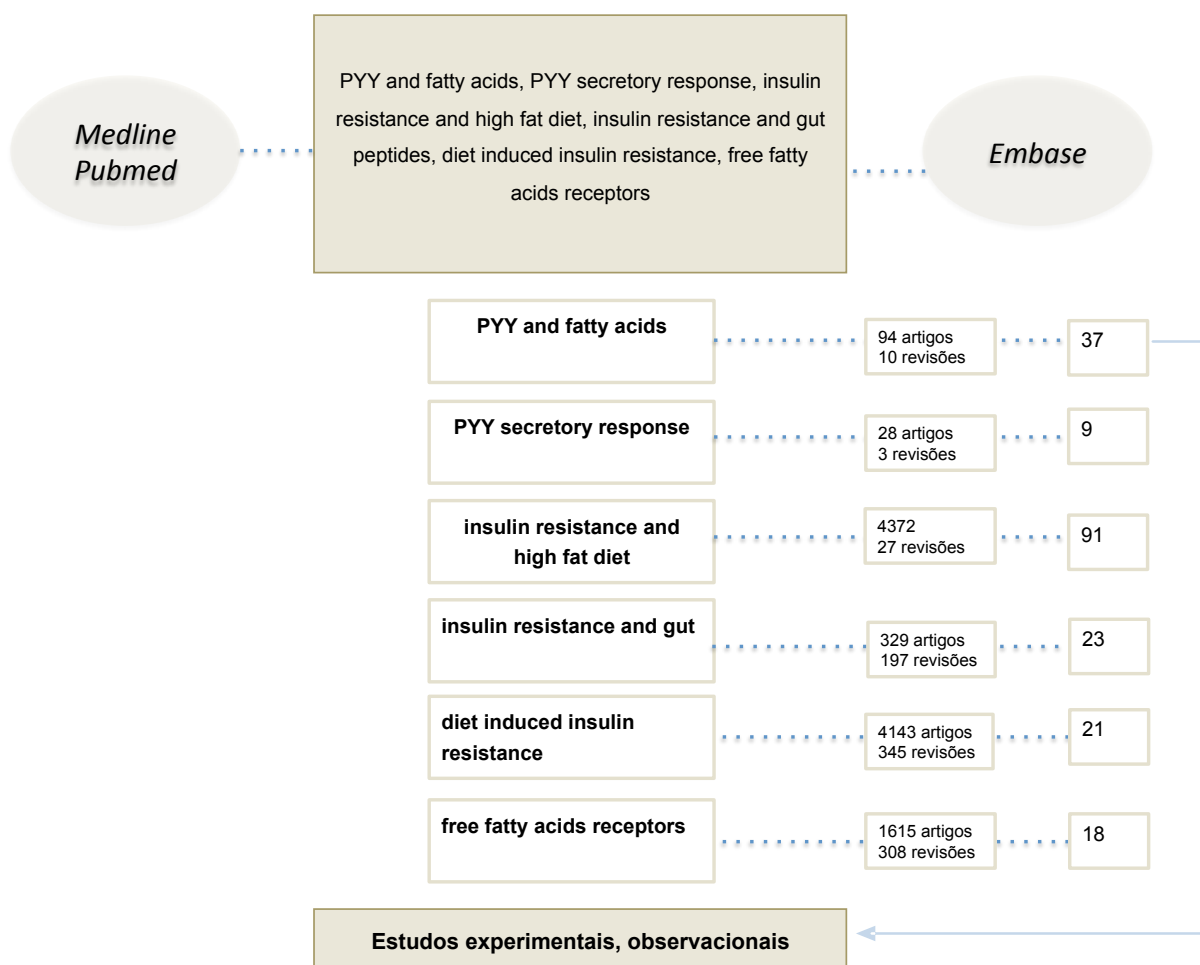


Figura1. Estratégia de busca na literatura sobre as bases que fundamentam esta tese.

2.2 O controle da fome e da saciedade

A fome pode ser definida como um ímpeto pela busca e consumo de comida, desencadeado por sinais neuroquímicos, humorais, psicológicos e ambientais (1). Ao passo que a saciedade refere-se a um processo iniciado ao longo da ingestão de alimentos o qual culmina no estímulo inibitório do ato de alimentar-se. O controle do apetite é regulado ao longo de três distintas fases: na fase pré-prandial ou cefálica (antes); na fase prandial (durante) e na fase pós-prandial (após) de uma refeição. Assim, a ingestão é regulada por mecanismos de auto-regulação positivos e negativos os quais determinarão o início, a manutenção e o final da refeição (2).

O eixo intestino-encéfalo consiste em uma complexa cascata bidirecional de sinalizações entre o trato gastrointestinal (TGI) e o cérebro. Além da regulação autonômica da digestão pelos sistema nervoso central (simpático e parassimpático), fatores neuroendócrinos (derivados da medula adrenal e córtex) e entéricos medeiam tal conexão tanto em estados fisiológicos quanto fisiopatológicos (3).

Tradicionalmente o eixo intestino-encéfalo dispõe de três vias de informação entre si: mensagens neurais (via resposta vagal e neurônios aferentes); mensagens imunes (produzidas por citocinas) e mensagens humorais (através de peptídeos enteroendócrinos). Cada um desses sistemas é amplamente distribuído ao longo do TGI, razão pela qual foi designado como o maior órgão neurológico (4), imune (5) e endócrino (6, 7).

Mecanismos centrais de controle de fome e saciedade

A regulação da homeostase energética é majoritariamente regida pelo hipotálamo e tronco cerebral. Nessas estruturas, chegam sinalizações acerca do estado nutricional, oriundas de áreas periféricas (6), as quais visam regular o gasto energético e o apetite (8).

O núcleo arqueado (ARC), uma agregação de neurônios na porção mediobasal do hipotálamo, é o principal responsável na regulação da ingestão alimentar e homeostase energética. Nele, encontram-se duas distintas populações de neurônios cujos efeitos na ingesta são antagônicos (9): neurônios orexígenos, os quais expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à Agouti (AgRP), localizados na porção medial (10-12), enquanto que na porção lateral do ARC encontram-se aqueles anorexígenos, os quais expressam o hormônio alfa-

melanócito estimulador (alfa-MSH) (clivado a partir da pró-opiomelanocorticotropina (POMC)) e o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART) (13). Uma vez que o ARC encontra-se adjacente à eminência média, um órgão circumventricular, o qual contém capilares fenestrados, os hormônios circulantes podem atravessá-la e influenciar diretamente a atividade dos neurônios do ARC (14) (Figura 2). Os peptídeos gastrintestinais, secretados após uma refeição, sinalizam a disponibilidade de nutrientes a curto prazo para o ARC. Além disso, outros hormônios, como a insulina e a leptina, viabilizam informações acerca das reservas energéticas a longo prazo (2, 15).

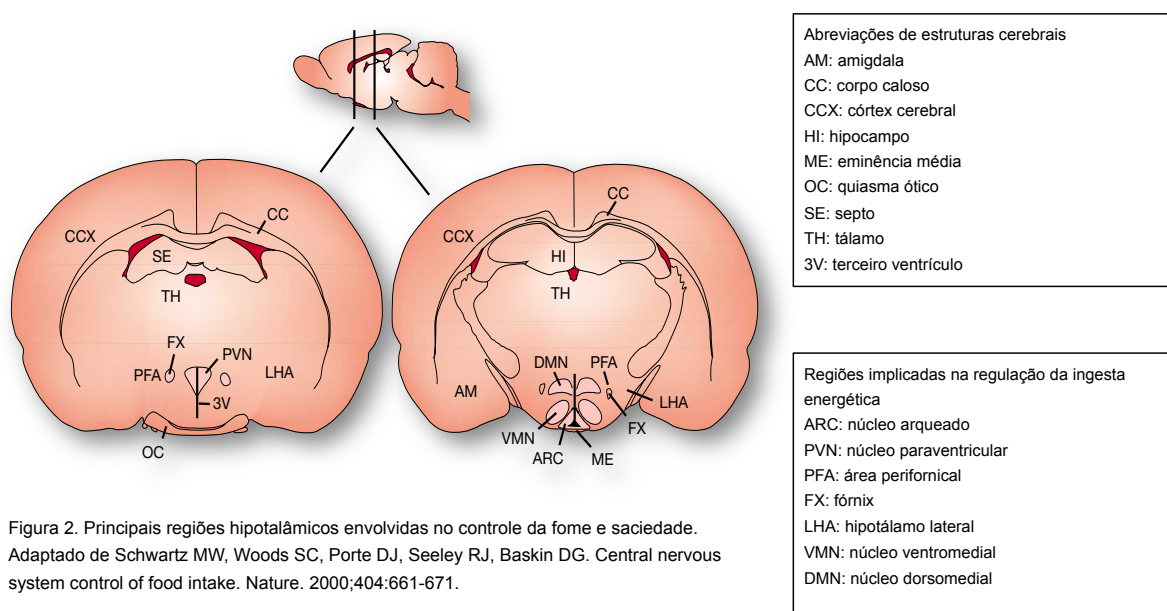


Figura 2. Principais regiões hipotálamicas envolvidas no controle da fome e saciedade. Adaptado de Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661-671.

As aferências vagais, ativadas por mecano e quimiorreceptores, chegam ao núcleo do trato solitário (NTS) no tronco cerebral, cujas projeções neuronais, por sua vez, comunicam-se com o hipotálamo (16). Peptídeos entéricos, como o PYY, podem influenciar o NTS através da área postrema (17) e alterar a atividade de rotas vagais ascendentes do intestino para o tronco cerebral (18). As suas duas principais formas conseguem agir em receptores de NPY na periferia ou no sistema nervoso central (SNC). A rota vago - tronco cerebral - hipotálamo mostrou-se importante na mediação dos efeitos anorexígenos do PYY₃₋₃₆ via receptor Y2 (19). A ação direta do PYY₁₋₃₆ no SNC dá-se pela sua ligação aos receptores Y1 e Y5, originando sinais

orexigênicos, promovendo a ingesta calórica (20). Portanto, os neurônios hipotalâmicos sofrem a influência de uma série de conexões neuro-humorais. Ainda, são as projeções extra e intra-hipotalâmicas dos neurônios do ARC, em especial, no núcleo paraventricular (PVN) onde sucedem importantes vias eferentes relacionadas ao gasto energético (16).

Mecanismos periféricos potencialmente envolvidos no controle da fome e saciedade (*Cross-Talk* intestino-hipotálamo)

A sinalização periférica constitui um mecanismo de retroalimentação o qual possibilita a manutenção do peso corpóreo apesar das flutuações diárias do gasto energético e ingestão alimentar. Nesse contexto, cabe ressaltar o papel crítico da leptina e da insulina (21). A leptina, um marcador de reserva energética, é produzida no tecido adiposo branco, atuando em receptores no hipotálamo e promovendo, assim, seu potencial anorexígeno (22).

A insulina, secretada pelas células beta do pâncreas, desempenha seu efeito anabólico, aumentando a captação de glicose (21). Embora periféricamente produza um efeito orexígeno, sabe-se que no SNC comporta-se de modo antagônico, promovendo sinais de saciedade, aumentando o gasto energético e regulando a ação da leptina (23).

A ingestão alimentar, por si só, estimula a secreção de hormônios gastrointestinais envolvidos na regulação da motilidade intestinal, na secreção de ácido gástrico e das enzimas pancreáticas e na absorção de nutrientes (24). Há uma série de evidências que apontam a relevante contribuição desses peptídeos enteroendócrinos na sinalização de vias orexígenas e anorexígenas e, por consequência, na modulação do apetite (18, 25-27). Sinais aferentes são desencadeados mediante a ingesta calórica, por um mecanismo vagal (28), fazendo com que esses hormônios cheguem à circulação (já que atravessam a barreira hematoencefálica) para ligarem-se a receptores no ARC (2, 29) (Figura 3).

Logo, os peptídeos do TGI desempenham um importante papel sob o comportamento alimentar e o balanço energético. Destacam-se com propriedades anorexígenas o GLP-1, PYY, CCK e a oxintomodulina; já com ação anorexígena tem-se a grelina.

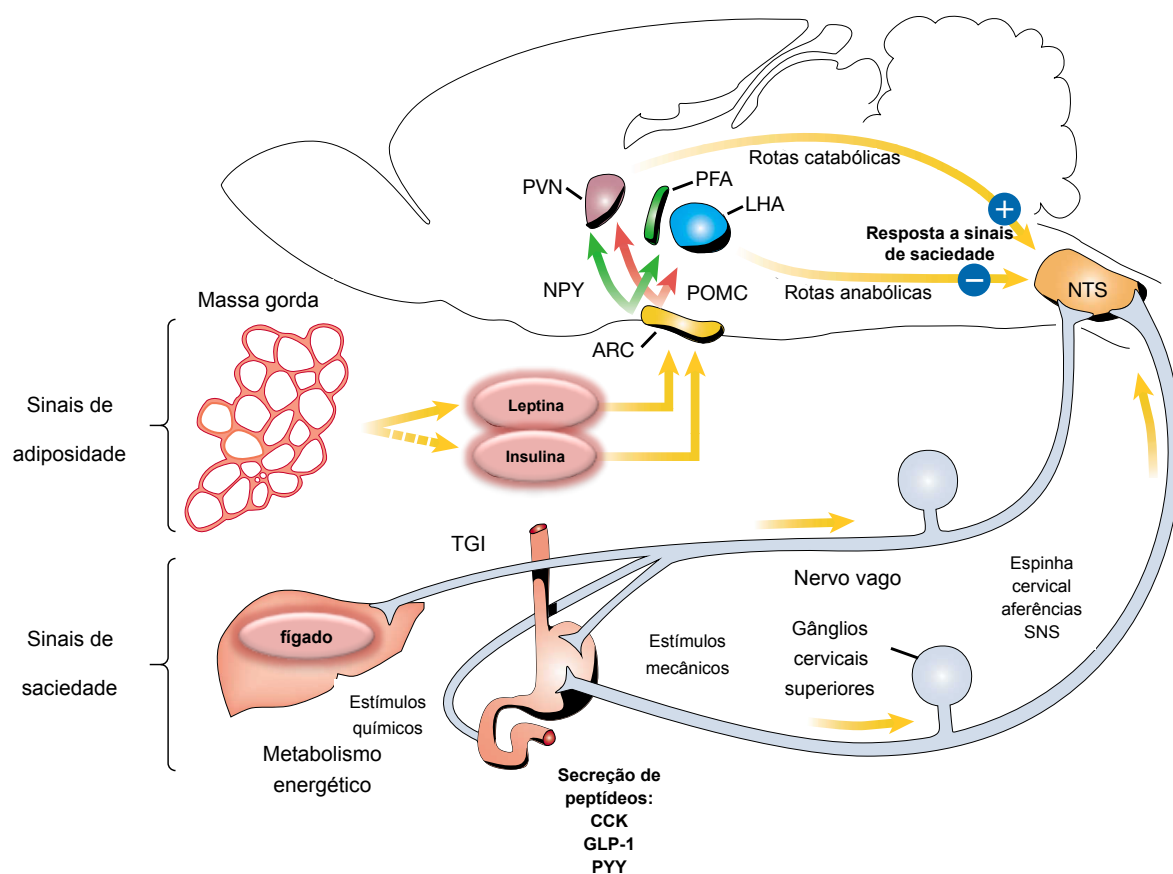


Figura 3. *Cross-talk* intestino-hipotálamo no controle da fome e saciedade. Adaptado de Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661-671.

2.3 Peptídeos Gastrointestinais

As células enteroendócrinas, secretam os peptídeos incretínicos, GLP-1 e PYY, os quais potencializam a secreção de insulina pelas células-beta na presença de glicose. Esse mecanismo ocorre, de modo sincronizado, à secreção de insulina (30, 31). Além disso, desempenham relevante papel na manutenção da homeostase do TGI por meio da inibição da absorção de nutrientes e pela preservação de suas funções essenciais, como a barreira entre o lúmen intestinal e tecido do hospedeiro (32-34).

Aspectos específicos do PYY

Descrição molecular

O peptídeo YY, assim chamado devido ao resíduo de tirosina (cuja abreviação é Y) nas extremidades N- e C- terminal da cadeia linear de 36 aminoácidos, foi isolado em 1980 a partir de epitélio suíno (35). Decorridos oito anos, os autores o isolaram em células humanas, verificando que diferiam nos aminoácidos da posição 3, em que alanina era substituída por isoleucina e na posição 18 na qual a serina era substituída por asparagina (36). Pertence à família *PP-fold*, cujos demais integrantes são o potente orexígeno neuropeptídeo Y (NPY) e o polipeptídeo polipancreático (PP) denominação obtida devido ao fato da sua cadeia de aminoácidos dobrar-se em si, o que forma uma curva acentuada que se assemelha à letra u (37, 38). Apresenta uma homologia de cerca de 70% em comparação aos demais membros da família (Figura 4), com uma estrutura de aminoácidos altamente preservada entre espécies (39, 40).

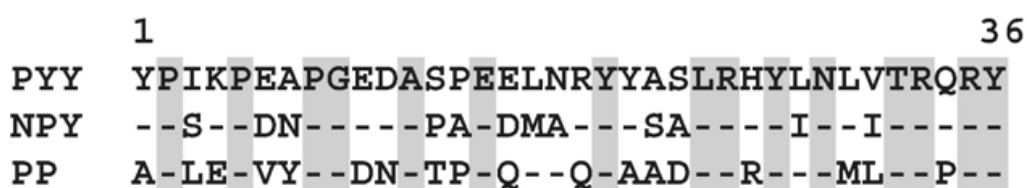


Figura 4. Estruturas de aminoácidos de PYY, NPY e PP humanos.

Há duas principais formas endógenas: PYY₁₋₃₆ e PYY₃₋₃₆, sendo que a última além de ser a sua forma ativa é a principal forma circulante deste hormônio (41), tanto nos estados de jejum quanto alimentado, computando 60% dos seus níveis circulantes no período pós-prandial (42, 43). O PYY₃₋₃₆ é obtido através da clivagem da porção N-terminal de tirosina e pela enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) (42).

A sua secreção dá-se majoritariamente pelas células-L intestinais, sobretudo no íleo e intestino grosso. A concentração tecidual de PYY humano é menor do que 10pmol/g na porção proximal do intestino, aumentando progressivamente nas porções mais distais, em que alcança o pico de 480pmol/g no reto (44). A sua secreção também ocorre, em menor grau, no sistema nervoso periférico e central, onde um sub conjunto de neurônios o expressam, incluindo no hipotálamo, ponte e

medula espinhal (45) e em terminações nervosas do estômago (46) e células pancreáticas (47). Fatores neuro-humorais, assim como o conteúdo intraluminal estimulam a secreção do PYY.

O ritmo do PYY não foi completamente esclarecido. Há descrição de que seja direcionado pela alimentação na fase diurna, variando conforme o conteúdo energético disponível (48). Estudos apontam que 15 minutos após a ingestão de nutrientes (especialmente lipídeos e proteínas) (49), a concentração desse hormônio inicia a elevar-se, resultado também verificado por estudo prévio do nosso grupo (Jornada, MN. Ver anexos). O pico máximo ocorre cerca de 90 minutos, permanecendo elevado por até seis horas (50). Relata-se que o pico plasmático é dependente do valor energético ingerido (51). Contudo, a secreção de PYY eliciada pela alimentação precede a chegada dos nutrientes na porção mais distal do TGI, indicando o envolvimento de um mecanismo neural, provavelmente via nervo vago (47). A secreção gástrica, CCK, ácidos biliares e ácidos graxos livres (em especial cadeia de 12 carbonos) também estimulam a secreção desse peptídeo (52, 53).

Ações do PYY

Embora o PYY seja um robusto fator de saciedade, ainda não foram absolutamente elucidados os mecanismos de sua ação (54). Aplicações locais de PYY₃₋₃₆ no ARC suprimem a atividade elétrica de neurônios que expressam NPY (55), enquanto que no terceiro e quarto ventrículos e no ventrículo lateral a sua aplicação potencializa a ingestão calórica. Essa resposta ocorre devido à modulação de diferentes regiões hipotalâmicas e corticais, como a diminuição na atividade neuronal no ARC, inibição da expressão de NPY mRNA hipotalâmico e ativação de 20% de neurônios MSH e POMC (56). O potencial sacietógeno do PYY₃₋₃₆ é inativado por secções bilaterais no NTS, indicando que o PYY₃₋₃₆ periférico liga-se ao receptor Y2 na aferência vagal para transmitir sinais de saciedade a porções centrais (19). O PYY₃₋₃₆ atua como um agonista pré-sináptico do receptor de NPY, Y2, que ao ser acionado inibe a atividade neuronal do NPY no ARC, promovendo ativação dos neurônios da POMC (26). Há evidências que suportam a ação direta do PYY₃₋₃₆ circulante no ARC (26, 57); todavia, ele também pode agir via aferências vagais ou estruturas cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica, podendo, em roedores, até mesmo atravessá-la (58). O mecanismo vagal foi descrito como a maior rota de sinalização anorexígena do PYY₃₋₃₆, uma vez que ratos

vagatomizados não apresentaram modificação na ingesta calórica, tampouco ativação dos neurônios no ARC ao receberem PYY₃₋₃₆ periférico (19).

Acredita-se ainda que o PYY possa exercer também um efeito em regiões corticais e límbicas, modulando, portanto, alguns aspectos hedonistas do comportamento alimentar (59). Estudos de imagem mostram a modulação da atividade em área hedonista após infusão intravenosa de PYY₃₋₃₆. A administração de placebo mostrou que a ingesta calórica correlacionou-se com sinalização hipotalâmica, enquanto que a infusão de PYY₃₋₃₆ essa sinalização migrou para o córtex orbitofrontal, região notoriamente hedônica, levando os autores a hipotetizar a capacidade de conversão do PYY₃₋₃₆ da regulação da ingesta energética de uma região homeostática (hipotálamo) para uma hedônica (59). Estes dados sugerem que o PYY possa também regular o comportamento alimentar por meio da promoção de sensação de recompensa, resposta característica de áreas hedônicas.

Enquanto estudos de imagem indicam possíveis áreas centrais envolvidas na produção de sinais de saciedade desencadeados por esse peptídeo, o sítio de ação periférico do PYY capaz de produzir o seu efeito anorexígeno permanece incerto (54).

Os receptores Y, pertencentes à família dos GPRs, quando ativados pelo PYY causam a indução de respostas inibitórias, como, por exemplo, a degradação do AMPc. Os subtipos de receptores diferem em sua distribuição, função e afinidade. PYY₁₋₃₆ possui especificidade para receptores Y1 e Y5, os quais estimulam a ingestão energética. Estudos anatômicos e funcionais identificaram que os receptores Y1 localizam-se na porção basolateral da membrana do epitélio intestinal (60) e, portanto, ativados pelo PYY endógeno secretado na área subepitelial (61). Já o PYY₃₋₃₆ liga-se preferencialmente a receptores Y2, os quais estimulam rotas anorexígenas (62, 63). Ratos nocauteados para o receptor Y2 não apresentaram redução da ingesta após administração periférica de PYY₃₋₃₆. Entretanto, a deleção do receptor no hipotálamo de roedores resultou em significativa perda ponderal e aumento da ingestão, sugerindo que o efeito inibitório do PYY₃₋₃₆ sob o comportamento alimentar dê-se via Y2. Além disso, a administração periférica desse peptídeo produz diminuição na atividade neural no ARC, inibição da expressão de NPY mRNA hipotalâmica e ativação de 20% de neurônios MSH e POMC (26).

A administração periférica de PYY₃₋₃₆ mostrou um efeito dose-dependente no retardo do esvaziamento gástrico (64, 65), na redução da ingestão alimentar, bem

como na indução de um negativo balanço energético em roedores (26), primatas (66), humanos eutróficos (26) e até mesmo em indivíduos obesos (67), com poucas exceções (68). Essa resposta ocorre devido à modulação de diferentes regiões hipotalâmicas e corticais (56). O uso crônico de PYY₃₋₃₆ ocasionou a redução de peso em roedores da espécie ob/ob, Zucker e em modelo de obesidade induzida por dieta (DIO) (69). A aplicação aguda endovenosa de PYY₃₋₃₆ potencializa a ação da insulina na disposição de glicose em ratos alimentados com HFD (70) por um mecanismo que independe do peso corporal e ingestão calórica, parecendo não afetar a ação da insulina sob a produção de glicose e a conversão de AGL (71).

Em humanos, a administração endovenosa intermitente a cada 1h com intervalo do mesmo período ao longo de dez dias mostrou inibição duradoura do apetite com significativa perda ponderal (72, 73) tanto em eutróficos (26) quanto em obesos (67). Há evidências de que também promova lipólise e aumento do gasto energético (26, 74, 75), além do PYY total correlacionar-se significativamente com o gasto energético pós-prandial (76); todavia, essa associação não foi universalmente encontrada (77). Ainda não são claros tanto a magnitude do envolvimento do PYY₃₋₃₆ na regulação da homeostase energética quanto os mecanismos os quais medeiam os efeitos deste peptídeo no gasto energético (78).

Secreção de PYY

O PYY é secretado para a circulação após as refeições, enquanto que o jejum provoca redução nos seus níveis.

A célula-L intestinal

A célula-L, localizada nas porções mais distais do intestino delgado e no intestino grosso, é uma célula do tipo aberta, com forma delgada e triangular, cuja base é apoiada na lâmina basal, em que as microvilosidades projetam-se para o lúmen (79). De fato, as microvilosidades apicais permitem que a célula desempenhe uma função de sensor a nutrientes e substâncias presentes no lúmen, estimulando a secreção de peptídeos, como o PYY (Figura 5) (44).

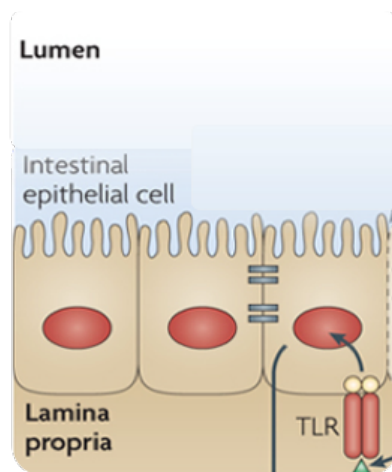


Figura 5. Célula-L intestinal. Adaptado de Abreu, Maria T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nat Rev Immunol. 2010

Na porção superior do intestino delgado de camundongos, há uma grande proporção de células-L produtoras de colicistoquinina (CCK), enquanto que do cólon em diante verifica-se o aumento progressivo de células-L produtoras de PYY (80). Os achados apontam que tanto o PYY quanto o GLP-1 se colocam nestas células. Primeiramente, acreditava-se que a secreção de PYY sobrepujasse a de GLP-1 (ou vice-versa), conforme condições específicas, permanecendo incerto o quanto isso se dava por diferentes sítios de ativação da mesma célula-L ou à existência de células-L positivas para um e negativas para outro (81). Todavia, um recente experimento *in vivo* em células de cólon humano demonstrou que o PYY e o GLP-1 se colocam nas mesmas vesículas sem nenhuma população específica de células para produzir apenas um dos peptídeos, onde a produção de ambos ocorre paralelamente (82). Uma vez excitado, o hormônio difunde-se pela lâmina basal até a lâmina própria cujo transporte para a circulação portal se dá por meio do fluxo sanguíneo (83).

Portanto, devido aos peptídeos que secreta e seus respectivos impactos nos mecanismos de fome e saciedade e na homeostase glicêmica, a comunidade científica tem dedicado particular interesse na célula-L como questão de estudo, sobretudo no que tange à identificação dos receptores relacionados à secreção de PYY e seus papéis na fisiopatologia do diabetes e da obesidade. Os receptores acoplados à proteína-G (GPRs) são receptores de ácidos graxos livres (FFAR),

localizados na porção distal do jejuno, íleo, cólon e reto, que, uma vez ativados, desencadeiam a secreção do PYY, bem como da CCK e do GLP-1, promovendo sinais de saciedade (84-90). Essa família de receptores está envolvida em uma série de efeitos metabólicos, destacando-se a regulação do metabolismo glicídico, proteico e lipídico, os quais são atingidos pelo estímulo de secreções hormonais. O efeito celular direto de ácidos graxos é visível na redução da lipólise nos adipócitos ou na ativação direta do sistema nervoso simpático e indireta na ativação vagal por meio das incretinas (91).

Receptores para ácidos graxos livres de cadeia curta

Receptores para ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), como o GPR41 (ou FFAR3) e GPR43 (ou FFAR2), são expressos em células-L de ratos e humanos (86, 87, 92). O GPR41 e o GPR43 ligam-se a SCFA, acoplando-se à subunidade alfa da proteína de ligação Gi (G α i), uma rota inibidora da adenilato ciclase, diminuindo a 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc), enquanto que o GPR43 pode ligar-se tanto à proteína Gq (G α q) quanto à G α i. Por encontrarem-se colocalizados ao PYY (87), a ativação desses receptores por ácidos graxos dietéticos eleva a concentração do hormônio (93). A secreção de leptina também é estimulada por ácidos graxos de cadeia curta no tecido adiposo via GPR41 e GPR43 (94); contudo, por um mecanismo ainda desconhecido (91).

Demonstrou-se que, por meio do GPR41, os SCFA acionam a atividade simpática, gerando o aumento do gasto energético via elevação da taxa cardíaca e termogênese no período pós-prandial (95). Entretanto, em um contexto fisiopatológico de obesidade e resistência à insulina a secreção de PYY pela ativação do GPR41 por SCFA reduz o trânsito intestinal, promovendo a absorção dos nutrientes e, por consequência, favorecendo o ganho de peso (90).

Além do epitélio intestinal, o GPR43 foi também descrito no adipócito, demonstrando que é ativado por SCFA (acetato e propionato) reduzindo a lipólise no adipócito (96). Tal efeito pode estar relacionado com a redução dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres induzidos pela direta administração de SCFA ou substâncias (lactulose) capazes de elevar a concentração circulante de ácidos graxos (91). Estudos com mutações sugerem uma interação anti-inflamatória entre

SCFA e seu receptor. O nocaute do GPR43^{-/-} em roedores mostrou uma aumentada resposta inflamatória em modelos de colite com morte mais precoce em relação ao controle, porém, com menor dano tecidual (97, 98).

Receptores para ácidos graxos livres de cadeia média e longa

Ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia média (C6-C12) e longa (C14-24) ativam o GPR40 (FFAR1) e GPR120 (84, 99, 100). O mecanismo envolve a via da fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2), estimulando a PLC a produzir 1,2 diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3), resultando no aumento da proteína cinase C (PKC) e secreção intracelular de íon Ca⁺², culminando na exocitose de peptídeos enteroendócrinos (99, 101). Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) dividem-se, principalmente, em duas famílias: ômega-6 (ácido linoleico (LA) e o ácido araquidônico (AA)) e ômega-3 (ácido alfa linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA)). As propriedades anti-inflamatórias dos ácidos graxos ômega-3 encontram-se bem descritas por distintos mecanismos (102). Ainda que ativados por ácidos graxos (exceto GPR 119 o qual é ativado por seus derivados), esses receptores possuem especificidade para ligantes e distintas distribuições teciduais (91).

O GPR40 é abundantemente expresso nas células beta-pancreáticas, contribuindo para a regulação da secreção de insulina (100, 103, 104). Os ácidos palmítico, esteárico e oleico foram identificados como ligantes do GPR40 (91). Uma vez ativado, o GPR40 é capaz de modular a secreção de insulina tanto diretamente pelas células beta-pancreáticas quanto indiretamente pela regulação da secreção incretínica, dada a sua capacidade de estimular a síntese de GLP-1. Animais com mutações para esse receptor GPR40^{-/-} demonstram menor resposta secretória de GLP-1; enquanto que camundongos selvagens cuja via do GPR40 foi estimulada por dieta hiperlipídica apresentam maiores níveis séricos desse hormônio (89). Recentemente, Xiong e colegas confirmaram a colocalização do GPR40 e GLP-1 em células-L de camundongos em modelo murino. Os autores demonstraram que a administração oral de óleo de milho (contendo ligantes tanto para GPR40 quanto GPR120) estimula a secreção de GLP-1 em camundongos selvagens quanto naqueles nocauteados para GPR120.^{-/-} Contudo, esse resultado não foi replicado nos animais nocauteados para o GPR40,^{-/-} evidenciando o papel mediador deste

receptor no efeito incretínico (105).

O GPR119 é outro receptor para ácido graxo de cadeia longa, encontrado não somente nas células-L, mas também nas células beta-pancreáticas (106) e no cérebro (107). A sua ativação cerebral por infusão local de oleiletanolamida (OEA) ou agonista sintético (PSN632408) possui efeito inibitório na alimentação, ganho ponderal e acúmulo de tecido adiposo em ratos alimentados por HFD (107). Periféricamente, a administração de ácido graxo de cadeia longa e agonistas de GPR119 está intimamente relacionada na potencialização da secreção de GLP-1 em roedores *in vitro* e *in vivo* (106, 108). Além disso, há evidência de que possui algum papel mediador na secreção de PYY assim como no controle da tolerância à glicose. A melhora da resposta glicêmica, por meio do aumento da secreção de insulina apenas no grupo controle, mas não em ratos PYY^{-/-} demonstrou que o uso do agonista de GPR119 pode melhorar a resposta glicêmica, envolvendo a sua ativação na célula-L com, subsequente, efeito mediador do PYY (61).

O GPR120, além do epitélio intestinal, é expresso no pulmão, no tecido adiposo e em macrófagos. Hirasawa, em um elegante estudo, demonstrou *in vivo* o papel mediador do GPR120 no estímulo da secreção de GLP-1 com administração de ácido alfa-linolênico (ALA) (84). Esse receptor é discutido como um receptor fisiológico para ácidos graxos ômega 3 (DHA e alfa-linolênico) em macrófagos e adipócitos, parecendo auxiliar tanto em ações anti-inflamatórias (por exercer efeito inibitório na produção de TNF-alfa e IL-6) quanto na sensibilização da insulina (por aumentar a translocação do GLUT-4, elevando a captação de glicose). Nesse panorama, os ácidos graxos ômega 3 mostraram-se eficazes em roedores na prevenção da resistência à insulina, intolerância à glicose e obesidade mesmo quando submetidos a HFD (109). Recentemente evidenciou-se que EPA, DHA e AA desencadeiam a mesma sinalização de eventos; porém, com diferentes cinéticas e eficiência, através do GPR120 em células do epitélio intestinal. Ainda, constatou-se, que tanto ômega-3 quanto ômega-6 inibem a ativação do NF-κB nessas células (102). A mutação para o GPR120^{-/-} acompanha um fenótipo de obesidade, tolerância à glicose, esteatose hepática, redução na diferenciação de adipócitos e aumento na taxa de lipogênese tanto em roedores submetidos à HFD quanto em indivíduos com perda da função desse receptor (110).

Portanto, as células enteroendócrinas possuem a capacidade de integrar um complexo mecanismo nutriente-sensível ao longo do TGI, de modo a responder, apropriadamente, com a secreção de hormônios sacietógenos/insulinotrópicos. Além dos estímulos químicos aos quais essas células são submetidas ao longo do tubo digestório, há também os estímulos neurais e físicos que as estimulam na secreção de peptídeos entéricos, os quais poderão exercer papéis endócrino e parácrino (dada a sua estrutura morfológica) e/ou de ativação de receptores neurais inervados na mucosa do TGI (111) (Figura.6).

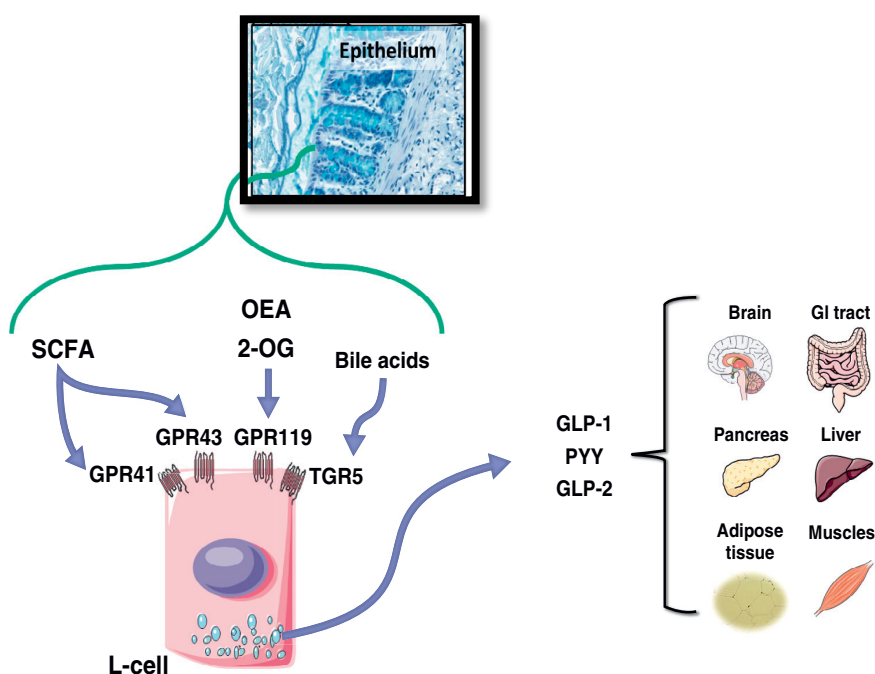


Figura 6. Receptores presentes na célula-L intestinal e órgãos-alvos. Adaptado de Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. Curr Opin Pharmacol. 2013

Metabolização do PYY

O aumento nos níveis plasmáticos de PYY é dependente das calorias ingeridas (75), bem como da composição dos macronutrientes, onde lipídeos e proteínas parecem exercer maior influência (112, 113). A sua secreção é iniciada 15 minutos após a alimentação, sendo que o seu pico é alcançado em 1-2 horas, permanecendo elevado por até seis horas (112). A sua degradação é muito rápida, apresentando uma meia-vida extremamente curta (10 minutos) (114). Portanto, a

permanência do aumento dos seus níveis pós-prandiais, provavelmente, atribui-se a sua secreção pelos nutrientes ingeridos a medida que alcançam porções mais distais do TGI (62). Após ser secretado pelas células-L, o PYY ou é coletado por pequenos vasos linfáticos ou penetra nos capilares intestinais que nutrem a veia porta hepática (HPV), uma vez que ele pode ser degradado no fígado e diluído na circulação geral (54).

2.4 Dieta hiperlipídica, inflamação intestinal e resistência à insulina: potencial impacto na fisiologia do PYY

Resistência à Insulina

A capacidade do ser humano armazenar energia, sob forma de gordura, em períodos de escassez alimentícia, garantiu, em parte, a sua sobrevivência ao longo da sua evolução (115). Esse armazenamento ocorre, primordialmente, devido a ações da insulina, um hormônio polipeptídico anabólico, com peso molecular de 5,8 kDa, produzido pelas células beta do pâncreas. Sua síntese é eliciada quando os níveis circulantes de glicose e aminoácidos elevam-se após as refeições. No período pós-prandial, a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas viabiliza o armazenamento de glicose, por meio do glicogênio hepático e muscular pela deposição de ácidos graxos e triglicerídeos (TGs) no tecido adiposo. Em períodos de privação, como o jejum, durante infecções, ou estresse, hormônios contrarreguladores ou fatores com efeito anti-insulínicos mobilizam essa reserva energética (116-118).

A habilidade seletiva de modulação celular e/ou tecidual de resposta à insulina encontra-se bem preservada em uma série de espécies, como insetos, vermes e vertebrados, dentre estes, o homem (119) Ademais, foi a perpetuação desta habilidade que propiciou a sobrevivência da espécie em uma série de situações que a colocavam em risco (fome, infecções, crescimento), levando os pesquisadores a hipotetizar que, na realidade, a resistência à insulina, possui uma relevante importância evolucionária (120).

Um clássico estudo secular demonstrou que durante o jejum prolongado o organismo humano é capaz de limitar a perda de nitrogênio (121). A inanição gera resistência à insulina, comprovada pela inibição da ação da insulina em tecidos-alvo,

diminuindo a captação de glicose muscular, por meio da redução da fosforilação da via da AKt e seus substratos (122, 123). Isso acarreta modificações no metabolismo intermediário, fazendo com que a mobilização de energia seja majoritariamente obtida a partir da oxidação de gordura e corpos cetônicos (124).

A via da gliconeogênese visa reduzir a necessidade de utilização de esqueletos de carbono de aminoácidos para a sua formação, de modo que a perda proteica seja diminuída, demonstrando que a RI tem, portanto, papel importante na promoção da sobrevivência, uma vez que a quantidade total de proteína constitui o maior determinante de sobrevivência em períodos de inanição a longo prazo (120, 125, 126). A quantidade de energia extraída de proteínas é muito inferior à extraída de lipídios (4:9/g), caso as reservas proteicas fossem primariamente utilizadas, rapidamente haveria sua depleção, levando à morte. Tal fenômeno é conhecido pela síndrome do pinguim rei, por ter sido estudado no pinguim rei na Antártida (127). A RI promove a disponibilidade de glicose para a resposta inflamatória em defesa a situações estressoras como a inanição, doenças, trauma; o crescimento durante a lactação, gravidez, puberdade e câncer e prepara espécies que migram e/ou hibernam.

Esse mecanismo evolucionário foi extremamente necessário na evolução da espécie humana quando o maior desafio do homem era sobreviver a situações demasiadamente estressoras, incluindo a escassa disponibilidade de alimentos. Contudo, a sobrevivência trouxe-nos a alta disponibilidade de alimentos de alta densidade calórica e o sedentarismo, de modo que a incapacidade de adaptar-se a essa nova realidade, favoreceu a obesidade. Paradoxalmente, a obesidade e a inanição compartilham a elevada oxidação de ácidos graxos, inibição da oxidação da glicose e aumento no ciclo de Cori. Adicionalmente, a elevada ingestão de lipídios na dieta, de forma contínua, acarreta uma resposta inflamatória crônica e resistência à insulina, originando permanentes danos, os quais finalmente resultam nas conhecidas complicações do diabetes *mellitus* tipo 2 (120).

Sinalização normal do receptor da insulina

No plano molecular, a sinalização intracelular de insulina inicia quando esse hormônio acopla-se ao seu receptor específico de membrana, o qual é uma glicoproteína com atividade quinase intrínseca, composto por duas subunidades α e

duas subunidades β cujas ligações são pontes dissulfeto (S-S). A subunidade α é a que contém o sítio de ligação da insulina (totalmente extracelular), enquanto que a subunidade β , de localização transmembrânica, transmite o sinal, ativando a sua capacidade quinase (estimulada pela insulina), proteína que por meio da fosforilação converterá a si e a outras proteínas em resíduo tirosina.

Como o receptor é uma tirosina quinase, ao ser ativado pela insulina, induzirá a fosforilação dos principais substratos de receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 (128-130). Subsequentemente, quando fosforilados em tirosina, IRS-1 e IRS-2 ativam a via da PI3-q, essencial para a síntese de glicogênio e o transporte de glicose. A ativação da PI3-q eleva a concentração de fosfatidilinositol-3-fosfato, intermediário, que por sua vez ativará a Akt (proteína quinase B) e MAPK (*mitogen activated protein kinase*), caracterizada pela importante atividade mitogênica deste hormônio, promovendo crescimento celular e inibindo a apoptose (131-133).

A ativação da Akt promove a síntese de glicogênio no tecido muscular; a lipogênese no tecido adiposo e, principalmente, nestes dois tecidos haverá a translocação de uma proteína, a qual se encontra no pool citoplasmático, denominada GLUT4 (transportadores de glicose), para a membrana da célula, a fim de exercer o transporte de glicose especificamente no músculo e tecido adiposo, uma vez que são nesses tecidos que há a presença de GLUT4, promovendo a captação de glicose nestes tecidos. Essa sinalização promove, ainda, a síntese de glicogênio hepático e muscular, bem como a lipogênese no fígado ao passo que inibe a produção hepática de glicose e a lipólise (134-137) (Figura 7).

A sequência de eventos acima descrita é essencial para as ações metabólicas da insulina, como o transporte de glicose e metabolismo, bem como para os metabolismos lipídico e proteico nos tecidos-alvos em que atua (135).

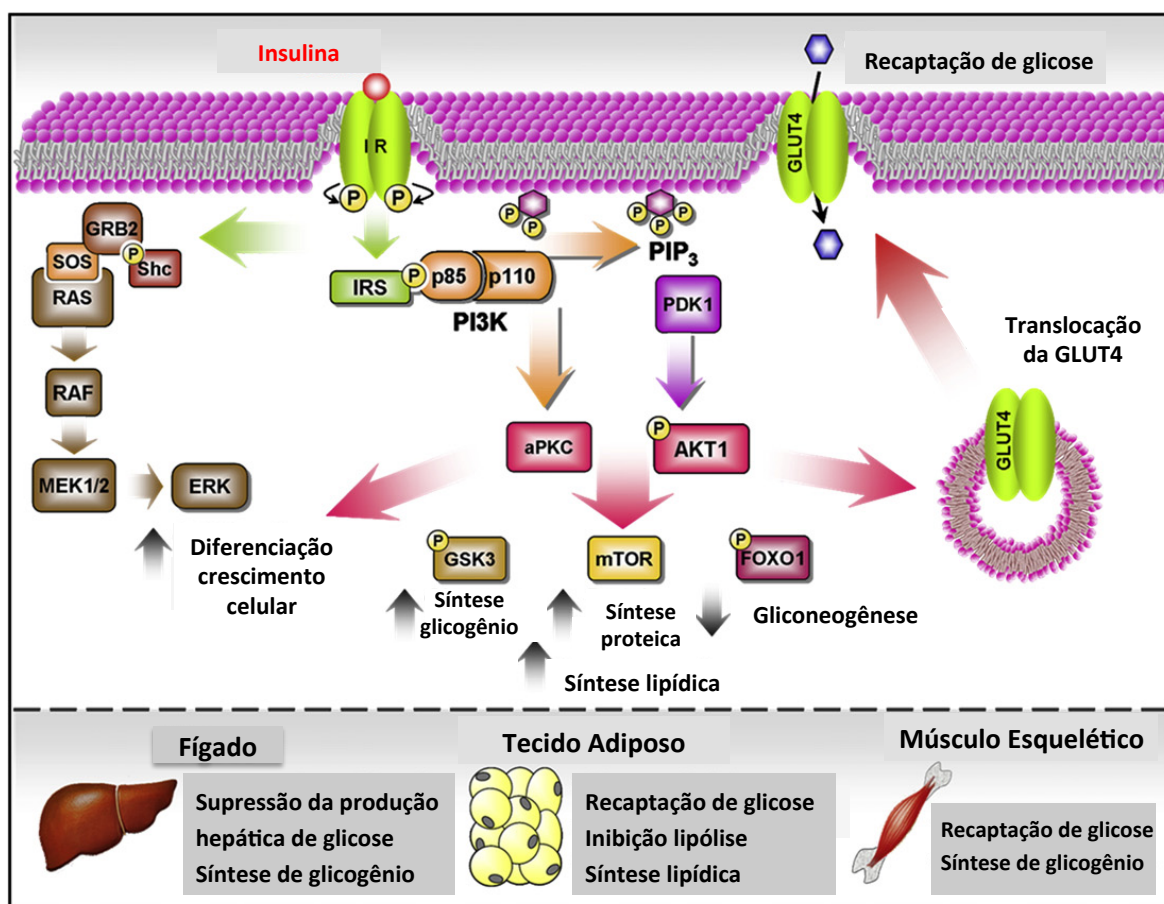


Figura 7. vias moleculares de sinalização da insulina. Adaptado de Tsatsoulis et al., 2013.

Mecanismos de resistência à insulina

Ocorre que desequilíbrios entre subunidades de PI3-quinase, induzidos pelo aumento do consumo energético, podem, também, prejudicar a sinalização da insulina (138). A hiperinsulinemia por si só é capaz de inibir a ação da insulina (139), gerando um quadro de RI. Esse quadro define-se como um estado de menor resposta metabólica aos níveis circulantes de insulina. Encontra-se muito bem definido na obesidade e no diabetes mellitus tipo2 (reconhecido como uma característica inerente desse), contribuindo para as anormalidades em tecidos periféricos, no sistema nervoso central e na célula beta-pancreática. Incide em uma série de tecidos, como o músculo, tecido adiposo, fígado, vasos e hipotálamo (neurônios hipotalâmicos envolvidos na ingestão alimentar) (140).

A RI é acompanhada no obeso e no DM2 de um processo inflamatório subclínico e associada a ela, fazendo parte da sua definição: a hiperinsulinemia. Há três efeitos concomitantes, contudo algum pode sobrepor-se ao outro: efeitos, exclusivamente, decorrentes desse processo inflamatório subclínico, enquanto outros são provenientes da ausência de ação insulínica (elevação dos níveis de glicemia), já outros são decorrentes

do excesso de insulina circulante na sua fisiopatologia (141). A visibilidade clínica, por exemplo com o aumento dos níveis de proteína C-reativa, ocorre muito tardiamente, uma vez que, por ser um fenômeno celular, a ativação dessas vias inflamatórias ocorre demasiadamente precoce, imperceptível nos exames atuais de rastreio.

Advém a redução de utilização de glicose e o aumento do crescimento e diferenciação celular por ação da insulina. Um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos e lipídios decorrente da RI promove um círculo vicioso com prejuízo na sensibilidade tecidual à insulina. O estado de resistência, inicialmente, é compensado pelas células- β , uma vez que elevam a produção do hormônio. Todavia, a longo prazo, ocorre uma incapacidade de suprir tal aumento, acarretando em intolerância à glicose.

Estudos mostram que roedores submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) desenvolvem RI e até diabetes. Esses animais apresentam a sua captação de glicose reduzida, devido a menor fosforilação do receptor de insulina IRS-1 e seus substratos em tirosina e, por consequência, menor ativação da via da Akt, ou seja, animais obesos apresentam a sequência de transmissão do sinal de insulina reduzida. Sabe-se que a HFD promove o aumento de ácidos graxos livres e desencadeia respostas inflamatórias por meio da liberação de interleucina (IL-6), TNF- α , os quais levam à ativação das serinas quinases IKK, JNK e nPKC (diferentemente do receptor que é tirosina quinase) levando à fosforilação do IRS-1 em serina e, conseqüentemente, modificando a disposição espacial, incapacitando-o de reagir com o receptor de insulina, criando uma situação de RI (142) (Figura 8).

50% a 60% das calorias ofertadas são oriundas de alimentos fonte de ácidos graxos saturados, como a banha suína associada à ração padrão (143).

Teorias unificadoras sobre resistência à insulina

Estresse de retículo endoplasmático

A demonstração do estresse de retículo endoplasmático (RE) foi o primeiro mecanismo unificador de RI (145, 146). No lúmen do RE encontra-se o sítio de entrada de proteínas destinadas às vias endo/exocitóticas cujas ações de dobramento, montagem, formação de pontes de dissulfeto e glicosilação de proteínas são desempenhadas. A manutenção da homeostasia do lúmen do RE mantém-se através de um complexo e sofisticado mecanismo.

Contudo, caso o retículo seja sobrecarregado com excesso de proteínas imaturas, por exemplo, um mecanismo denominado *unfolded protein response* (UPR) é desencadeado a fim de atenuar a taxa de tradução; aumentar a expressão de chaperonas e foldases e ativar um sistema de degradação (ERAD) o qual, juntamente, com o RE visa reduzir erros na montagem de proteínas (147). Inicialmente, esse mecanismo aspira à adaptação da organela a alterações ambientais e a normalizar a sua função. Destacam-se três proteínas da membrana do RE envolvidas na indução da UPR: IRE1 (*Inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*RNA-activated protein Kinase (PKR)-like ER kinase*) e ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (148) as quais encontram-se inativas em situações de homeostase do retículo (149, 150).

A partir da ruptura da homeostase, a sua ativação, via homodimerização e autofosforilação das quinases PERK e IRE1 e clivagem do ATF6, desencadeará uma cascata de sinalização cuja finalidade é reverter o fenômeno de estresse, através da redução da atividade ribossômica (151, 152), suscitando efeitos biológicos de sobrevivência. A falha desta resposta adaptativa aciona a ativação do NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), o qual induzirá a expressão de genes mediadores da resposta imune. Uma vez que o sistema exaure, ocorre o fenômeno da apoptose cujo propósito é excluir as células incapazes de reparação (152, 153). Quando estas proteínas são ativadas, como a IRE1, por exemplo, diretamente, a JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*), IKK (*I B kinase*) e nPKC (*protein kinase C*) são ativadas. Isso é um parafenômeno do estresse de retículo, o qual acaba induzindo a resistência à insulina (154).

Além disso, lipídeos possuem a capacidade de ativar a PERK que em sequência induz, por autofosforilação, a ativação de seu domínio cinase e cuja proteína-alvo é o fator de iniciação eIF2 α (*Eukaryotic Translation Initiation factor 2, alpha subunit*) (155). Portanto, o estresse de retículo endoplasmático cursa com resistência à insulina (156).

A via inflamatória

Outro mecanismo unificador da RI são receptores de membrana, denominados *toll like receptors* (TLR). Esses receptores são capazes de identificar padrões moleculares de bactérias ou de vírus. Em mamíferos, a família TLR é constituída por 12 receptores, onde cada TLR reconhece uma porção diferente de bactéria ou vírus, sendo que o TLR4 reconhece um lipopolissacarídeo da membrana de gram-negativo (LPS) e ácidos graxos saturados (157).

A ativação do TLR4 possibilita, simultaneamente, a ativação da JNK e do IKK, promovendo um fenômeno unificador de resistência à insulina. O animal nocaute para TLR4 não desenvolve RI quando submetido à HFD, uma vez que é capaz de ativar normalmente a Akt, (porque não consegue ativar a JNK) (158-160). O animal TLR4^{-/-} não apresenta a ativação de NF κ B, bem como ausência de alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias sistêmico e intestinal e de suas expressões no tecido adiposo (161).

O papel da microbiota intestinal

Modelos de obesidade induzida por HFD estabeleceram uma relação de estudo entre microbiota, nutrientes e metabolismo (141). Pesquisadores hipotetizavam que bactérias do trato gastrointestinal poderiam ser ligantes do TLR4. Sabe-se que indivíduos obesos possuem diferentes bactérias quando comparados a indivíduos eutróficos, logo essa diferença poderia permitir que uma maior absorção de LPS seja capaz de induzir RI. Verificou-se que administração de HFD em roedores promoveu aumento de peso, ocasionando a elevação dos níveis glicêmicos, exprimindo RI, com aumento dos níveis de LPS. Tal achado elucidou que o animal obeso possui uma maior absorção de LPS, o qual é capaz de induzir o fenômeno de RI. O somatório desses mecanismos unificam-se de uma maneira mais concisa, uma vez que a ativação do TLR4 acaba por induzir estresse de retículo (162).

Logo, delinearam-se estudos a fim de elucidar como a flora intestinal poderia aumentar a produção de LPS para induzir RI. Sabe-se que ao longo do TGI há colonização de inúmeras bactérias cujas concentrações aumentam ao direcionarem-se ao cólon. Embora não unânimes, as diferenças descritas na maioria dos trabalhos apontam que, ao contrário dos indivíduos obesos, em indivíduos eutróficos ocorre o predomínio do filo bacteroidetes sob o filo firmicutes (163, 164). Esse aumento tanto da produção quanto da absorção de LPS induz RI no fígado, músculo, tecido adiposo, hipotálamo, bem como agrava o quadro inflamatório. Nesse contexto, a microbiota destaca-se de modo extremamente relevante, associando-se ao genótipo e meio ambiente para a expressão do fenótipo da RI (162, 165-167). Em tempo, a influência da microbiota no metabolismo emerge uma importante inter-relação para a associação de novas possibilidades terapêuticas nessas doenças crônicas.

O fenômeno final de ativação de estresse de retículo é, portanto, praticamente universal na situação de resistência à insulina. Além disso, o aumento progressivo do tecido adiposo, por meio de uma dieta rica em ácidos graxos saturados, promove a infiltração de macrófagos para os adipócitos, promovendo um quadro inflamatório subclínico, elevando a produção de TNF, interleucinas pró inflamatórias, os quais serão responsáveis pela perpetuação e agravo da RI (141).

Associação entre redução da saciedade e a hipótese de resistência à insulina hipotalâmica

Neurônios hipotalâmicos expressam receptores de insulina (168) os quais, por sua vez, encontram-se envolvidos no balanço energético (169). A insulina exerce ação no hipotálamo com a finalidade de regular o peso corpóreo, onde a sua administração direta promove sinal de saciedade (170, 171). Juntamente com a leptina, a insulina estimula uma rota catabólica, a qual envolve a ativação dos neurônios POMC/CART e inibição da rota anabólica via neurônios NPY/AGRP no ARC. Assim, essas rotas projetam-se para o PVN cujos estímulos alcançarão conexões autonômicas, resultando em respostas sacietógenas (169). Entretanto, a prejudicada secreção de insulina reduz a sua sinalização no hipotálamo, conduzindo ao aumento da ingesta calórica e, subsequente, ganho de peso (169). Esse fenômeno promove, ainda, a redução do efeito inibitório sob a produção hepática de glicose e da captação de glicose muscular bem como o aumento da lipólise no adipócito, resultando no incremento de ácidos graxos não esterificados

(NEFAs), cujo aumento aliado ao ganho ponderal retroalimentam e cronificam a RI. A elevação dos níveis plasmáticos de NEFAs produz também efeito deletério sob a resposta adaptativa das células beta à RI, uma vez que o aumento da glicemia e NEFAs agem de modo sinérgico na sua integridade celular, efeito esse conhecido como glicolipototoxicidade (172).

Relações entre inflamação intestinal e resistência à insulina

Além de caracterizar-se como órgão endócrino, o intestino também desempenha papel imunológico. Dentre as suas atribuições, requer coordenar respostas a possíveis patógenos, sem interferir na digestão tampouco na microbiota intestinal que o comensaliza (173, 174). Para isso, as células entéricas desenvolvem uma estreita relação com algumas células imunes localizadas na lâmina própria (175), demandando uma complexa participação do SNC e periférico, peptídeos gastrintestinais, citocinas e células imunes produzidas pelo intestino (176, 177), cujos intrincados mecanismos são pouco conclusivos.

Frente a um campo pouco desvendado, tem-se a noção de que haja um desequilíbrio entre hospedeiros e a microbiota (178), o qual acarreta e/ou perpetua o curso fisiopatológico de doenças, como a obesidade e RI.

Os ácidos graxos saturados, já foram amplamente relacionados à inflamação de baixo grau, obesidade, DM2, dislipidemias, esteatose hepática não alcoólica e doenças cardiovasculares (179-181). Porém, foram nos últimos anos que a comunidade científica tem se dedicado a esclarecer de que modo o epitélio intestinal desempenha esse reconhecimento de um determinado ácido graxo e a resposta que o mesmo produz, a fim de traçar novas estratégias para combater a pandemia da obesidade e DM2. A HFD promove inflamação intestinal (182), provavelmente, devido ao fato da absorção de gordura provocar uma resposta imune, pois exige o recrutamento de macrófagos e linfócitos intra-epiteliais, o que acarreta na secreção de citocinas (IL-6, TNF- α) pelos enterócitos (183-185). Além disso, foi demonstrado que a inflamação gerada correlaciona-se ao posterior desenvolvimento de obesidade e DM2 (186).

Somando-se a isso, o aumento nos níveis de LPS por meio da HFD foi intimamente relacionado com o TLR4, já que ativa o NF κ B o qual, por sua vez induz a expressão de iNOS (óxido nítrico-sintase induzida) e COX-2 (ciclo-oxigenase-2), produzindo inflamação

intestinal (161). Uma vez que LPS desencadeia inflamação de baixo grau, é plausível cogitar que modificações na microbiota intestinal ocasionadas por HFD possam desempenhar um papel chave na indução da resposta inflamatória gerada pelo LPS, contribuindo para o fenótipo observado em roedores alimentados com HFD. Há evidência de que a integridade da barreira intestinal seja prejudicada pela HFD (187), fazendo com que o LPS presente no lúmen tenha acesso à lâmina própria, onde macrófagos produzem citocinas pro-inflamatórias, potencializando a inflamação local e promovendo a endotoxemia TLR4 dependente (161).

A ocorrência crônica dessa cadeia de eventos, a qual interage com a microbiota intestinal e outros fatores ambientais e genéticos, porta-nos a considerar o epitélio intestinal como uma grande, senão a maior, região fonte de inflamação, uma vez que a gordura ingerida é nele primeiramente exposta, fazendo-nos ponderar a necessidade da compreensão da sua potencial capacidade inflamatória frente à dieta ocidental e às alterações metabólicas como a obesidade e RI.

Modificações da fisiologia do PYY com dieta hiperlipídica

Foi demonstrado que roedores alimentados com HFD ao longo de 16 semanas apresentaram níveis pré e pós-prandiais de PYY menores em comparação ao grupo controle (188). Além disso, o mesmo grupo constatou a redução na expressão proteica de PYY intestinal apenas em ratos com obesidade induzida por HFD, mas não em modelo de resistência à obesidade (189). Contudo, achados acerca da secreção de PYY e seus níveis basais ainda são contraditórios (190, 191). Embora não haja uniformidade nos dados, especula-se que as modificações secretórias do PYY, induzidas por dieta hiperlipídica, possam contribuir para o desenvolvimento/perpetuação do quadro de obesidade.

Estudos conduzidos em humanos evidenciaram uma correlação inversa entre os níveis basais de PYY e índice de massa corporal (IMC) em adultos, além de uma atenuada resposta secretória pós-prandial em amostra de obesos (77, 192). Já em homens magros submetidos a três semanas de HFD não foram demonstradas alterações nos níveis plasmáticos de PYY, sugerindo que a diminuição da resposta secretória em obesos possa estar associada à obesidade e não à HFD (193). Adicionalmente, a cirurgia bariátrica promove um aumento extremamente precoce no níveis de PYY (194, 195),

sugerido pela veloz perda de peso (189).

Alterações metabólicas, oriundas da resistência à insulina (RI) e diabetes, parecem exercer influência nos níveis séricos de PYY. Ratos cujas ilhotas de Langerhans sofreram nocaute para PYY elevaram a secreção de insulina em resposta a 25nM de glicose, evidenciando que a falta desse peptídeo aumenta a secreção de insulina pelas células pancreáticas (196). Em um modelo de RI e DM2 em ratos gotto-kakizaki (GR) verificaram-se níveis mais baixos de PYY em condições normais de alimentação quando comparados a ratos wistar. A realimentação desses animais, após 48 horas de jejum, não provocou mudança nos níveis de PYY no grupo GR, enquanto que nos ratos wistar a inanição ocasionou a queda nos níveis desse hormônio (197). Esse achado parece indicar uma menor responsividade à secreção de PYY no curso da fisiopatologia da RI e DM2.

Entretanto, os achados em humanos são inconclusivos, visto que os dois maiores estudos envolvendo insulinoresistentes e diabéticos são contraditórios. Parentes de DM2 e obesos diferem de indivíduos sem história familiar de primeiro grau dessas patologias quanto aos níveis basais e pós-prandiais de PYY, indicando que baixos níveis de PYY poderiam contribuir com a hiperinsulinemia, RI e com o subsequente desenvolvimento de obesidade e DM2 (198). Por outro lado, foi demonstrado que indivíduos DM2 apresentaram maiores níveis de PYY quando comparados a indivíduos com tolerância à glicose diminuída e controles saudáveis, mesmo quando ajustado para idade, sexo e IMC, evidenciando que a relação de PYY₃₋₃₆ independe da adiposidade (199). Cabe ressaltar que esse estudo apresenta um viés de seleção, uma vez que a amostra elegida foi oriunda de uma população com doença coronariana, ocasionando uma potencial confusão no achado por desconhecer-se o comportamento do PYY nesse subgrupo.

Enquanto o corrente mecanismo acerca da fisiopatologia do PYY é desconhecido, a sua administração exógena mostra-se similar em animais (69-71) e humanos (72, 73) com IMC normal (26) ou elevado (67). Portanto, estudos adicionais fazem-se necessários para avaliar o efeito a longo prazo da RI induzida por HFD, como promotora de resposta inflamatória subclínica na secreção de PYY fora do contexto da obesidade.

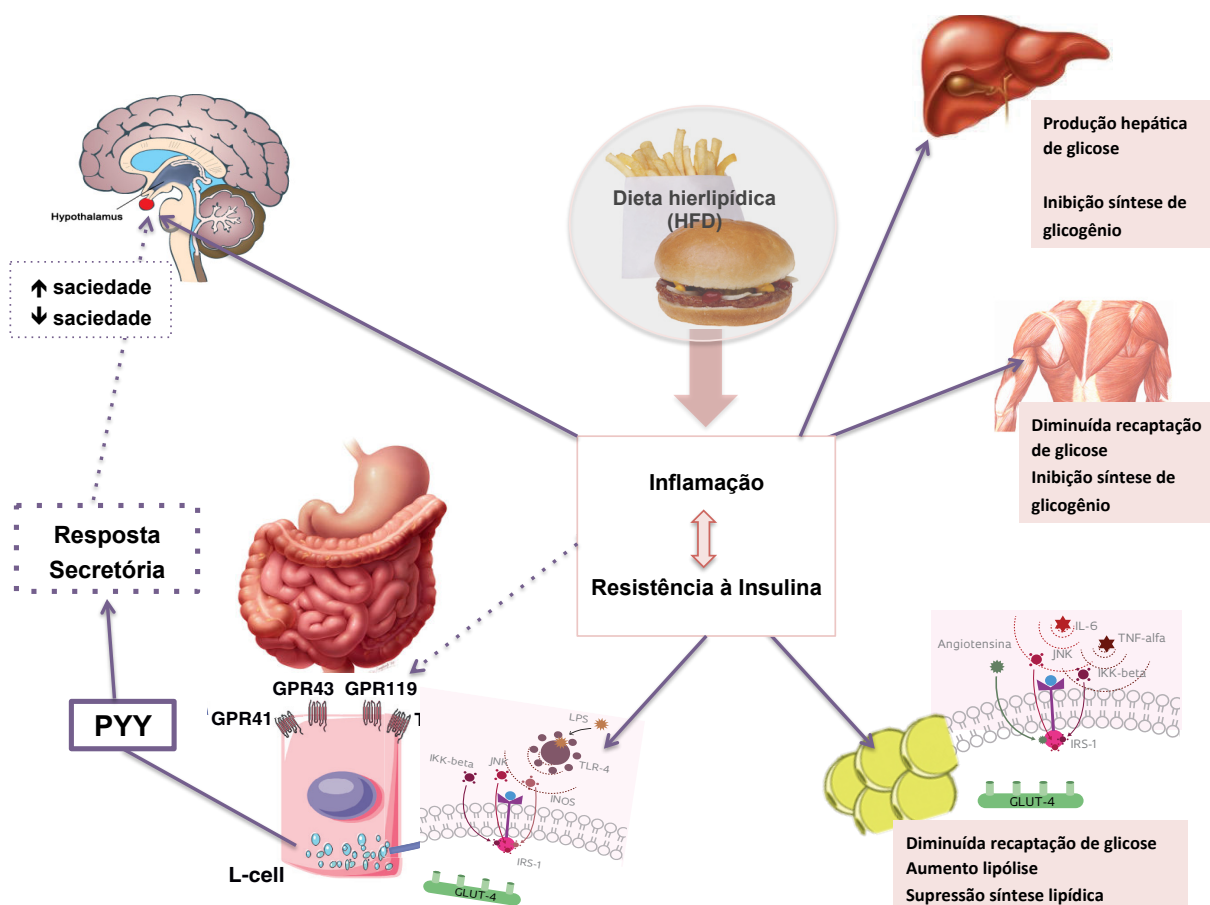
2.5 Conclusão

Os peptídeos entéricos destacam-se pelo relevante papel na promoção da saciedade e regulação dos metabolismos energético e da glicose. O PYY é um hormônio crítico na regulação e promoção de estímulos anorexígenos. Nesse contexto, a compreensão do seu comportamento na fisiopatologia da obesidade e resistência à insulina pode ser de grande valia para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O conhecimento do qual dispomos atualmente emerge o papel dos nutrientes, sobretudo dos lipídeos, na secreção desse peptídeo e seu potencial sacietógeno no combate de alterações metabólicas decorrentes da obesidade.

2.6 Mapa Conceitual

Desenvolvemos um modelo de resistência à insulina por meio de uma dieta hiperlipídica cuja concentração foi 55% de banha suína. Sabe-se que o excesso de ácidos graxos, sobretudo saturados, promove um processo inflamatório subclínico em uma série de tecidos e órgãos, incluindo adipócitos, hipotálamo, fígado, músculo e intestino.

A hipótese é de que essa inflamação subclínica poderia comprometer a capacidade das células enteroendócrinas em secretar PYY mediante estímulo (alimento), talvez porque as vias pós-receptor (GPR40, GPR41, GPR43 e GPR120) possam estar comprometidas pelo processo inflamatório intestinal. Se esta hipótese for verdadeira, esperamos observar uma diminuída resposta secretória de PYY após uma sobrecarga de lipídios. Desta forma, teoricamente, a deficiência de PYY poderia então contribuir para uma menor saciedade, favorecendo o ganho de peso e a obesidade.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar a resposta secretória de PYY após sobrecarga de ácidos-graxos monossaturados e saturados em ratos Wistar em um modelo resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em comparação ao grupo controle.

3.2 Objetivos secundários

- Avaliar a resposta insulínica após sobrecargas lipídicas agudas;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo nos seguintes tecidos:
 - o Fígado
 - o músculo
 - o intestino (jejuno)
- Correlacionar marcadores de estresse oxidativo e níveis de insulina;
- Correlacionar marcadores de estresse oxidativo e níveis de PYY.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blundell JE. Is there a role for serotonin (5-hydroxytryptamine) in feeding? *Int J Obes.* 1977;1:15-42.
2. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000;404:661-671.
3. Holzer P, Reichmann F, Farzi A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides.* 2012;46:261-274.
4. Holzer P, Schicho R, Holzer-Petsche U, Lippe IT. The gut as a neurological organ. *Wien Klin Wochenschr.* 2001;113:647-660.
5. Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18:181-187.
6. Murphy KG, Dhillo WS, Bloom SR. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocr Rev.* 2006;27:719-727.
7. Ahlman H, Nilsson. The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 2:S63-S68.
8. Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition.* 2000;16:866-873.
9. Chaudhri OB, Wynne K, Bloom SR. Can gut hormones control appetite and prevent obesity? *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S284-S289.
10. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998;1:271-272.
11. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:15043-15048.
12. Bewick GA, Gardiner JV, Dhillo WS et al. Post-embryonic ablation of *AgRP* neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J.* 2005;19:1680-1682.
13. Elias CF, Lee C, Kelly J et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998;21:1375-1385.
14. Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL et al. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res.* 2000;132:10-26.
15. Velloso LA. [The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50:165-176.

16. Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*. 2012;63:46-56.
17. Baraboi ED, Smith P, Ferguson AV, Richard D. Lesions of area postrema and subfornical organ alter exendin-4-induced brain activation without preventing the hypophagic effect of the GLP-1 receptor agonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1098-R1110.
18. Jobst EE, Enriori PJ, Cowley MA. The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:488-499.
19. Koda S, Date Y, Murakami N et al. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology*. 2005;146:2369-2375.
20. Kanatani A, Mashiko S, Murai N et al. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology*. 2000;141:1011-1016.
21. Woods AG, Guthrie KM, Kurlawalla MA, Gall CM. Deafferentation-induced increases in hippocampal insulin-like growth factor-1 messenger RNA expression are severely attenuated in middle aged and aged rats. *Neuroscience*. 1998;83:663-668.
22. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2000;21:263-307.
23. Schwartz MW. *Biomedicine*. Staying slim with insulin in mind. *Science*. 2000;289:2066-2067.
24. Wen J, Phillips SF, Sarr MG, Kost LJ, Holst JJ. PYY and GLP-1 contribute to feedback inhibition from the canine ileum and colon. *Am J Physiol*. 1995;269:G945-G952.
25. Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*. 2005;307:1909-1914.
26. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. 2002;418:650-654.
27. Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP et al. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:4382-4389.
28. Dockray GJ. Enteroendocrine cell signalling via the vagus nerve. *Curr Opin Pharmacol*. 2013
29. Kageyama H, Takenoya F, Hirako S et al. Neuronal circuits involving neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus-mediated feeding regulation. *Neuropeptides*. 2012;46:285-289.

30. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev.* 1999;20:876-913.
31. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C et al. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J Clin Invest.* 1996;97:92-103.
32. Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol.* 2013
33. des Rieux A, Pourcelle V, Cani PD, Marchand-Brynaert J, Preat V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:833-844.
34. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* 2008;8:532-539.
35. Tatemoto K, Mutt V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature.* 1980;285:417-418.
36. Tatemoto K, Nakano I, Makk G et al. Isolation and primary structure of human peptide YY. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;157:713-717.
37. Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50:143-150.
38. Karra E, Batterham RL. The role of gut hormones in the regulation of body weight and energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316:120-128.
39. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.* 1982;296:659-660.
40. Conlon JM. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides.* 2002;23:269-278.
41. Eberlein GA, Eysselein VE, Schaeffer M et al. A new molecular form of PYY: structural characterization of human PYY(3-36) and PYY(1-36). *Peptides.* 1989;10:797-803.
42. Grandt D, Schimiczek M, Beglinger C et al. Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regul Pept.* 1994;51:151-159.
43. Kirchner H, Tong J, Tschop MH, Pfluger PT. Ghrelin and PYY in the regulation of energy balance and metabolism: lessons from mouse mutants. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298:E909-E919.

44. Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept.* 2008;145:12-16.
45. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg.* 2006;16:651-658.
46. Bottcher G, Ekblad E, Ekman R, Hakanson R, Sundler F. Peptide YY: a neuropeptide in the gut. Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience.* 1993;55:281-290.
47. Cox HM. Peptide YY: a neuroendocrine neighbor of note. *Peptides.* 2007;28:345-351.
48. Hill BR, De Souza MJ, Williams NI. Characterization of the diurnal rhythm of peptide YY and its association with energy balance parameters in normal-weight premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301:E409-E415.
49. Field BC, Wren AM, Peters V et al. PYY3-36 and oxyntomodulin can be additive in their effect on food intake in overweight and obese humans. *Diabetes.* 2010;59:1635-1639.
50. Ekblad E, Sundler F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides.* 2002;23:251-261.
51. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:137-154.
52. Feltrin KL, Patterson M, Ghatei MA et al. Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides.* 2006;27:1638-1643.
53. McGowan BM, Bloom SR. Peptide YY and appetite control. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:583-588.
54. Stadlbauer U, Arnold M, Weber E, Langhans W. Possible mechanisms of circulating PYY-induced satiation in male rats. *Endocrinology.* 2013;154:193-204.
55. Teubner BJ, Bartness TJ. PYY(3-36) into the arcuate nucleus inhibits food deprivation-induced increases in food hoarding and intake. *Peptides.* 2013;47:20-28.
56. Batterham RL, Ffytche DH, Rosenthal JM et al. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature.* 2007;450:106-109.
57. Abbott CR, Small CJ, Kennedy AR et al. Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake. *Brain Res.* 2005;1043:139-144.

58. Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306:948-953.
59. Batterham RL, Ffytche DH, Rosenthal JM et al. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature.* 2007;450:106-109.
60. Mannon PJ, Kanungo A, Mannon RB, Ludwig KA. Peptide YY/neuropeptide Y Y1 receptor expression in the epithelium and mucosal nerves of the human colon. *Regul Pept.* 1999;83:11-19.
61. Cox HM, Tough IR, Woolston AM et al. Peptide YY is critical for acylethanolamine receptor Gpr119-induced activation of gastrointestinal mucosal responses. *Cell Metab.* 2010;11:532-542.
62. Zac-Varghese S, De Silva A, Bloom SR. Translational studies on PYY as a novel target in obesity. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11:582-585.
63. Cox HM. Endogenous PYY and NPY mediate tonic Y1- and Y2-mediated absorption in human and mouse colon. *Nutrition.* 2008;24:900-906.
64. Adrian TE, Savage AP, Sagor GR et al. Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology.* 1985;89:494-499.
65. Allen JM, Fitzpatrick ML, Yeats JC, Darcy K, Adrian TE, Bloom SR. Effects of peptide YY and neuropeptide Y on gastric emptying in man. *Digestion.* 1984;30:255-262.
66. Moran TH, Smedh U, Kinzig KP, Scott KA, Knipp S, Ladenheim EE. Peptide YY(3-36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R384-R388.
67. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med.* 2003;349:941-948.
68. Tschöp M, Castaneda TR, Joost HG et al. Physiology: does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature.* 2004;430:1 p following 165; discussion 2 p following 165.
69. Pittner RA, Moore CX, Bhavsar SP et al. Effects of PYY[3-36] in rodent models of diabetes and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28:963-971.
70. Vrang N, Madsen AN, Tang-Christensen M, Hansen G, Larsen PJ. PYY(3-36) reduces food intake and body weight and improves insulin sensitivity in rodent models of diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291:R367-R375.
71. van den Hoek AM, Heijboer AC, Corssmit EP et al. PYY3-36 reinforces insulin action on glucose disposal in mice fed a high-fat diet. *Diabetes.* 2004;53:1949-1952.

72. Chelikani PK, Haver AC, Reeve JRJ, Keire DA, Reidelberger RD. Daily, intermittent intravenous infusion of peptide YY(3-36) reduces daily food intake and adiposity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290:R298-R305.
73. Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. Intermittent intraperitoneal infusion of peptide YY(3-36) reduces daily food intake and adiposity in obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R39-R46.
74. Sloth B, Holst JJ, Flint A, Gregersen NT, Astrup A. Effects of PYY1-36 and PYY3-36 on appetite, energy intake, energy expenditure, glucose and fat metabolism in obese and lean subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E1062-E1068.
75. Degen L, Oesch S, Casanova M et al. Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology*. 2005;129:1430-1436.
76. Doucet E, Laviolette M, Imbeault P, Strychar I, Rabasa-Lhoret R, Prud'homme D. Total peptide YY is a correlate of postprandial energy expenditure but not of appetite or energy intake in healthy women. *Metabolism*. 2008;57:1458-1464.
77. Guo Y, Ma L, Enriori PJ et al. Physiological evidence for the involvement of peptide YY in the regulation of energy homeostasis in humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1562-1570.
78. Lancha A, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J. Peripheral signalling involved in energy homeostasis control. *Nutr Res Rev*. 2012;25:223-248.
79. Larsen PJ, Holst JJ. Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): hormone and neurotransmitter. *Regul Pept*. 2005;128:97-107.
80. Habib AM, Richards P, Cairns LS et al. Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology*. 2012;153:3054-3065.
81. Nilsson O, Bilchik AJ, Goldenring JR, Ballantyne GH, Adrian TE, Modlin IM. Distribution and immunocytochemical colocalization of peptide YY and enteroglucagon in endocrine cells of the rabbit colon. *Endocrinology*. 1991;129:139-148.
82. Habib AM, Richards P, Rogers GJ, Reimann F, Gribble FM. Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia*. 2013;56:1413-1416.
83. Toft-Nielsen M, Hvidberg A, Hilsted J, Dige-Petersen H, Holst JJ. No effect of beta-adrenergic blockade on hypoglycaemic effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in normal subjects. *Diabet Med*. 1996;13:544-548.

84. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005;11:90-94.
85. Liou AP, Lu X, Sei Y et al. The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology.* 2011;140:903-912.
86. Karaki S, Mitsui R, Hayashi H et al. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* 2006;324:353-360.
87. Karaki S, Tazoe H, Hayashi H et al. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Histol.* 2008;39:135-142.
88. Lan H, Vassileva G, Corona A et al. GPR119 is required for physiological regulation of glucagon-like peptide-1 secretion but not for metabolic homeostasis. *J Endocrinol.* 2009;201:219-230.
89. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes.* 2008;57:2280-2287.
90. Samuel BS, Shaito A, Motoike T et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:16767-16772.
91. Vinolo MA, Hirabara SM, Curi R. G-protein-coupled receptors as fat sensors. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15:112-116.
92. Tazoe H, Otomo Y, Karaki S et al. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed Res.* 2009;30:149-156.
93. Freeland KR, Wolever TM. Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr.* 2010;103:460-466.
94. Zaibi MS, Stocker CJ, O'Dowd J et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett.* 2010;584:2381-2386.
95. Kimura I, Inoue D, Maeda T et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:8030-8035.
96. Ge H, Li X, Weiszmann J et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology.* 2008;149:4519-4526.

97. Sina C, Gavrilova O, Forster M et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol*. 2009;183:7514-7522.
98. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461:1282-1286.
99. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278:11303-11311.
100. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. 2003;422:173-176.
101. Poitout V. The ins and outs of fatty acids on the pancreatic beta cell. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14:201-203.
102. Mobraten K, Haug TM, Kleiveland CR, Lea T. Omega-3 and omega-6 PUFAs induce the same GPR120-mediated signalling events, but with different kinetics and intensity in Caco-2 cells. *Lipids Health Dis*. 2013;12:101.
103. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*. 2005;1:245-258.
104. Latour MG, Alquier T, Oseid E et al. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes*. 2007;56:1087-1094.
105. Xiong Y, Swaminath G, Cao Q et al. Activation of FFA1 mediates GLP-1 secretion in mice. Evidence for allosterism at FFA1. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;369:119-129.
106. Chu ZL, Carroll C, Alfonso J et al. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology*. 2008;149:2038-2047.
107. Overton HA, Fyfe MC, Reynet C. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S76-S81.
108. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009;58:1058-1066.
109. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010;142:687-698.

110. Ichimura A, Hirasawa A, Hara T, Tsujimoto G. Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;89:82-88.
111. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* 2007;117:13-23.
112. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology.* 1985;89:1070-1077.
113. Helou N, Obeid O, Azar ST, Hwalla N. Variation of postprandial PYY 3-36 response following ingestion of differing macronutrient meals in obese females. *Ann Nutr Metab.* 2008;52:188-195.
114. Lluís F, Fujimura M, Gomez G, Salva JA, Greeley GHJ, Thompson JC. [Cellular localization, half-life, and secretion of peptide YY]. *Rev Esp Fisiol.* 1989;45:377-384.
115. Cahill GFJ, Owen OE. Starvation and survival. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1968;79:13-20.
116. Ziegler MG, Elayan H, Milic M, Sun P, Gharaibeh M. Epinephrine and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14:1-7.
117. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799-806.
118. Taborsky GJJ. The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol.* 2010;4:1338-1344.
119. Katic M, Kahn CR. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:320-343.
120. Soeters MR, Soeters PB. The evolutionary benefit of insulin resistance. *Clin Nutr.* 2012;31:1002-1007.
121. Benedict FG. AN EXPERIMENT ON A FASTING MAN. *Science.* 1912;35:865.
122. Vendelbo MH, Clasen BF, Treebak JT et al. Insulin resistance after a 72-h fast is associated with impaired AS160 phosphorylation and accumulation of lipid and glycogen in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E190-E200.
123. Soeters MR, Sauerwein HP, Dubbelhuis PF et al. Muscle adaptation to short-term fasting in healthy lean humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2900-2903.
124. Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GFJ. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest.* 1967;46:1589-1595.
125. Cahill GFJ. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22.

126. Cherel Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y. Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol B*. 1992;162:305-313.
127. Cherel Y, Charrassin JB, Challet E. Energy and protein requirements for molt in the king penguin *Aptenodytes patagonicus*. *Am J Physiol*. 1994;266:R1182-R1188.
128. Kahn CR, Goldfine AB. Molecular determinants of insulin action. *J Diabetes Complications*. 1993;7:92-105.
129. Tanti JF, Gremeaux T, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J*. 1994;304:17-21.
130. Van Obberghen E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia*. 1994;37 Suppl 2:S125-S134.
131. Medema RH, de Vries-Smits AM, van der Zon GC, Maassen JA, Bos JL. Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras. *Mol Cell Biol*. 1993;13:155-162.
132. Goalstone M, Carel K, Leitner JW, Draznin B. Insulin stimulates the phosphorylation and activity of farnesyltransferase via the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. 1997;138:5119-5124.
133. Haigh RJ, Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. The role of phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Soc Trans*. 1995;23:179S.
134. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118:2992-3002.
135. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002;12:65-71.
136. Aronis KN, Mantzoros CS. A brief history of insulin resistance: from the first insulin radioimmunoassay to selectively targeting protein kinase C pathways. *Metabolism*. 2012;61:445-449.
137. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:85-96.
138. Cornier MA, Bessesen DH, Gurevich I, Leitner JW, Draznin B. Nutritional upregulation of p85alpha expression is an early molecular manifestation of insulin resistance. *Diabetologia*. 2006;49:748-754.

139. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005;87:99-109.
140. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146:4192-4199.
141. Carvalho BM, Saad MJ. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:986734.
142. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12490-12495.
143. Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas; Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. *Arq bras endocrinol metab*. 2006;50:190-197.
144. Vasdev S, Longerich L, Gill V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem*. 2004;37:1-9.
145. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*. 2002;7:335-345.
146. Lee KP, Dey M, Neculai D, Cao C, Dever TE, Sicheri F. Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell*. 2008;132:89-100.
147. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:519-529.
148. Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*. 2004;28:79-92.
149. Shen W, Boyle DW, Liechty EA. Changes in 4E-BP1 and p70S6K phosphorylation in skeletal muscle of the ovine fetus after prolonged maternal fasting: effects of insulin and IGF-I. *Pediatr Res*. 2005;58:833-839.
150. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000;2:326-332.
151. Cullinan SB, Diehl JA. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:317-332.
152. Calton M, Zeng H, Urano F et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415:92-96.

153. Ma Z, Zhang S, Turk J, Ramanadham S. Stimulation of insulin secretion and associated nuclear accumulation of iPLA(2)beta in INS-1 insulinoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E820-E833.
154. Boden G, Duan X, Homko C et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes.* 2008;57:2438-2444.
155. Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat.* 2004;28:51-65.
156. Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev.* 2008;29:317-333.
157. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:131-144.
158. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E476-E482.
159. Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E386-E394.
160. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:1986-1998.
161. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One.* 2012;7:e47713.
162. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol.* 2011;9:e1001212.
163. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3:213-223.
164. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 2009;1:6ra14.

165. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57:1470-1481.
166. Cani PD, Amar J, Iglesias MA et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761-1772.
167. Kemp DM. Does chronic low-grade endotoxemia define susceptibility of obese humans to insulin resistance via dietary effects on gut microbiota? *Adipocyte*. 2013;2:188-190.
168. Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci*. 1988;11:107-111.
169. Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661-671.
170. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995;269:546-549.
171. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte DJ. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 1979;282:503-505.
172. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840-846.
173. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90:859-904.
174. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010;140:859-870.
175. Chorny A, Puga I, Cerutti A. Innate signaling networks in mucosal IgA class switching. *Adv Immunol*. 2010;107:31-69.
176. Raybould HE. Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. *Auton Neurosci*. 2010;153:41-46.
177. Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology*. 2008;123:197-208.
178. Ji Y, Sakata Y, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14:315-321.

179. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860-867.
180. Xu H, Barnes GT, Yang Q et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821-1830.
181. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11:191-198.
182. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007;86:1286-1292.
183. Fujiyama Y, Hokari R, Miura S et al. Butter feeding enhances TNF-alpha production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1838-1845.
184. Hara Y, Miura S, Komoto S et al. Exposure to fatty acids modulates interferon production by intraepithelial lymphocytes. *Immunol Lett*. 2003;86:139-148.
185. Yoshida H, Miura S, Kishikawa H et al. Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr*. 2001;131:2943-2950.
186. Ding S, Chi MM, Scull BP et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*. 2010;5:e12191.
187. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G440-G448.
188. Duca FA, Swartz TD, Sakar Y, Covasa M. Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:375-381.
189. Duca FA, Sakar Y, Covasa M. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. *J Nutr Biochem*. 2013;24:1663-1677.
190. Li J, Ma W, Wang S. Slower gastric emptying in high-fat diet induced obese rats is associated with attenuated plasma ghrelin and elevated plasma leptin and cholecystokinin concentrations. *Regul Pept*. 2011;171:53-57.
191. Hyland NP, Pittman QJ, Sharkey KA. Peptide YY containing enteroendocrine cells and peripheral tissue sensitivity to PYY and PYY(3-36) are maintained in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Peptides*. 2007;28:1185-1190.

192. le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ et al. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology*. 2006;147:3-8.
193. Little TJ, Feltrin KL, Horowitz M et al. A high-fat diet raises fasting plasma CCK but does not affect upper gut motility, PYY, and ghrelin, or energy intake during CCK-8 infusion in lean men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R45-R51.
194. Chandarana K, Gelegen C, Karra E et al. Diet and gastrointestinal bypass-induced weight loss: the roles of ghrelin and peptide YY. *Diabetes*. 2011;60:810-818.
195. Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Sigalet DL, Berthoud HR. Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Endocrinology*. 2010;151:1588-1597.
196. Boey D, Lin S, Karl T et al. Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity. *Diabetologia*. 2006;49:1360-1370.
197. Zhao K, Ao Y, Harper RM, Go VL, Yang H. Food-intake dysregulation in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats: hypothesized role of dysfunctional brainstem thyrotropin-releasing hormone and impaired vagal output. *Neuroscience*. 2013;247:43-54.
198. Boey D, Heilbronn L, Sainsbury A et al. Low serum PYY is linked to insulin resistance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Neuropeptides*. 2006;40:317-324.
199. Ukkola OH, Puurunen VP, Piira OP et al. High serum fasting peptide YY (3-36) is associated with obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes. *Regul Pept*. 2011;170:38-42.

5. ARTIGOS

5.1 LOST OF PYY INTESTINAL RESPONSE AFTER AN ACUTE SATURATED FATTY ACIDS OVERLOAD IN HIGH-FAT DIET-INDUCED INSULIN RESISTANT WISTAR RATS

**Antunes, LC¹ Elkfury, JL² Jornada, MN¹ Foletto, KC¹ Tatsch, E^{3,4} Bocchi, GV^{3,5}
Moresco, RN^{3,4,5} Bertoluci, MC^{1,6}**

¹Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ²Nutrition student, School of Nutrition, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ³Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ⁵Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ⁶Professor from Internal Medicine Division, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). From the Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Marcello Casaccia Bertoluci
Internal Medicine Service of HCPA, UFRGS
2350 Ramiro Barcelos St.
Zip Code 90035-903. Porto Alegre, RS, Brazil
Phone/Fax: + 55 51 3359 8152
E-mail: mbertoluci@uol.com.br

Abstract

Introduction: PYY is a gut peptide released by L-cells from the intestine after a meal.

Objective: The present study aimed to evaluate the effect of acute overloads of saturated fatty acids (SAT) and monounsaturated fatty acids (MUFA) on PYY release in normal and diet induced insulin resistant wistar rats. **Methods:** a nineteen weeks experiment was conducted with 30 Wistar rats that were allocated into two groups: high fat diet (HFD) (n=15) with diet composition of 55% of lard and 45% standard chow and control diet (CD) (n=15). Both groups received water and food *ad libitum*. Later a cross-over experiment was conducted to evaluate PYY secretory response 60 minutes after two different lipid overloads (SAT-lard; MUFA-olive oil) and water (CONT), adjusted by rat weight, all isovolumetric and lipids were isocaloric, randomly administered in different days. Mean differences were analyzed by repeated measures ANOVA and association by simple linear regression. **Results:** Both MUFA and SAT overloads significantly increased PYY release in the CD in comparison with their baselines: MUFA-Baseline 2.18 (\pm 0.24) vs. MUFA-60min 2.30 (\pm 0.26) pg/ml and SAT-baseline 2.21 (\pm 0.25) pg/ml vs. SAT-60min 2.29 (\pm 0.22) pg/ml ($p= 0.019$), however without difference between MUFA and SAT ($p= 0.314$). On the other hand, HFD showed a significantly decreased PYY release to SAT overload: SAT-baseline 2.16 (\pm 0.21) pg/ml vs. SAT-60min 2.11 (\pm 0.30) pg/ml ($p=0.01$), while MUFA overload was able to keep the increase on PYY release: MUFA-baseline 2.15 pg/ml vs. MUFA-60min 2.22 (\pm 0.22) pg/ml ($p= 0.019$). Water overload (CONT) also reduced PYY release in comparison with baseline in both CD ($p= 0.0091$) and HFD ($p=0.0091$), without difference between them ($p= 0.7433$). **Conclusion:** MUFA and SAT overloads increase PYY release after 60 minutes in normal Wistar rats. However, when became high fat diet induced insulin resistant the SAT overload loses the capacity to stimulate PYY release, while MUFA response keeps preserved. This paradoxal finding to saturated fatty acids could indicate a cellular damage caused by insulin resistance in the intestinal tissue which compromises PYY secretory apparatus in response to this nutrient. Studies in the intestinal tissue must be conducted in order to identify possible factors involved and its implications in satiety signals PYY mediated in insulin resistance individuals.

KEYWORDS: PYY, saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, insulin resistance

INTRODUCTION

Insulin resistance (IR) is major defined as progressive insulin sensitiveness impairment followed by hiperinsulinemia in the attempt to reduce glucose levels culminating in hyperglycemia and thus impaired glucose tolerance (IGT) (1). IR is a life-long condition intrinsically associated with augmented abdominal adiposity, overfeeding, type 2 diabetes and cardiovascular disease (2).

Gastrointestinal peptides have been recently associated in hunger and satiety signaling, however the link between these peptides and insulin-resistance has not been completely clarified yet, most of all in the context without obesity and/or type 2 diabetes. Among these, peptide YY (PYY) should receive special attention due its major anorexigenic properties through actions in the arcuate nucleus (ARC) (3). PYY is mainly secreted from enteroendocrine L-cells at the distal intestine in response to food intake. It is rapidly metabolized to its active form, PYY₍₃₋₃₆₎, through the action of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) (4). It is well established that PYY₍₃₋₃₆₎ is able to inhibit food intake in both humans (5) and rodents (6) and its fasting levels have been shown to be reduced in human obesity suggesting that it is related to adiposity (7). The association of PYY and insulin-resistance has been poorly studied outside the context of obesity and hyperglycemia.

Studies have shown that among nutrients, lipids are more suitable to stimulate PYY secretory response (4). Previous studies from our group verified that PYY secretory response, after an acute lipid overload, was higher with monounsaturated fatty acids than control (water) but did not differ from saturated fatty acids in normal wistar rats (data unpublished).

A recent study has shown that morbidly obese individuals who presents either insulin resistance or abnormal glucose metabolism present impaired PYY response to fat load (8). The aim of this study was to identify whether intestinal PYY secretory response behaves in a model of high-fat diet-induced insulin resistance in Wistar rats and if it is dependent to monounsaturated and/or saturated fatty acids.

METHODS

Animals

A total of 30 male Wistar rats, weighing 200-300g, constituted sample. All experimental procedures were performed in accordance with institutional animal welfare guidelines and approved by the Ethics Committee in Animal Research at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Experiment 1

At the baseline, after an overnight fasting, animals were weighted and blood from the tail was collected to verify their capillary glucose. Then, an intraperitoneal insulin tolerance test was performed followed by 7 glucose samples collected using test stripes. Commercially insulin (Humulin, Eli Lilly, São Paulo, Brazil) at dose of 0,5UI/kg was infused and capillary glucose at time 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes was monitored. Then, area under curve (AUC) was calculated.

In order to induce insulin resistance, we conducted an experimental study in parallel in which animals were randomized by body weight and ITT area under curve (AUC) and then allocated into two groups: control diet (CD) (n=15) who were fed with standard chow, and high fat diet (HFD) (n=15) which diet was composed by 45% of standard chow and 55% of lard.

The animals were housed in pairs in a temperature controlled room on a 12 h light–dark cycle with food and water *ad libitum*. After 19 weeks, we performed another ITT test above described and results were compared. We also performed an OGTT test (oral glucose tolerance test), where capillary glucose was measured at basal, 30, 60, 90 and 120 minutes after 2g/kg glucose solution was administered by gavage.

Experiment 2

After confirming insulin resistance at 19th week, a crossover experiment was conducted to verify the secretory response capacity of PYY at baseline and 60 minutes after acute oral lipids overloads.

Overloads

Each week after overnight fasting, animals suffered gavage of one of the three following overloads: olive oil (MUFA overload), lard (SAT overload) and water (CONT

overload). The caloric overloads were isovolumetric and isocaloric, while negative control was obviously only isovolumetric, all adjusted for body weight.

Sample collection

After 12-hour overnight fasting, blood was collected from the retro-orbital artery in a glass cannula directly to an eppendorf tube. Then it was immediately placed in an ice-bath and centrifuged at 1000xg during 10 minutes at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Serum was stored at – 80°C until the assay was performed.

Hormone and biochemistry measurements

PYY₍₃₋₃₆₎, and Insulin were determined by Luminex® using kits purchased from Linco Research® (Millipore®, Billerica, MA). Respective limits of detection for PYY and insulin were: 16 and 28 pg/ml. Capillary blood collected from the tail was used to determine blood glucose values by glucometer (Medisense® Optium Xceed Meter).

Oxidative stress analysis

Jejune was excised, weighed and immediately frozen at -80 °C. Tissue homogenization was conducted and then the following oxidative stress biomarkers were evaluated: nitric oxide (Nox) (9), total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) (10), and ferric response ability of plasma (FRAP) (11). All measures were performed in Cobas Mira® equipment (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistics

Areas under curve (AUC) of ITT and OGTT were obtained by NCSS 9 software. Non-parametric Mann-Whitney test was performed to verify differences between AUC ITT at baseline and 19 weeks after first phase protocol. Normal distribution data differences between groups were determined using the Student t-Test. Some asymmetric data were logarithmic transformed and thus variables were presented as mean and standard deviation. Repeated measures ANOVA was used to compared PYY secretory response. For the study of correlations, we used simple linear regression for all variables. SPSS software- version 20 was used. A *p* value of 0.05 was the criterion for significance.

RESULTS

High fat diet causes insulin resistance after 19 weeks

Table 1 summarizes sample characteristics at baseline and after 19 weeks. AUC ITT, Homa-IR, insulin and AUC OGTT significantly differed between CD and HFD, after 19 weeks experiment, respectively: (6052.1 (6011.6 – 6746.79) vs. 8122.5 (7353.5 – 8306.5); $p= 0.003$), (4.34 (± 2.09) vs. 6.24 (± 3.24); $p= 0.030$), (652.9 (± 294.4) vs. 928.6 (± 449.3); $p= 0.015$) and (12782 (± 1056.6) vs. 14172.2 (± 1303.7); $p= 0.003$). There were no differences between CD and HFD groups regarding fasting glucose and PYY levels and body weight: (94.3 (± 7.8) vs. 94.4 (± 5.8); $p= 0.944$), (170.8 (± 83.2) vs. 166.6 (± 105.7); $p= 0.760$) and (493.6 (± 34.1) vs. 506.7 (± 46.1); $p= 0.350$).

Hormonal responses after lipid overloads

PYY secretory response

CD showed in both, MUFA and SAT overloads, an increase on PYY release in comparison with their respective baseline values: MUFA-baseline 2.18 (± 0.24) pg/ml vs. MUFA-60min 2.30 (± 0.26) pg/ml and SAT-baseline 2.21 (± 0.25) pg/ml vs. SAT-60min 2.29 (± 0.22) pg/ml (ANOVA multiple entry; $p= 0.019$). However, lipids overloads did not differ from each other (ANOVA multiple entry; $p= 0.3136$). On the other hand, HFD showed a significant reduction on PYY response with the SAT overload: (SAT-baseline 2.16 (± 0.21) pg/ml vs. SAT-60min 2.11 (± 0.30) pg/ml) (ANOVA intra-groups; $p= 0.0100$), while MUFA overload was able to sustain the increase on PYY secretory response: (MUFA-baseline 2.15 (± 0.23) pg/ml vs. MUFA-60min 2.22 (± 0.22) pg/ml) (ANOVA multiple entry; $p= 0.019$). The administration of water CONT overload also provided a reduction on PYY response in comparison with baseline in both CD (CONT-baseline 2.21 (± 0.19) pg/ml vs. CONT-60min 2.13 (± 0.19) pg/ml) (ANOVA multiple entry; $p= 0.0091$) and HFD (CONT-baseline 2.17 (± 0.21) pg/ml vs. CONT-60min 2.11 (± 0.22) pg/ml) (ANOVA multiple entry; $p= 0.0091$). However, there was no significant difference between groups (ANOVA intra-groups; $p= 0.7433$). (Figure 1 A, B and C).

Insulin secretory response

CD showed significant difference in insulin release after 60 minutes of MUFA overload: MUFA-baseline 2.74 (± 0.26) pg/ml vs. MUFA-60min 2.86 (± 0.20) pg/ml

(ANOVA multiple entry; $p= 0.0471$). SAT overload also provided significant difference in insulin secretory response: SAT-baseline 2.61 (± 0.21) pg/ml vs. SAT-60min 2.92 (± 0.18) pg/ml (ANOVA multiple entry; $p= 0.0001$). HFD reached significantly increase in insulin response only with MUFA overload: MUFA-baseline 2.95 (± 0.18) pg/ml MUFA-60min 2.97 (± 0.16) pg/ml ($p= 0.0471$). However, when exposed to SAT overload, insulin secretory response did not increase significantly: SAT-baseline 2.90 (± 0.23) pg/ml SAT-60min 2.91 (± 0.16) pg/ml ($p= 0.3546$). There were no differences between time when administered CONT overload, only between groups ($p= 0.0313$) (Figure 2 A, B and C).

Association between insulin resistance and PYY fatty acid response

The peak of PYY was negatively correlated to fasting mean insulin and this association was significant for SAT overload ($r=-0,52$; $p=0,0031$), while for the MUFA overload no association was observed ($r=0.018$; $p=0.9242$) (Figure 3 A and B).

Association between beneficial properties of MUFA on PYY secretory load and fasting insulin levels

It was found a significant association between secretory load and insulin levels for MUFA overload ($r= -0.520$; $p= 0.003$), while in SAT overload it was not verified any correlation ($r= -0.141$; $p= 0.450$) (Figure 4 A and B).

PYY secretory load is associated with hepatic insulin resistance

In order to verify whether type of insulin resistance and PYY secretory response were associated, we correlated this variable with to different measures of insulin resistance, Homa-IR and AUC ITT, respectively: ($r= -0.464$; $p= 0.010$) and ($r= 0.97$; $p= 0.611$) (Figure 5 A and B).

High fat diet promotes oxidative stress in jejunum

Regarding oxidative stress biomarkers, there was found significant difference in TOS levels (Figure. 6), while TAC, NOx and FRAP did not differ between CD and HFD groups, respectively: (9.9 (6.9 - 9.9) vs. 18.1 (14.1 - 21.6); $p= 0.0203$), (0.41 (0.35 - 0.50) vs. 0.46 (0.40 - 0.62); $p= 0.183$), (80.0 (70.5 - 92.7) vs. 79.5 (76.7 - 86.0); $p= 1.000$) and (489.6 (299.1 - 726.1) vs. 680.8 (536.1 - 735.8); $p= 0.183$) (Table 2).

Secondary outcomes

In order to verify secondary outcomes, we established cut-offs values for insulin resistance according to the following medians of Homa-IR > 3 , which were categorized into HOMA Not-Insulin Resistant or HOMA Insulin Resistant and AUC ITT > 7252 , where groups were divided as ITT Non-Insulin Resistant (those under the median) or ITT Insulin Resistant (those above the median). According to homa-IR, HOMA Insulin Resistant showed greater level of TOS ($19.75 (\pm 11.08)$ vs. $11.37 (\pm 5.09)$; $p= 0.0483$), while groups defined by AUC ITT did not present significant difference between them: ($17.09 (\pm 5.61)$ vs. $17.08 (\pm 14.5)$; $p= 0.1783$).

DISCUSSION

In the present study we developed a diet-induced low-grade inflammation and insulin resistance model in Wistar rats in order to verify PYY secretory response concerning two different lipids overloads. We were able to demonstrate that high-fat diet-induced insulin resistant animals loose PYY secretory response after an acute saturated fatty acid overload, while monounsaturated fatty acids sustained a normalized PYY release. Additionally, we provided evidence that only saturated fatty acids was negatively associated with insulin levels, indicating that the greater insulin resistance state, the lower the secretory response of PYY will be available.

PYY presents a greater secretory response to fat rather than others macronutrients as previous shown (12). In the last ten years the composition of dietary fat within a high-fat (HF) meal begin to be studied (13 - 17). Nevertheless, it is still scarce in the literature studies, which intend to evaluate different dietetic lipids based on subsequent gut peptides responses.

Regarding fasting PYY levels, we did not observe difference between HFD and CD rats and this outcome was also noticed in previous studies with high-fat fed diet-induced obesity and diet-resistant animals (18 - 20), suggesting that PYY fasting levels is not modified by obesity, high-fat diet and insulin resistance. This finding corroborates with the idea that only PYY ability to nutrient response is impaired during obesity and insulin resistance induced by high-fat diet course. Transposing this finding to human studies, evidence suggest that lean, overweight and obese individuals present no difference among PYY baseline levels (21 - 23). However, this result is not homogenous (24 -26).

In this experiment we were able to demonstrate that insulin resistance rats loose secretory PYY response only for saturated fatty acids while monounsaturated remains preserved. The blunted PYY response was described in obese high fat fed rats, which received PYY₃₋₃₆ infusion (26). Besides, intrajejunal infusion of linoleic acid (LA) enhances PYY release in male Sprague-Dawley rats (27), corroborating to our findings that the chain length seems to contribute to PYY secretory response. Additionally, in our knowledge, this is the first study demonstrating that the promotion of insulin resistance and/or low grade inflammation by high fat diet diet provokes a lost in PYY response specific to saturated fatty acids.

On the other hand, in humans, results are controversial. In some, PYY secretory response did not differ from ileal infusion of distinct fats saturations in lean (28, 29) and

overweight individuals independently of length and site of small intestine (29), while a very small experiment in 8 healthy adults has shown that saturated fatty acids-rich meal improve PYY release rather than monounsaturated-rich meal in combination with physical activity (30). In obese subjects, it has been postulated that postprandial PYY levels are lower than in lean individuals (24 - 26), but these results were not widely replicated (22, 23). Yet, in obese and overweight subjects, it was shown a significantly increase after a high-fat load (31), but unfortunately as researchers did not compare with lean individuals there is no evidence that PYY secretory response presents the same proportion of increase despite obesity condition. Another study comparing PUFA-rich, MUFA-rich and SFA-rich meals impact on PYY release of 15 healthy women has revealed that PUFA and SFA improved PYY release in comparison to MUFA (32).

In this experiment we were able to demonstrate a significantly inverse correlation involving the peak of PYY, through delta PYY variable, to insulin resistance only for SAT overload. This outcome suggests the lost of PYY response to saturated fatty acids, indicating that higher levels of fasting insulin present lesser peak of PYY after a saturated fatty acids overload, while monounsaturated fatty acids overload keeps it preserved, supported by the absence of this correlation. Additionally, reinforcing this finding, in order to verify whether monounsaturated fatty acids can provide benefice on the secretory load of PYY, represented by AUC PYY variable, we correlated it with fasting insulin levels. We found an inverse significantly association between AUC PYY and insulin level only for monounsaturated fatty acids overload, indicating that MUFA promotes a higher secretory load, which could promote more satiety, once it is capable of sustain PYY levels more efficiently.

In the present study, PYY levels in insulin resistant rats were significantly influenced by monounsaturated fatty acids, which led us to hypothesize that the sustain of it could be attributed to a preserved mechanism of long chain fatty acids G-protein coupled receptors, such as GPR 40 and/or GPR120 in the enteroendocrine L-cells. It has been demonstrated that high fat fed rats present reduced protein expression of intestinal PYY (33, 34), where authors sustain that an impaired PYY release may be due to L-cells hypoplasia (35). The current mechanism by which a selective loss of PYY secretory integrity occurs is still unknown. It has been proposed that the reduction on PYY levels is more a result than a consequence of obesity, which could endorse potential gain weight and reduce intestinal lipid sensors (34).

This paradoxical finding to saturated fatty acids could indicate a cellular damage caused by insulin resistance in the intestinal tissue which compromises PYY secretory apparatus in response to this nutrient.

It is likely that may occur alteration in the short chain fatty acids receptors GPR41 and/or GPR43, secondary to low-grade inflammation promoted by HFD, implicating on the reduction of PYY release faculty in the presence of short chain fatty acids. Until now, there is any study been conducted with the purpose of evaluate the reduction on intestinal signaling and activation of these receptors. GPR41 and GPR43 binding to short chain fatty acids where the first couples to Gai, a route that inhibits adenil-ciclase, which reduces AMPc, while the second one can couple to Gai and Gaq, which activations promotes increase on PKC and intracellular Ca^{+2} , culminating in the release of gut peptides involved in satiety signaling (36 - 38).

During the development of this experiment we took care in create an insulin resistance diet induced model without an obesity phenotype. As expected, we did not find differences between groups regarding body weight, demonstrating that a subclinical inflammation promoted by high-saturated fatty acids diet and not the weight gain *per se* can promote a lost on the ability of fatty acids receptors localized into enteroendocrine cells to identify short chain fatty acids (e.g. saturated fatty acids) independently of adiposity.

We also provided evidence that the inflammatory response, evoked by diet induced insulin resistance, promotes increase of stress oxidative biomarkers in liver and intestine tissues, corroborating with the hypothesis of the impact of a systemic low-grade inflammation.

This study has several limitations; the first one is that it was conducted in an experimental level and thus, impossible to be externalized to human samples. On the other hand, it promotes a new gap of future clinical researches in the attempt to understand the gut peptides mechanisms during the course of insulin resistance despite the obesity and diabetes phenotypes. The second one that we did not performed satiety tests after lipids overloads, which led us to hypothesize a possible reduction on satiety by reduction of PYY secretory response.

Once the lost of PYY secretory response may be occasioned due alterations in the signaling of nutrient receptors, it becomes a high relevance issue of study. Thus, more studies are needed in the intestinal tissue in order to identify possible factors involved and its implications in satiety signals PYY mediated in insulin resistance individuals.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa-FIPE/HCPA, Porto Alegre/Brazil. The authors also thank Laboratório Nobel, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Graduate Research Group (GPPG), Animal Experimentation Unity (UEA/HCPA), Marta Cioato and Fabiola Meyer .

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

Contributor statements: Antunes LC designed the study, wrote the protocol, reviewed studies, drafted the article, conducted the statistical analysis and interpreted the data. Jornada MN collected data. Foletto KC collected data. Tatsch E and Bocchi GV conducted oxidative stress analysis; Moresco RN interpreted the data and coordinate laboratory analysis. Bertoluci MC participated in study design, wrote the protocol, interpreted the data, drafted the article and was responsible for the final approval of this version.

REFERENCES:

1. Aronis KN, Mantzoros CS. A brief history of insulin resistance: from the first insulin radioimmunoassay to selectively targeting protein kinase C pathways. *Metabolism*. 2012;61:445-449.
2. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.
3. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. 2002;418:650-654.
4. Ballantyne GH, Farkas D, Laker S, Wasielewski A. Short-term changes in insulin resistance following weight loss surgery for morbid obesity: laparoscopic adjustable gastric banding versus laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2006;16:1189-1197.
5. Degen L, Oesch S, Casanova M et al. Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology*. 2005;129:1430-1436.
6. Parkinson JR, Dhillo WS, Small CJ et al. PYY3-36 injection in mice produces an acute anorexigenic effect followed by a delayed orexigenic effect not observed with other anorexigenic gut hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294:E698-E708.
7. Field BC, Wren AM, Peters V et al. PYY3-36 and oxyntomodulin can be additive in their effect on food intake in overweight and obese humans. *Diabetes*. 2010;59:1635-1639.
8. Fernandez-Garcia JC, Murri M, Coin-Araguez L, Alcaide J, El Bekay R, Tinahones FJ. GLP-1 and peptide YY secretory response after fat load is impaired by insulin resistance, impaired fasting glucose and type 2 diabetes in morbidly obese subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013
9. Tatsch E, Bochi GV, Pereira Rda S et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*. 2011;44:348-350.
10. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004;37:112-119.
11. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-76.

12. Lomenick JP, Melguizo MS, Mitchell SL, Summar ML, Anderson JW. Effects of meals high in carbohydrate, protein, and fat on ghrelin and peptide YY secretion in prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4463-4471.
13. Flint A, Helt B, Raben A, Toubro S, Astrup A. Effects of different dietary fat types on postprandial appetite and energy expenditure. *Obes Res.* 2003;11:1449-1455.
14. Lawton CL, Delargy HJ, Brockman J, Smith FC, Blundell JE. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *Br J Nutr.* 2000;83:473-482.
15. MacIntosh CG, Holt SH, Brand-Miller JC. The degree of fat saturation does not alter glycemic, insulinemic or satiety responses to a starchy staple in healthy men. *J Nutr.* 2003;133:2577-2580.
16. Strik CM, Lithander FE, McGill AT, MacGibbon AK, McArdle BH, Poppitt SD. No evidence of differential effects of SFA, MUFA or PUFA on post-ingestive satiety and energy intake: a randomised trial of fatty acid saturation. *Nutr J.* 2010;9:24.
17. Maljaars PW, Symersky T, Kee BC, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA. Effect of ileal fat perfusion on satiety and hormone release in healthy volunteers. *Int J Obes (Lond).* 2008;32:1633-1639.
18. Hyland NP, Pittman QJ, Sharkey KA. Peptide YY containing enteroendocrine cells and peripheral tissue sensitivity to PYY and PYY(3-36) are maintained in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Peptides.* 2007;28:1185-1190.
19. Li J, Ma W, Wang S. Slower gastric emptying in high-fat diet induced obese rats is associated with attenuated plasma ghrelin and elevated plasma leptin and cholecystokinin concentrations. *Regul Pept.* 2011;171:53-57.
20. Huang XF, Yu Y, Li Y, Tim S, Deng C, Wang Q. Ventromedial hypothalamic NPY Y2 receptor in the maintenance of body weight in diet-induced obesity in mice. *Neurochem Res.* 2008;33:1881-1888.
21. Cahill F, Shea JL, Randell E, Vasdev S, Sun G. Serum peptide YY in response to short-term overfeeding in young men. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:741-747.
22. Stock S, Lechner P, Wong AC et al. Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2161-2168.
23. Kim BJ, Carlson OD, Jang HJ, Elahi D, Berry C, Egan JM. Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6665-6671.

24. Korner J, Inabnet W, Conwell IM et al. Differential effects of gastric bypass and banding on circulating gut hormone and leptin levels. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1553-1561.
25. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*. 2003;349:941-948.
26. le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ et al. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology*. 2006;147:3-8.
27. Dailey MJ, Tamashiro KL, Terrillion CE, Moran TH. Nutrient specific feeding and endocrine effects of jejunal infusions. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:904-910.
28. Maljaars J, Romeyn EA, Haddeman E, Peters HP, Masclee AA. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:1019-1024.
29. Maljaars PW, Peters HP, Kodde A et al. Length and site of the small intestine exposed to fat influences hunger and food intake. *Br J Nutr*. 2011;106:1609-1615.
30. Cooper JA, Watras AC, Paton CM, Wegner FH, Adams AK, Schoeller DA. Impact of exercise and dietary fatty acid composition from a high-fat diet on markers of hunger and satiety. *Appetite*. 2011;56:171-178.
31. Gibbons C, Caudwell P, Finlayson G et al. Comparison of postprandial profiles of ghrelin, active GLP-1, and total PYY to meals varying in fat and carbohydrate and their association with hunger and the phases of satiety. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E847-E855.
32. Kozimor A, Chang H, Cooper JA. Effects of dietary fatty acid composition from a high fat meal on satiety. *Appetite*. 2013;69:39-45.
33. Duca FA, Swartz TD, Sakar Y, Covasa M. Decreased intestinal nutrient response in diet-induced obese rats: role of gut peptides and nutrient receptors. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:375-381.
34. Duca FA, Sakar Y, Covasa M. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. *J Nutr Biochem*. 2013;24:1663-1677.
35. Duca FA, Sakar Y, Covasa M. Combination of obesity and high-fat feeding diminishes sensitivity to GLP-1R agonist exendin-4. *Diabetes*. 2013;62:2410-2415.
36. Freeland KR, Wolever TM. Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr*. 2010;103:460-466.

37. Karaki S, Tazoe H, Hayashi H et al. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Histol.* 2008;39:135-142.
38. Zaibi MS, Stocker CJ, O'Dowd J et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett.* 2010;584:2381-2386.

Table 1 summarizes sample characteristics*

	Control Diet (n=15)		HF Diet (n=15)		P value**	
	baseline	19 weeks	baseline	19 weeks	baseline	19 weeks
Body weight (g)	392.9 (±31.7)	493.6 (±34.1)	385.2 (±31.9)	506.7 (±46.1)	0.475	0.350
AUC ITT	8786.2 (8031.1- 9787)	6052.1 (6011.6 – 6746.79)	7732.5 (7331.2 – 8560.5)	8122.5 (7353.5 – 8306.5)	0.314	0.003
Fasting Glucose (mg/dL)	83.2 (± 9.2)	94.3 (±7.8)	80.6 (± 5.6)	94.4 (±5.8)	0.300	0.944
Glucose (120min)	-	113 (±12)	-	131 (±14)	-	< 0.001
AUC OGTT	-	12782 (±1056.6)	-	14172.2 (±1303.7)	-	0.003
Fasting Insulin (pmol/L)	-	652.9 (±294.4)	-	928.6 (±449.3)	-	0.015
Homa-IR	-	4.34 (±2.09)	-	6.24 (±3.24)	-	0.030
PYY (pmol/L)	-	170.8 (±83.2)	-	166.6 (±105.7)	-	0.760

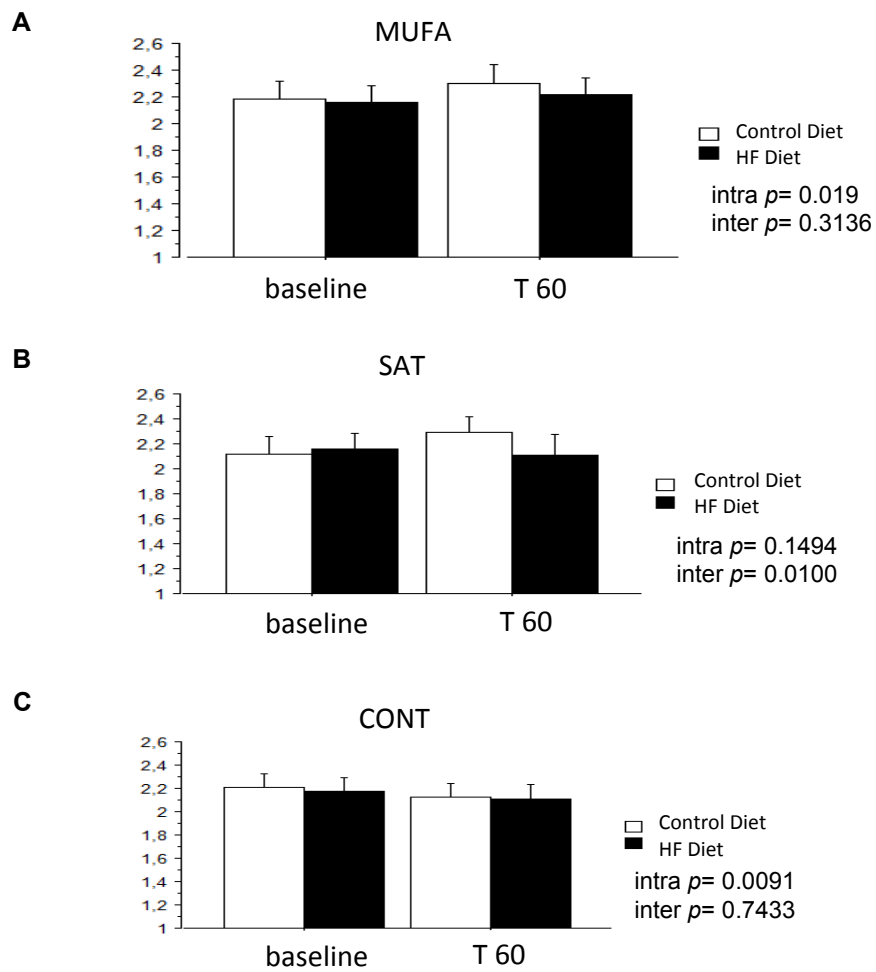
*AUC= area under curve, ITT= insulin tolerance test, OGTT= oral glucose tolerance test, Homa-IR= homeostasis model assessment of insulin resistance. Student T-test was performed to body weight, AUC OGTT, glucose, log insulin, log Homa-IR and log PYY, data presented as mean ±SD. Non-parametric Mann-Whitney test to AUC ITT presented in median and confidence interval. **p value between groups.

Table 2 Oxidative stress biomarkers in jejune samples after 19 weeks high fat diet induced insulin resistance*

	Control Diet (n=8)	HF Diet (n=14)	<i>p</i>
NOx (μmol/g protein)	80.0 (70.5- 92.7)	79.5 (76.7 - 86.0)	1.000
FRAP (μmol/g protein)	489.6 (299.1 -726.1)	680.8 (536.1 - 735.8)	0.183
TAC (mmol Trolox /g protein)	0.41 (0.35 – 0.50)	0.46 (0.40 – 0.62)	0.183
TOS (μmol H₂O₂/g protein)	9.9 (6.9 - 9.9)	18.1 (14.1 - 21.6)	0.0203

*NOx= nitric oxide, FRAP= ferric reducing ability of plasma, TAC= total antioxidant capacity, TOS= total oxidant status. Mann-Whitney was performed to detect difference between groups. Results are shown in median and percentiles 25th and 75th.

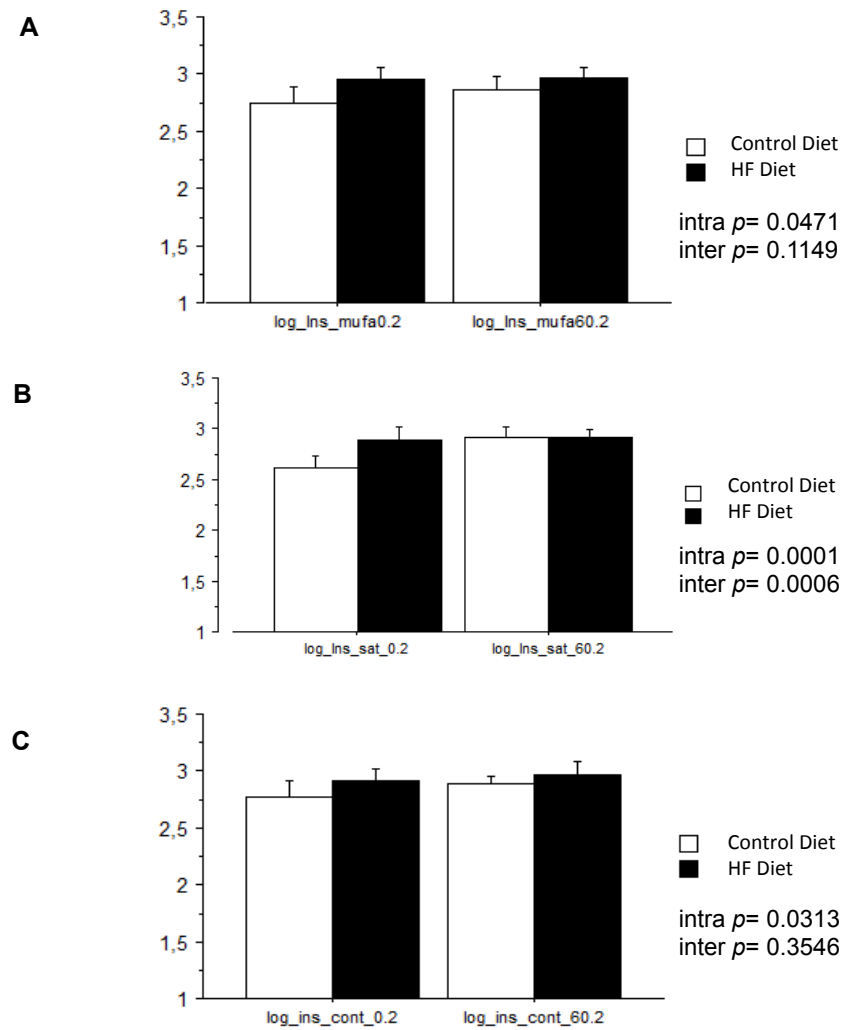
Figure 1 **The effect of lipid overload on PYY release***



*MUFA= monounsaturated fatty acids, SAT= saturated fatty acids, CONT= water. Repeated measures ANOVA. Comparison between intra and inter groups. Significance level $p < 0.05$.

Figure 2

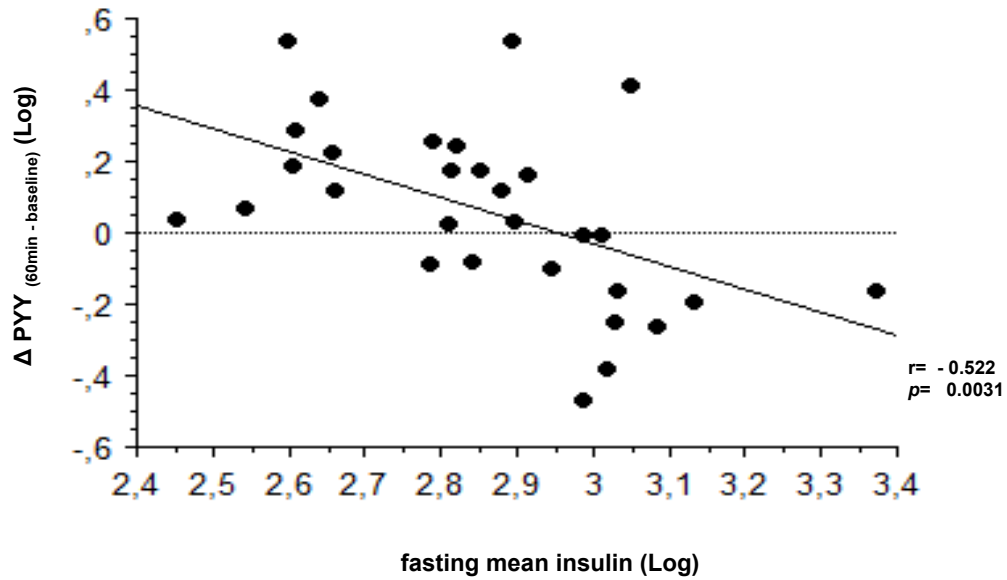
The effect of lipid overload on Insulin release.



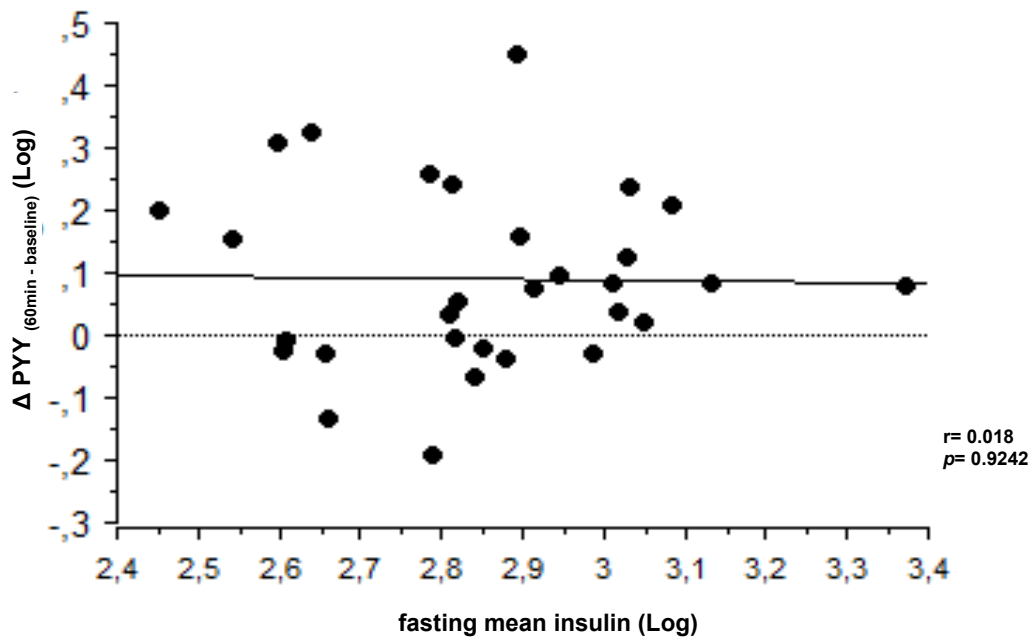
*MUFA= monounsaturated fatty acids, SAT= saturated fatty acids, CONT= water. Repeated measures ANOVA. Comparison between intra and inter groups. Significance level $p < 0.05$.

Figure 3 PYY response and fasting insulin levels according to lipid overload*

A SAT overload



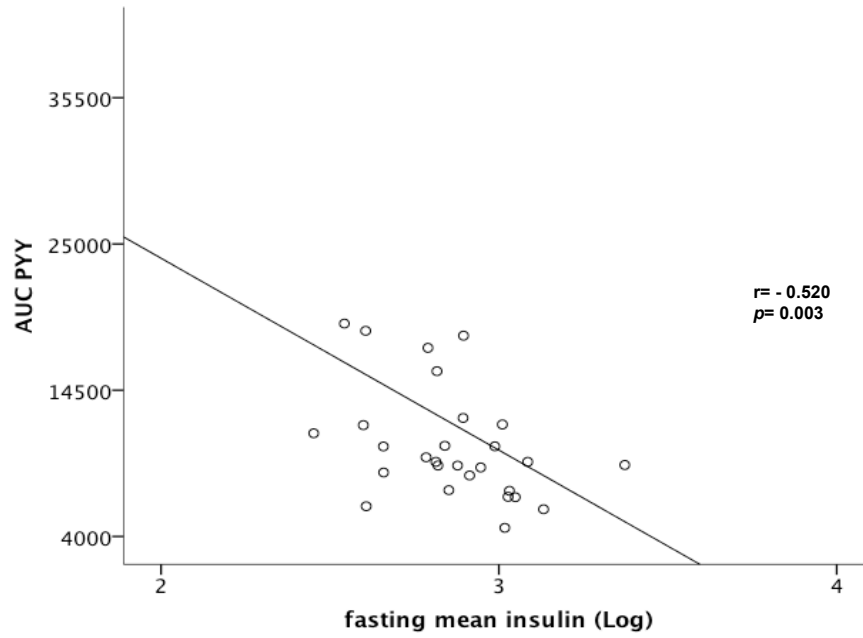
B MUFA overload



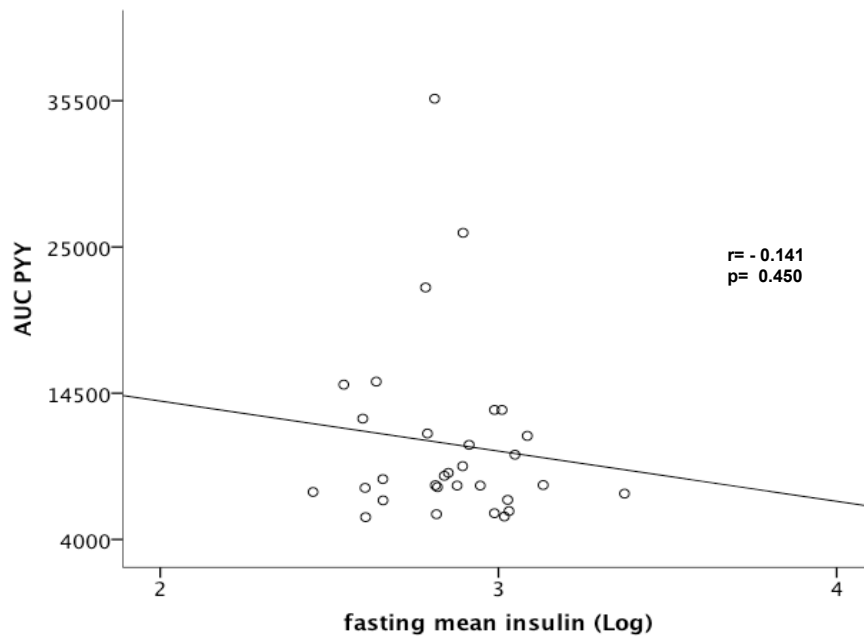
*Spearman's correlation between delta PYY response and insulin by overloads.

Figure 4 Correlation between PYY secretory load response and fasting insulin by overloads*

A MUFA overload

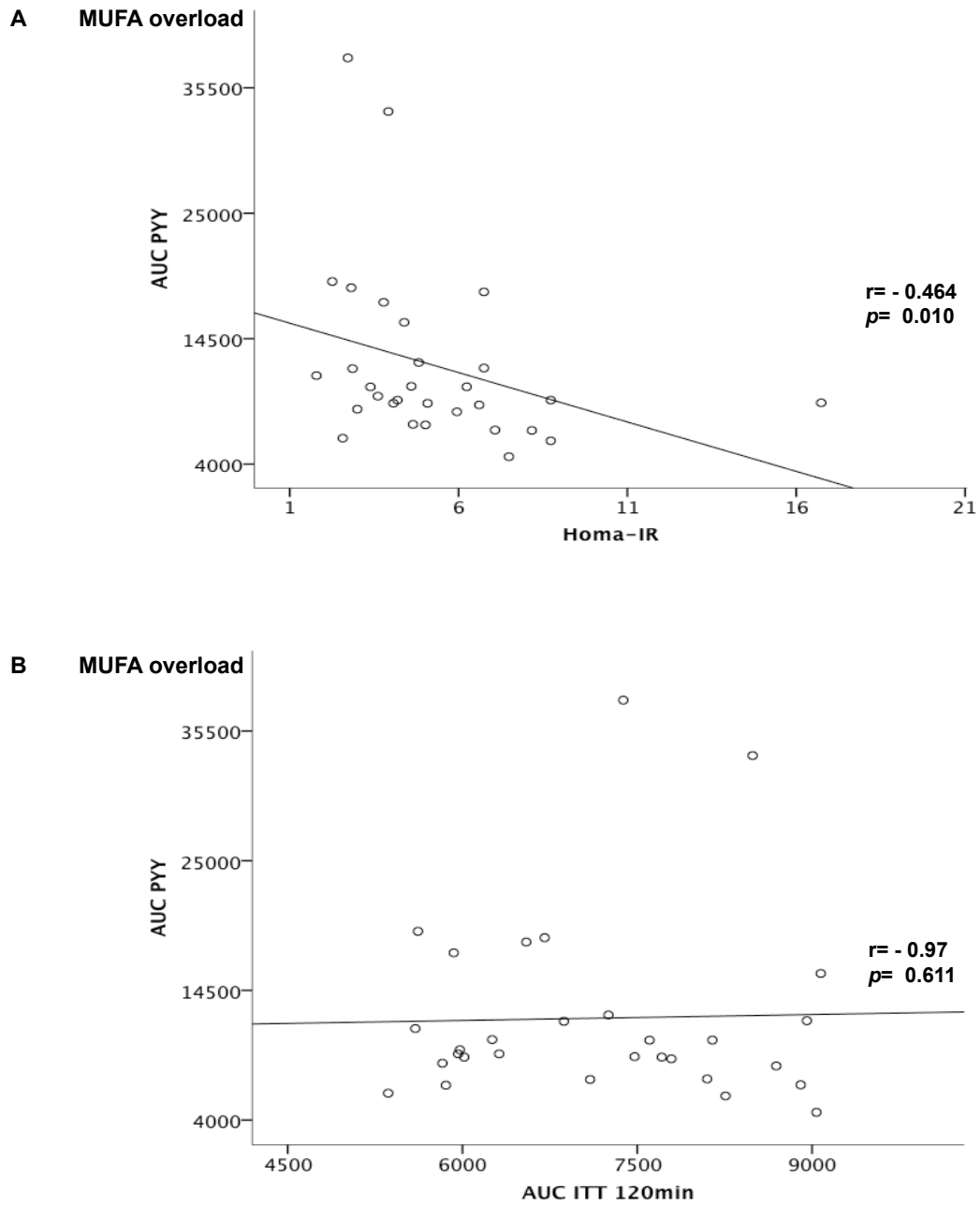


B SAT overload



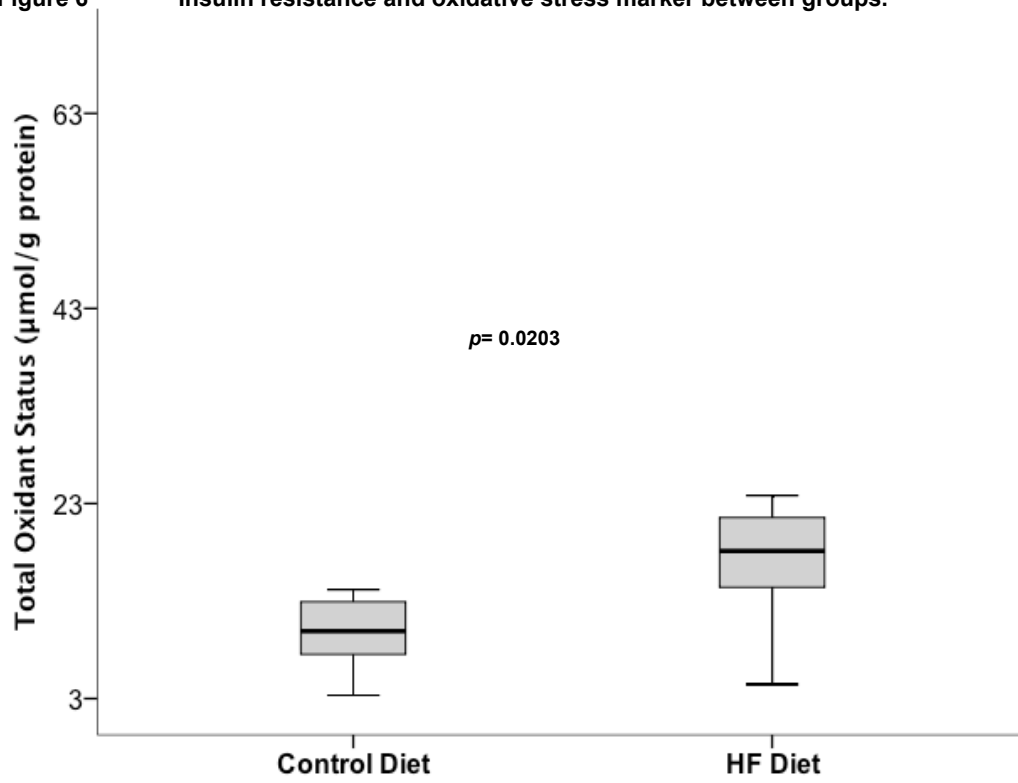
*AUC= area under curve. Spearman's correlation between AUC PYY and fasting insulin by overloads

Figure 5 PYY secretory load is associated with hepatic insulin resistance.



*AUC= area under curve, ITT= insulin tolerance test. Spearman's correlation between AUC PYY and AUC insulin by overloads.

Figure 6 Insulin resistance and oxidative stress marker between groups.



*Difference detected by non-parametric Mann-Whitney test.

5.2 VALIDATION OF HOMA-IR IN A MODEL OF HIGH-FAT DIET INDUCED INSULIN-RESISTANCE IN WISTAR RATS

Antunes, LC^{1,5} Elkfury, JL^{2,5} Jornada, MN^{1,5} Foletto, KC^{1,5} Bertoluci, MC^{1,3,4,5}

¹Postgraduate Program in Medical Sciences of Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ²Faculdade de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ³ Internal Medicine Department of Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ⁴ Internal Medicine Unit of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. ⁵ GERI- Grupo para o Estudo da Insulino-Resistência.

Corresponding author: Marcello Casaccia Bertoluci

Internal Medicine Service of HCPA, UFRGS

2350 Ramiro Barcelos St.

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

Phone/Fax: + 55 51 3359 8152

E-mail: mbertoluci@uol.com.br

ABSTRACT

Introduction: Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) is a mathematical model developed to assess insulin resistance largely used in clinical research. The use of HOMA-R in experimental studies, however, has not been validated. **Objective:** To validate HOMA-R in relation to insulin tolerance test (ITT) in a model of insulin-resistance in Wistar rats induced by a 19-week high-fat diet. **Methods:** A total of 30 male Wistar rats weighting 200-300g were allocated into 2 groups: a high-fat diet group (HFD) (55% fat-enriched chow, *ad lib*, n=15) and a standard-diet group, CD, standard chow, *ad lib*, n=15) during 19 weeks. Baseline and 19th week 7 glucose sample-ITT and HOMA-IR after an 12h overnight fasting state were determined. Area under the curve (AUC) during the 120 minutes of ITT test at 19th week was compared to simultaneous HOMA-IR. **Results:** AUC-ITT, HOMA-IR and fasting plasma insulin were significantly greater in HFD compared to CD. HOMA-IR was highly correlated to ITT $r= 0.505$; $p=0.003$. ROC curves of HOMA-IR and AUC-ITT showed similar sensitivity and specificity. **Conclusions:** HOMA-IR is a valid measure to determine insulin-resistance in Wistar rats at fasting state.

KEYWORDS: HOMA-IR, insulin resistance, insulin tolerance test

INTRODUCTION

Although the hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp (HEGC) is the current gold standard method to measure insulin resistance in clinical and experimental research, important limitations such as large experience, high-cost pump-infusion equipment and time demanding make it difficult to be applied in clinical as well in research sceneries in a large extent. (1).

Among methods available to evaluate insulin resistance, the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) is the most popular and is extensively validated against the HEGC for use in epidemiological studies (2 - 4). HOMA-IR was developed in 1985 (5) as a mathematical model that includes interactions between fasting plasma insulin and plasma glucose concentrations, being a simple and particularly helpful tool in the assessment of insulin resistance in subjects with glucose intolerance, mild to moderate diabetes and other insulin-resistant conditions (1). The applicability of HOMA-IR in experimental research, however, has been questioned as it is a non-validated tool for most animal species (6), including rats.

The use of Insulin tolerance test (ITT) for determining insulin-resistance is currently the most popular test largely validated against the HEGC. However ITT is also a time-consuming and stress generating method in animals, related to increased pain due to sequential blood sample collection and a significant death rate due to unexpected although frequent severe hypoglycemia episodes. The impact of this stress can cause interferences in blood glucose levels and may cause biased results in insulin-resistance determinations. Thus a less stressful method is desirable.

In the present study, the objective was to validate HOMA-IR in Wistar rats in relation to ITT in a set of Wistar rats that were made insulin-resistant after a 19 week high-fat diet.

METHODS

Animals

A total of 30 male Wistar rats, weighting 200-300g, were included. Animals were housed in pairs at controlled room temperature in a 12h light–dark cycle with food and water ad libitum. In order to promote insulin-resistance, we conducted a controlled experiment in which 15 rats were submitted to a high-fat diet (HFD) while 15 rats were maintained in standard chow diet (CD) ad lib for 19 weeks. HF diet was composed by a mix of 45% of standard chow and 55% of suine lard.

We performed ITT tests at baseline and 19 weeks and HOMA-IR at 19 weeks. Overnight 12h fasting blood samples were obtained for serum insulin and glucose determinations in order to calculate HOMA-IR. An oral glucose tolerance test determination (OGTT) was also obtained in a separate day during the 19th week.

To perform the ITT test, after a 12h overnight fasting, animals were weighted and blood sample collected after a pinprick in the tail to measure capillary blood glucose. Then, intra-peritoneal regular insulin (Humulin ® Eli Lilly, São Paulo, Brazil) (0.5UI/kg) was injected, and 7 capillary blood samples were collected from the tail at 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes after injection using glucose test strips. The area under curve (AUC) between the time elapsed and glucose concentration was calculated.

After 19 weeks, ITT was repeated and HOMA-IR was determined using the formula:

$$\text{HOMA IR} = \text{serum insulin (mmol/L)} * (\text{blood glucose (mmol/L)} / 22.5)$$

To perform the oral OGTT test, after baseline sampling, 2g/kg of 50% glucose solution was administered by gavage, followed by 30, 60, 90 and 120 minutes collections of blood glucose determination from the tail. All procedures were performed in accordance with institutional Animal Welfare Guidelines and approved by the Ethics Committee in Animal Research at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Assays

Insulin

Blood for rat insulin determination was collected from the retro-orbital artery in a glass cannula directly into an Eppendorf tube. Then, it was immediately placed in an ice-bath and centrifuged at 1000xg during 10 minutes at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Serum was stored at – 80°C until the assay. Rat Insulin was determined by luminescence method (Luminex®) using kits purchased from Linco Research® (Millipore®, Billerica, MA), with detection limit 28pg/ml.

Blood Glucose

Samples were obtained from capillary blood collected from the tail. Blood glucose was determined by the glucose oxidase method, using glucose strips (Medisense® Optium Xceed Meter).

Statistics

AUC-ITT was determined by trapezoid method. Spearman's correlation test was used to determine correlation between HOMA-IR and AUC-ITT, as these are variables with non-parametric distribution. In order to compare sensitivity and specificity of HOMA-IR and AUC-ITT, we compared ROC curves for HOMA-R and AUC-ITT, at different cut-off points, and a kappa value for the comparison was obtained. The *p* value was set at 0.05 for criteria for significance.

RESULTS

Both control diet (CD) and high fat diet (HFD) groups did not differ at baseline in relation to AUC-ITT, fasting glucose and body weight. After the 19th week, AUC-ITT, fasting insulin and HOMA-IR, were significant greater in HFD than in CD, (table 1) ($p < 0.001$). HOMA-IR was highly correlated with AUC-ITT: ($r = 0.535$; $p = 0.003$) (Figure 1). Agreement between AUC-ITT and HOMA-IR ROC curves was highly significant. (Kappa = 0.469; $p = 0.009$) (Figure 2). The best agreement of the curves was at highest HOMA-IR values above the median. 90% sensitivity was reached at $ITT > 6200$ and $Homa-IR > 3.9$.

DISCUSSION

The present study shows that HOMA-IR is highly correlated to IIT in male Wistar rats made insulin-resistant in response to a high-fat diet and thus may be used in experimental research as a surrogate model of insulin resistance. The current experiment provides evidence that HOMA-IR is as able as ITT to detect insulin resistance with 90% of sensitivity, evidenced by the significant agreement of both ROC curves.

Only few studies have evaluated the association between HOMA-IR and ITT and its validation in male Wistar rats is a new finding. A similar study in female Wistar rats is in accordance to our finding, showing that HOMA-IR may be an accurate surrogate for insulin-resistance determination in non-pregnant and late-pregnant Wistar as well as in Sprague-Dawley rats (7). The advantages of using HOMA-IR are notorious once it is a simpler method causing less stress due to minimal manipulation of the animals and no risk of hypoglycemia.

The limitation of the present study was the fact that we did not validated HOMA-IR against euglycemic hyperinsulinemic clamp, which is the true gold standard to determine insulin sensitivity. Insulin tolerance test is, however, also a consistent tool for measuring insulin resistance. It is largely used in experimental research although the impact of the stress in glycemic response due to pain during the test may be an issue.

In conclusion, the present study suggests that HOMA-IR could become a helpful, accurate and less traumatic tool to assess insulin-resistance in experimental studies.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa-FIPE/HCPA, Porto Alegre/Brazil. The authors also thank Laboratório Nobel, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Graduate Research Group (GPPG), Animal Experimentation Unity (UEA/HCPA), Marta Cioato and Fabiola Meyer.

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

Contributor statements: Antunes LC designed the study, wrote the protocol, reviewed studies, drafted the article, conducted the statistical analysis and interpreted the data. Jornada MN collected data. Foletto KC collected data. Tatsch E and Bocchi GV conducted oxidative stress analysis, Moresco RN interpreted the data and coordinate laboratory analysis. Bertoluci MC participated in study design, wrote the protocol, interpreted the data, drafted the article and was responsible for the final approval of this version.

REFERENCES

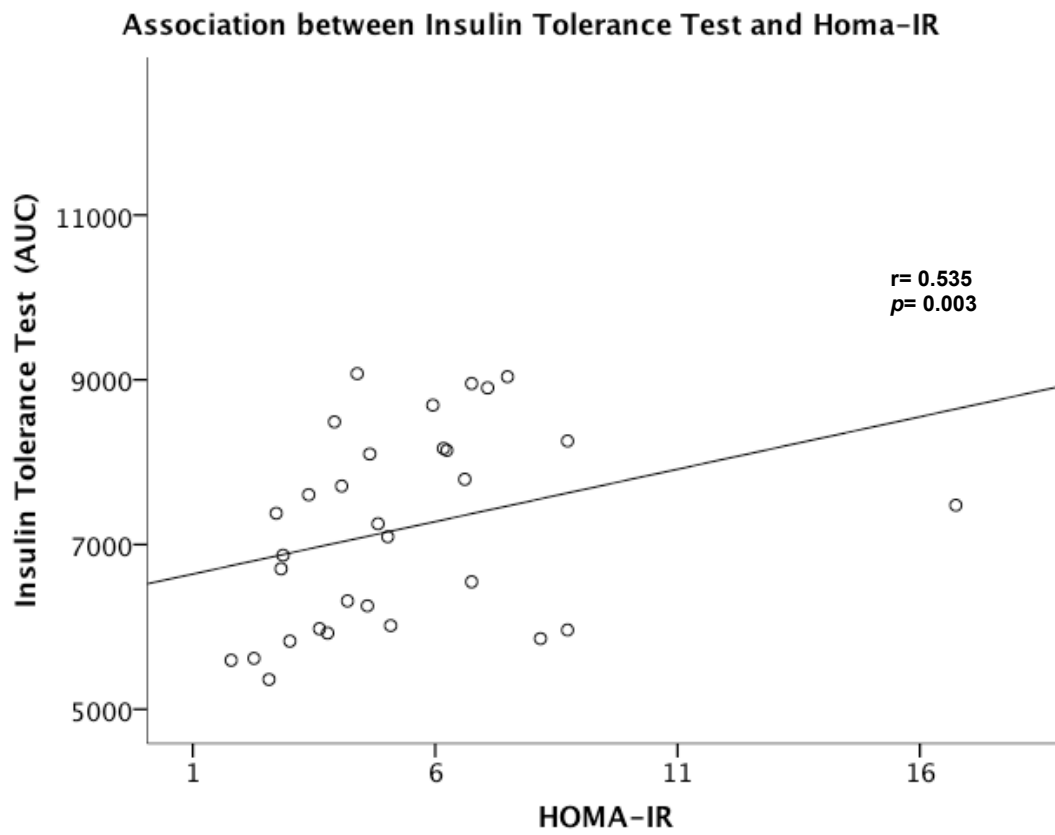
1. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E15-E26.
2. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC et al. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24:362-365.
3. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care.* 1997;20:1087-1092.
4. Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, Stern MP, Miettinen H. A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care.* 1996;19:1138-1141.
5. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-419.
6. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004;27:1487-1495.
7. Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E1269-E1276

Table. 1 summarizes sample characteristics*.

	CD (n=15)		HFD (n=15)		p value	
	Baseline	19 th week	Baseline	19 th week	Baseline	19 th week
Body weight (g)	392.9 (± 31.7)	493.6 (± 34.1)	385.9 (± 32.6)	507.5 (± 47.3)	0.525	0.332
AUC ITT	8437.5 [7965.5 – 9718.3]	6015 [5938.3 – 6818.7]	7687.5 [7296.1 – 8419.9]	8145 [7317.7 – 8525.3]	0.072	< 0.001
Fasting Glucose (mg/dL)	82 (± 9)	94 (± 8)	81 (± 5)	95 (± 6)	0.616	0.866
Glucose (120min) (mg/dL)	-	113 (± 12)	-	131 (± 14)	-	< 0.001
AUC OGTT	-	12782 (± 1056.6)	-	14172.2 (± 1303.7)	-	0.003
Fasting Insulin (pmol/L)	-	455.8 [437.27 – 716.88]	-	818.9 [668.25 – 1183.14]	-	0.010
HOMA-IR	-	3.39 [2.85-5.05]	-	5.95 [4.38 – 8.1]	-	0.015

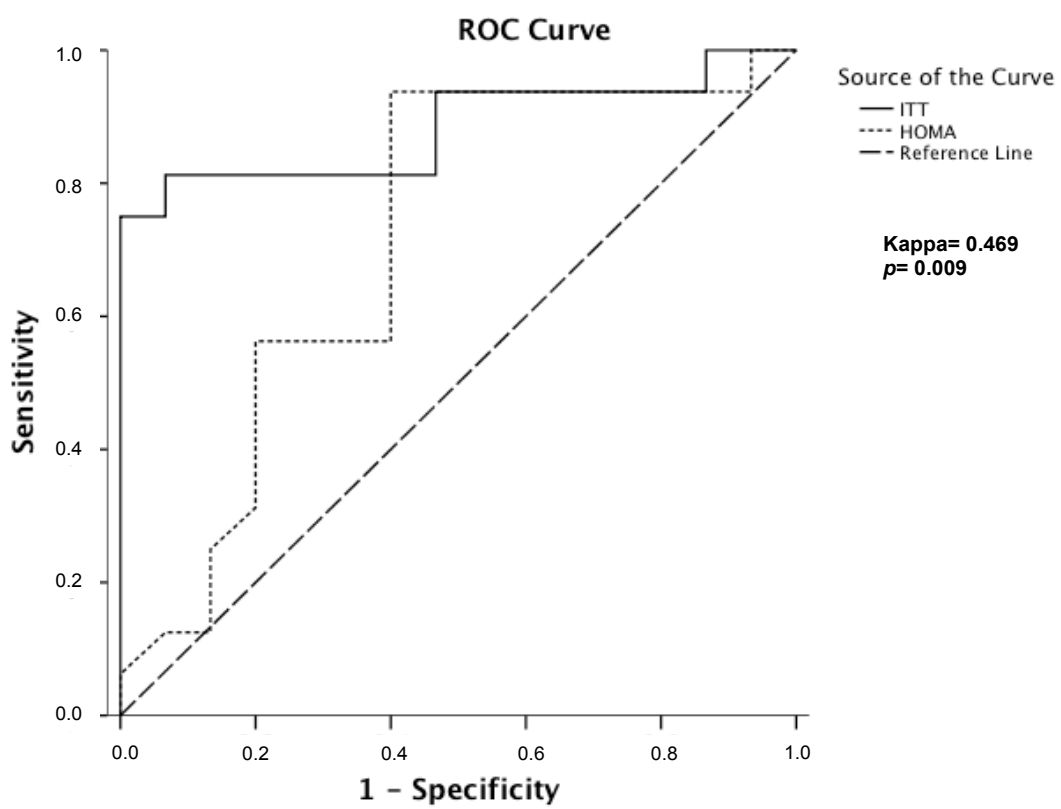
*CD= control diet, HFD= high fat diet, AUC= area under curve, ITT= insulin tolerance test, OGTT= oral glucose tolerance test, HOMA-IR= homeostasis assessment model of insulin resistance. Non-parametric Mann-Whitney Test for independent samples was performed to AUC ITT, fasting insulin and HOMA-IR variables, where data were presented as median and confidence interval. Student T-test was performed to body weight, fasting glucose and AUC OGTT variables, where data were expressed as mean and standard deviation. Significance level $p < 0.05$.

Figure 1.



Spearman's correlation between insulin tolerance test and HOMA-IR. AUC= area under curve, HOMA-IR= homeostasis assessment model of insulin resistance. Significance level $p < 0.05$.

Figure 2.



5.3 FASTING GHRELIN BUT NOT PYY⁽³⁻³⁶⁾ IS ASSOCIATED WITH INSULIN-RESISTANCE INDEPENDENTLY OF BODY WEIGHT IN WISTAR RATS (submetido na Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia)

Antunes L C¹ Jornada M N¹ Elkfury J² Foletto K C¹ Bertoluci MC^{1,3}

¹Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) ² Student of Nutrition ³Professor from Internal Medicine Division, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

From the Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Marcello Casaccia Bertoluci

Internal Medicine Service of HCPA, UFRGS

2350 Ramiro Barcelos St.

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

Phone/Fax: + 55 51 3359 8152

E-mail: mbertoluci@uol.com.br

GHRELIN IS ASSOCIATED WITH INSULIN-RESISTANCE

Running title: Ghrelin, PYY, insulin resistance

1530 words

Original article

ABSTRACT

Background: The aim was to evaluate the association between insulin-resistance and fasting levels of ghrelin and PYY in Wistar rats. **Methods:** A total of 25 male Wistar rats, weighing 200-300g was included in this study. The animals were maintained in cages with a 12/12hr light-dark cycle and fed with standard chow and water ad libitum. After 12h overnight fasting, ghrelin, PYY, Insulin and glucose values were determined. Insulin resistance was assessed through Homa IR, which was ranked, and the median was used as cut-off value to categorize insulin-resistance. HOMA-IR values equal and above 2.62 were considered as insulin-resistant (IR) while values below 2.62 were considered insulin sensitive (IS). Differences between means were determined using the Student t-test. Multiple regression and Pearson's correlation test were used to evaluate the association between variables. **Results:** HOMA-IR median IQ range values for IS and IR groups were respectively: 1.56 (0.89 - 2.16) vs. (4.06 (3.50 – 4.61); $p < 0.001$). The IR group presented increased levels of fasting ghrelin, PYY and insulin respectively: (50.35 [25.99 – 74.71] pg/ml vs 12.33 [8.77 – 15.89] pg/ml; $p = 0.001$); 54.38 [37.50 – 71.26] pg/ml vs 33.17 [22.34 – 43.99] pg/ml; $p = 0.016$); 18.04 [14.48 – 21.60] uU/ml vs. 7.09 [4.83 – 9.35] uU/ml; $p = 0.001$). Ghrelin but not PYY correlated linearly and positively with HOMA-IR: ghrelin vs. HOMA-IR ($r = 0.52$; $p = 0.008$) and PYY vs. HOMA-IR ($r = 0.22$; $p = 0.200$). This correlation was independent of body weight. **Conclusions:** Fasting ghrelin and PYY serum levels are increased in lean relative insulin resistant Wistar rats, and this increase is independent of weight.

KEYWORDS: Ghrelin, PYY, insulin resistance, HOMA-IR

BACKGROUND

Insulin resistance is a life-long condition associated with increased abdominal adiposity, overfeeding, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Gastrointestinal peptides have been recently associated with control of hunger and satiety, but the link between these peptides and insulin-resistance has not been completely determined.

Ghrelin is the only known circulating orexigenic peptide, primarily produced in stomach, but also in smaller concentrations in the small intestine, liver, pancreas, kidney, lung, pituitary, hypothalamus, placenta and testes [1]. Under physiological conditions, ghrelin is secreted in a rhythmic pattern of expression with circadian light-dark cycles and a unique secretory pattern with surges preceding meals [2].

Ghrelin secretion mechanisms occur in part through the GHS-R receptor, depending on the growth hormone effect [3], but it is not yet completely understood, with potential regulation by insulin [4]. Recent studies show that cultured newborn rat stomach cells can express the insulin receptor suggesting that insulin may play an important role in this regulation. Indeed, ghrelin secretion is inhibited when exposed to low and moderate concentrations of insulin, but this inhibitory effect seems to be lost in the presence of very high concentrations of insulin[4]. Moreover an inhibitory effect on fasting ghrelin is observed in obese diabetic hyperinsulinemic patients, suggesting that adiposity may with insulin to suppress ghrelin [5]. Thus it is important to understand the relationship between ghrelin and insulin resistance outside the context of obesity.

Peptide YY (PYY) is a satiety peptide mainly secreted from L cells at the distal intestine and colon in response to food intake. It is rapidly metabolized to its active form, PYY₍₃₋₃₆₎, through the action of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) [6]. PYY₍₃₋₃₆₎ has been implicated as a satiety peptide to inhibit food intake in both humans [7] and rodents [8] and its fasting levels have been shown to be reduced in human obesity suggesting that it is related to adiposity [9]. The association of these peptides and insulin-resistance has not been studied outside the context of obesity and hyperglycemia.

In the present study we evaluate fasting plasma ghrelin and PYY in relation to weight and relative insulin-resistance determined by HOMA-IR in lean non-diabetic Wistar rats.

METHODS

Protocol

In a cross-sectional study, we examined 25 male Wistar rats to determine serum PYY, Insulin, ghrelin and glucose. Rats weighing 200-300g were included in this study. The animals were kept in a 12/12hr light-dark cycle and fed with standard chow and water ad libitum. All experimental procedures were performed in accordance with institutional animal welfare guidelines and approved by the Ethics Committee in Animal Research at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.)

Sample collection

After 12-hour overnight fasting, blood was collected from the retro-orbital artery in a glass cannula directly to an eppendorf tube. Simultaneously to the blood collection, Pefabloc® SC (AEBSF) (Roche®, Mannheim, Germany) was added for ghrelin at 1mg/ml of total blood. Samples were not pre-acidified. The blood was mixed with Pefabloc® less than 30 sec after collection. Then it was immediately placed in an ice-bath and centrifuged at 1000xg during 10 minutes at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Serum was stored at –80°C until the assay was performed.

Hormone and Biochemistry measurements

Total Ghrelin, PYY(3-36), and Insulin were determined by Luminex® using kits purchased from Linco Research® (Millipore®, Billerica, MA). Acylated ghrelin is the bioactive ghrelin form; however total ghrelin seems to be a good surrogate for the acylated form because the ratio of the two levels is constant under a wide variety of conditions that affect this peptide[5, 10, 11]. Respective limits of detection for ghrelin, PYY and insulin were: 2, 16 and 28 pg/ml. Capillary blood collected from the tail was used to determine blood glucose values by glucometer (Medisense® Optium Xceed Meter).

Statistics

Homa IR was ranked a priori to determine the median which was the cut-off to categorize insulin resistance. Rats above HOMA IR median value were considered

insulin resistant (IR). Those below the median were defined as insulin sensitive (IS). Asymmetric data were logarithmic transformed and thus variables were presented as mean and standard deviation. Differences between IR and IS groups were determined using the Student t-Test. For the study of correlations, we used multiple linear regression and Pearson's correlation test for all variables. SPSS version 17 was used. A p value of 0.05 was the criterion for significance.

RESULTS

According to HOMA-IR rank we determined insulin resistant (IR group) (n=13) and insulin sensitive (IS group) (n=12) rats. The HOMA IR median cut-off for insulin resistance was 2.62. Median HOMA-IR and interquartile range values for IS and IR groups were respectively: (1.56(0.89 -2.16) and 4.06 (3.50 – 4.61); $p<0.001$) (Table 1).

We verified that the IR group presented significantly higher levels than the IS group of fasting ghrelin, PYY and insulin: (50.35 [25.99 – 74.71] pg/ml vs 12.33 [8.77 – 15.89] pg/ml; $p=0.001$), 54.38 [37.50 – 71.26] pg/ml vs 33.17 [22.34 – 43.99] pg/ml; $p=0.016$), 18.04 [14.48 – 21.60] uU/ml vs. 7.09 [4.83 – 9.35] uU/ml; $p=0.001$) (Table1).

The IR and IS groups did not differ in body weight and fasting glucose values: (292.90 \pm (10.84) g vs. 289.95 \pm (10.32) g; $p=0.495$), (97 \pm (10.48) mg/dl vs. 91 \pm (12.45) mg/dl; $p=0.201$) (Table 1).

Fasting ghrelin but not PYY correlated directly with HOMA IR: ($r=0.52$; $p=0.008$) and ($r=0.22$; $p=0.200$) (Figure 1A and 1B respectively). Fasting ghrelin was significantly correlated with body weight (Figure 1C) and fasting insulin: ($r=0.54$; $p=0.005$) and ($r=0.51$; $p=0.009$). Fasting PYY did not correlate with insulin: ($r=0.32$; $p=0.119$) or body weight ($r=0.2$; $p=0.921$) (Figure 1D). Fasting ghrelin and PYY peptides did not correlate with each other ($r=0.37$; $p=0.069$).

DISCUSSION

The present study shows that, in Wistar rats, fasting ghrelin is associated with insulin-resistance independently of body weight. The same effect is not observed with PYY(3-36). This finding suggests that ghrelin secreting cells may be up-regulated in the fasting state by the presence of insulin-resistance without the interference of weight

So far, few studies have evaluated the association between ghrelin and insulin-resistance. In newborn rat X/A stomach cells, the secretion of ghrelin is progressively inhibited by increasing concentrations of insulin. However, this effect is abolished by higher concentrations of insulin, through inhibition of phospho-inositol-3 kinase, thus suggesting that cellular insulin-resistance can impair the suppressive effect of insulin in fasting ghrelin [4]. In another study, the ablation of the ghrelin receptor (growth hormone secretagogue receptor – GHS-r) in knockout *Ghsr*^{-/-} mice, compared to wild type mice, improved the natural age-related insulin-resistance, reinforcing a role for ghrelin in the insulin-resistance state[12]. Moreover, in healthy overweight subjects receiving ghrelin infusions over 2 hours along with endovenous insulin and somatostatin, an acute muscle insulin-resistance was produced by ghrelin[13]. On the other hand, when evaluating fasting ghrelin levels in cross-sectional studies with insulin-resistant hyperinsulinemic obese patients, ghrelin levels are decreased, indicating a possible suppressive effect of insulin in ghrelin secretion in the presence of obesity[5]. In the present study, we observed a significant positive association between ghrelin and insulin-resistance and an independent association between ghrelin and weight which is in accordance with the above findings reinforcing the concept that insulin resistance may up-regulate fasting ghrelin secretion in the absence of obesity.

The relationship between PYY and insulin-resistance has been controversial. In relatives of type 2 diabetic patients, fasting serum PYY has been shown to be low and to correlate negatively with insulin resistance[14]. However, in a recent larger study in type 2 diabetic patients with coronary artery disease, the serum active form of PYY(3-36) in the fasting state was positively related to serum insulin levels and to the body mass index[9]. This study also shows that abdominal adiposity was an important determinant of PYY(3-36) concentration in type 2 diabetic subjects, and the higher PYY(3-36) levels could be due to the higher adiposity of the patients. However the authors found that the association between high fasting PYY(3-36) did not

depend on total or regional adiposity. It was then speculated that the two forms of PYY may have different effects on insulin metabolism with PYY(1-36) having a more potent role in insulin secretion than PYY(3-36), while PYY(3-36) having an increased impact on insulin-resistance than PYY(1-36). Our results did not confirm an association between insulin-resistance and fasting PYY levels in the present model. This suggests that mild insulin-resistant states could be insufficient to influence the increase in fasting ghrelin and PYY(3-36) in lean animals. We cannot exclude, however, that the response of PYY to a food overload would be changed in the setting of insulin resistance.

The present study has clear limitations because of the cross-sectional design, which does not allow inferring causality between insulin-resistance and the secretion of both peptides. We believe however that insulin-resistance may be the most logical causative factor because of the presence of insulin receptors in stomach cells. Longitudinal studies are, however, necessary to further clarify the natural history of insulin-resistance and the regulation of fasting ghrelin in this experimental model.

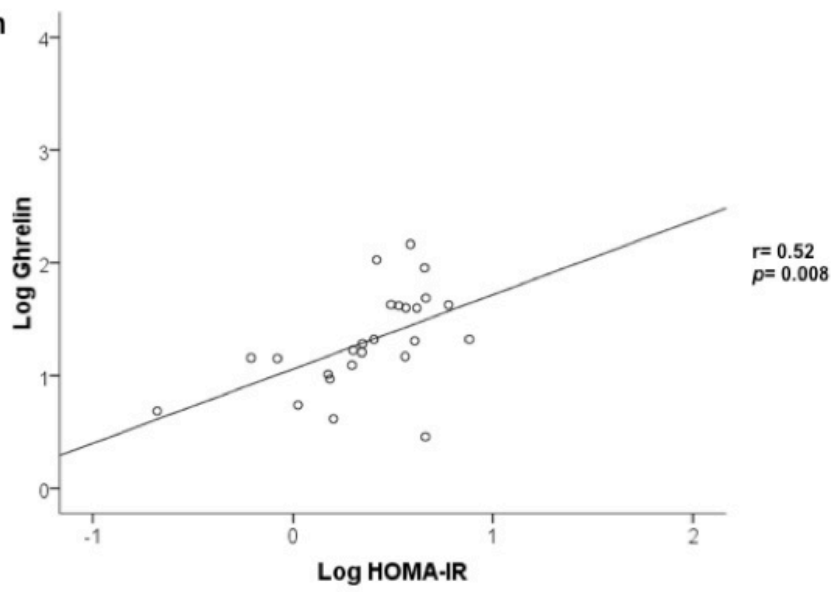
In conclusion, these results support a role for fasting ghrelin in the pathogenesis of insulin-resistance in Wistar rats and the hypothesis of a possible gastro-intestinal role for insulin-resistance. We speculate that the loss of the insulin inhibitory effect may be an adaptive metabolic adjustment. Further studies are necessary to investigate whether insulin resistance may exert influence on satiety and food intake through the effect on these peptides.

Table 1. Sample characteristics.*

	IS Group (n=12)	IR Group (n=13)	<i>P</i>
Body weight (g)	289.95 ± (10.32)	292.90 ± (10.84)	0.495
Glucose (mg/dl)	91 ± (12.45)	97 ± (10.48)	0.201
Insulin (uU/ml)	7.09 [4.83 – 9.35]	18.04 [14.48 – 21.60]	0.001
Homa-IR	1.56 (0.89 -2.16)	4.06 (3.50 – 4.61)	<0.001
Ghrelin (pg/ml)	12.33 [8.77 – 15.89]	50.35 [25.99 – 74.71]	0.001
PYY (pg/ml)	33.17 [22.34 – 43.99]	54.38 [37.50 – 71.26]	0.016

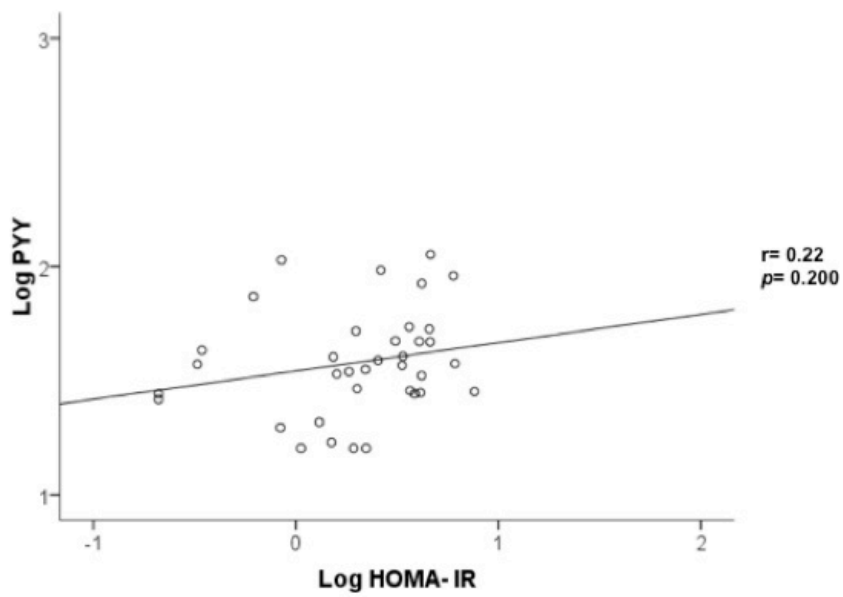
*Comparison between groups by t- test for two independent samples. Body weight and glucose are expressed in mean and standard deviation. Homa-IR values are shown in median and interquartile ranges. Other variables are expressed in mean and Confidence Interval. IS group= insulin sensitive group; IR group= insulin resistant group.

A. Ghrelin



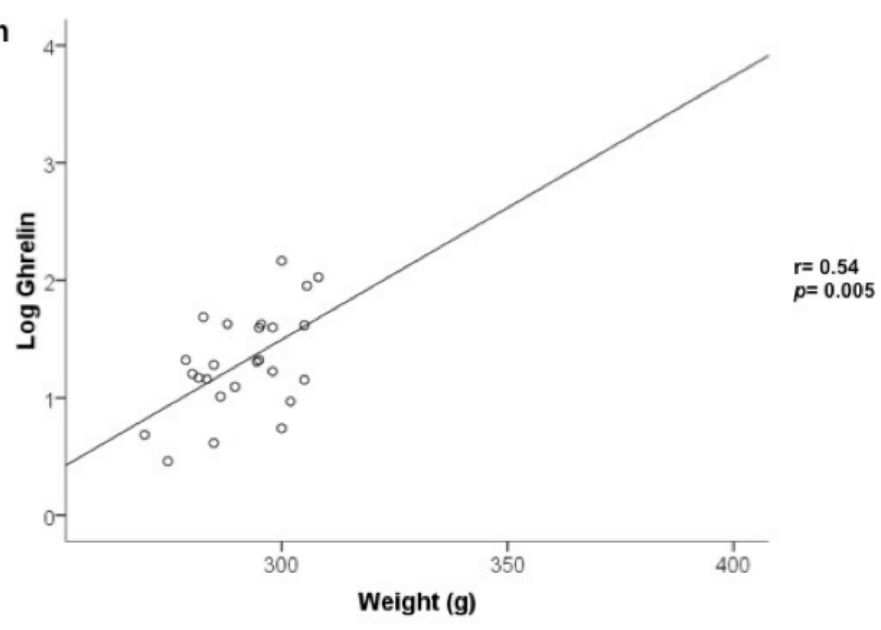
*Pearson's correlation between Ghrelin and Homa-IR.

B. PYY



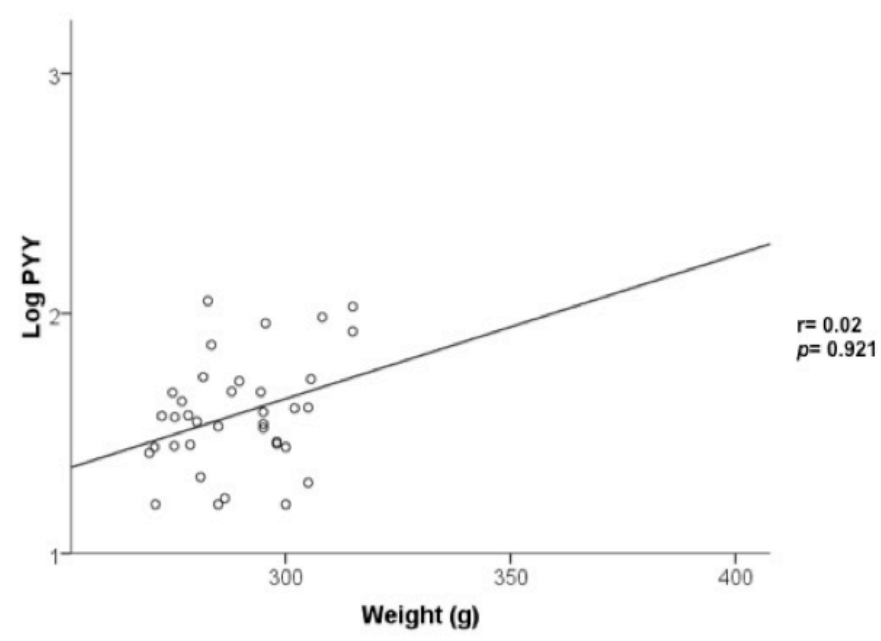
*Pearson's correlation between PYY and Homa-IR.

C. Ghrelin



*Pearson's correlation between Ghrelin and body weight.

D. PYY



*Pearson's correlation between PYY and body weight.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa-FIPE/HCPA, Porto Alegre/Brazil. The authors also thank Laboratório Nobel, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Graduate Research Group (GPPG), Luciano Guimaraes, Animal Experimentation Unity (UEA/HCPA), Marta Cioato and Fabiola Meyer.

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

Contributor statements: Antunes LC designed the study, wrote the protocol, reviewed studies, drafted the article, conducted the statistical analysis and interpreted the data. Jornada MN designed the study, wrote the protocol, reviewed studies and drafted the article. Foletto KC participated in the experimentation. Bertoluci MC participated in study design, wrote the protocol, interpreted the data, drafted the article and was responsible for the final approval of this version.

REFERENCES

1. Kojima, M., et al., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999. 402(6762): p. 656-60.
2. Cummings, D.E., et al., A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 2001. 50(8): p. 1714-9.
3. Fukumori, R., et al., Effects of intravenous ghrelin injection on plasma growth hormone, insulin and glucose concentrations in calves at weaning. *Anim Sci J*, 2013. 84(4): p. 310-5.
4. Gagnon, J. and Y. Anini, Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture. *Endocrinology*, 2012. 153(8): p. 3646-56.
5. McLaughlin, T., et al., Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(4): p. 1630-5.
6. Batterham, R.L. and S.R. Bloom, The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 994: p. 162-8.
7. Steinert, R.E., et al., Secretion of gastrointestinal hormones and eating control. *J Anim Sci*, 2013.
8. Batterham, R.L., et al., Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, 2002. 418(6898): p. 650-4.
9. Ukkola, O.H., et al., High serum fasting peptide YY (3-36) is associated with obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes. *Regul Pept*, 2011. 170(1-3): p. 38-42.
10. Murakami, N., et al., Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol*, 2002. 174(2): p. 283-8.
11. Ariyasu, H., et al., Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology*, 2002. 143(9): p. 3341-50.
12. Lin, L., et al., Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. *Aging Cell*, 2011. 10(6): p. 996-1010.

13. Vestergaard, E.T., et al., Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. *Diabetes*, 2008. 57(12): p. 3205-10.
14. Boey, D., et al., Low serum PYY is linked to insulin resistance in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Neuropeptides*, 2006. 40(5): p. 317-24.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É bem conhecido o efeito do excesso de ácidos graxos no desenvolvimento da obesidade e dos mecanismos pelos quais a exposição crônica a uma dieta hiperlipídica leva a alterações metabólicas sistêmicas. Os estudos, de modo geral, até pouco tempo, mantiveram-se focados no papel do tecido adiposo como promotor de inflamação sistêmica, mas só recentemente passaram a centrados no papel da inflamação intestinal, na resistência à insulina e nas alterações na fisiologia dos peptídeos intestinais cujo potencial para regular a saciedade são cada vez mais claramente definidos, estabelecendo-se, assim, um cross-talk entre o intestino e o hipotálamo.

A inflamação do epitélio intestinal potencialmente pode ter um papel na promoção da adiposidade. Há evidências de que a dieta hiperlipídica seja capaz de induzir inflamação de baixo grau no epitélio intestinal, onde a interação entre diferentes tipos de bactérias colonizadoras parece ser crucial para a manutenção deste processo. A dieta hiperlipídica é capaz de promover aumento de alguns tipos de bactérias gram-negativas, as quais produzem lipopolissacarídeos (LPS). Através dos receptores TLR4, localizados na membrana luminal das células do trato intestinal, os quais apresentam um sítio de ligação tanto para o LPS como para ácidos graxos saturados, ocorre a ativação da via inflamatória mediada por citocinas, as quais aumentam a permeabilidade entérica, de modo a possibilitar que o próprio LPS e os ácidos graxos saturados atravessem com mais facilidade a barreira intestinal, lançando citocinas na circulação sistêmica e ácidos graxos livres. Por um lado, a presença de um aporte maior de ácidos graxos saturados e sua maior chegada no fígado e no tecido adiposo ativa a via da proteína quinase C, fosforilando o substrato do receptor da insulina, o IRS-1 e 2, em serina, desviando a via de sinalização pela via da MAPK quinase com ativação do NfκB determinando resistência à insulina. Por outro lado, o maior aporte de citocinas inflamatórias, como o TNF-alfa, também é capaz de se ligar a seu receptor específico no tecido adiposo, promovendo ativação da via inflamatória através da JNK quinase. Dessa forma, pode-se supor que haja uma ligação bem consistente entre o processo inflamatório intestinal e o surgimento de resistência à insulina em células do fígado e do tecido adiposo. Sendo assim, a inflamação intestinal poderia ser pensada como um fenômeno incipiente, induzido pela dieta hiperlipídica precedente à obesidade.

Dentro do contexto da inflamação intestinal, poderíamos supor que o aparato secretor de peptídeos intestinais em resposta a alguns nutrientes, como lipídeos, possa estar significativamente afetado. Peptídeos intestinais como o PYY e o GLP-1 são secretados mediante estímulo de seus receptores luminiais GPRs. As vias de sinalização intracelular destes peptídeos dependem portanto da integridade das células-L. A secreção desses peptídeos poderia, teoricamente, ser afetada por uma dieta gordurosa utilizada por tempo suficiente para induzir inflamação intestinal e resistência à insulina. Isso poderia ter implicações em outros sistemas como o controle hipotalâmico da fome e da saciedade, onde o PYY exerce importante papel como fator sacietógeno. Menores níveis circulantes de PYY poderiam, em tese, induzir a menor saciedade e, conseqüentemente, levar a um ganho de peso ainda maior.

Com este conceito teórico, procuramos avaliar o efeito da dieta gordurosa na resposta secretória de PYY a sobrecargas agudas de diferentes lipídeos. No primeiro estudo da série, avaliamos o efeito da sobrecarga de ácidos graxos saturados e monoinsaturados na secreção aguda de PYY, GLP-1 e insulina de ratos Wistar em dieta usual, onde observamos que ambos ácidos graxos monoinsaturados e saturados apresentavam um aumento do PYY em resposta à sobrecarga, sendo este mais vigoroso com os monoinsaturados

Procuramos então desenvolver um modelo de resistência à insulina utilizando dieta gordurosa durante 19 semanas. Os ratos desenvolveram resistência à insulina, sem diferença no peso, tornando-se levemente mais hiperglicêmicos quando comparados aos ratos com dieta normal. Verificamos, entretanto, que os animais com insulinoresistência, induzida por dieta hiperlipídica, perderam a capacidade de secretar PYY ao receber uma sobrecarga de ácidos graxos saturados. De forma interessante, a capacidade para secretar PYY induzida pelos ácidos graxos monoinsaturados não foi afetada.

Nossos achados encontram-se em concordância com estudos que demonstraram a capacidade de atenuação do efeito anorexígeno de peptídeos entéricos em animais e em humanos submetidos à dieta hiperlipídica.

No nosso experimento, a redução da capacidade secretória de PYY parece ter sido específica para ácido graxos saturados, sugerindo que o grau de ramificação destes seja importante. O mecanismo pelo qual ocorreu essa perda seletiva na capacidade secretória de PYY não é conhecido. Entretanto, um importante achado

obtido foi o aumento de marcador oxidante no jejuno de animais submetidos à dieta hiperlipídica, indicando a presença de estresse oxidativo intestinal, o que poderia estar envolvido no comprometimento do aparato secretor do PYY em resposta à sobrecarga de ácidos graxos saturados.

Podemos especular que haja um processo inflamatório latente que tenha afetado a sinalização de um algum receptor específico para ácidos graxos de cadeia curta.

É possível que alterações nos receptores para ácidos graxos saturados, GPR41 e GPR43, secundárias ao processo inflamatório gerado pela dieta hiperlipídica, sejam em parte responsáveis pela redução da capacidade secretória de PYY na presença de ácidos graxos de cadeia curta. Até o presente momento, nenhum estudo com a finalidade de averiguar a redução na sinalização e ativação intestinal desses receptores para ácidos graxos foi realizado. Uma vez que a perda da resposta secretória de PYY pode ser ocasionada devido a alterações na sinalização de receptores de nutrientes envolvidos na secreção desse peptídeo, torna-se pertinente essa questão de estudo.

Os receptores GPR41 e GPR43 ligam-se a ácidos graxos de cadeia curta, onde o primeiro acopla-se à subunidade alfa da proteína de ligação Gi (G α i), uma rota inibidora da adenilato ciclase, diminuindo o AMPc, enquanto o segundo pode ligar-se tanto à proteína Gq (G α q) quanto à G α i, cujas ativações resultam no aumento da PKC e secreção intracelular de íon Ca⁺², culminando na exocitose de peptídeos enteroendócrinos moduladores de fatores anorexígenos.

Outro achado importante do nosso estudo diz respeito a localização do sítio de resistência à insulina no modelo experimental desenvolvido. Por meio de parâmetros de estresse oxidativo, demonstramos que a inflamação subclínica gerada pela dieta hiperlipídica e RI promoveu o aumento de marcador oxidante e a redução de marcador antioxidante no fígado. Esse resultado não foi encontrado no músculo desses animais, indicando que a RI induzida por HFD em ratos wistar seja primeiramente de origem hepática e não muscular.

O contexto atual de pesquisas sobre a obesidade e suas alterações metabólicas mostram uma visão ainda mais integradora, salientando a interface entre fatores ambientais, genéticos e microbiota intestinal. Cabe direcionar esforços em compreender, também, a sua relação com a microbiota intestinal, como a fermentação de polissacarídeos, incluindo o impacto gerado nos hospedeiros

fisiológicos e no balanço energético no encadeamento/ cronicidade da obesidade e resistência à insulina. O panorama atual mostra os LCFA (sobretudo ω -3 e ω -9) e seus receptores como promissoras questões de pesquisa, dada a sua participação na regulação e síntese de peptídeos entéricos, como o GLP-1 e PYY, bem como do seu potencial anti-inflamatório, dos consequentes efeitos benéficos na resposta glicêmica e melhora da resistência à insulina. Dessa forma, mais uma lacuna abre-se sobre o papel dos receptores acoplados à proteína-G, presentes na célula-L intestinal bem como o seu impacto no estímulo secretório do PYY . No que tange à regulação desses receptores de ácidos graxos, seus mecanismos de ação e de que forma essa classe de moléculas, estrategicamente localizadas no epitélio intestinal desempenham o papel de sensores com a finalidade de traduzir informações chave sobre atividades metabólicas devem ser elucidados. Sabe-se, de modo geral, que a ativação dos GPRs desencadeia o aumento da concentração de cálcio intracelular e a despolarização, resultando em ativação nervosa e secreção de neurotransmissores os quais agirão no NTS, promovendo sinais de saciedade; portanto o esclarecimento desses mecanismos possibilitariam novas ações terapêuticas no combate à obesidade e demais doenças para as quais constitui fator de risco.

Portanto, restam ainda muitas lacunas a serem preenchidas sobre o conhecimento de mecanismos essenciais para otimizar a sinalização entre ácidos graxos e GPRs e a consequente resposta incretínica, a fim de promover novas terapêuticas adjuvantes para o tratamento da obesidade.

7. APÊNDICES

Delineamento Estudo Fase I: indução de resistência à insulina

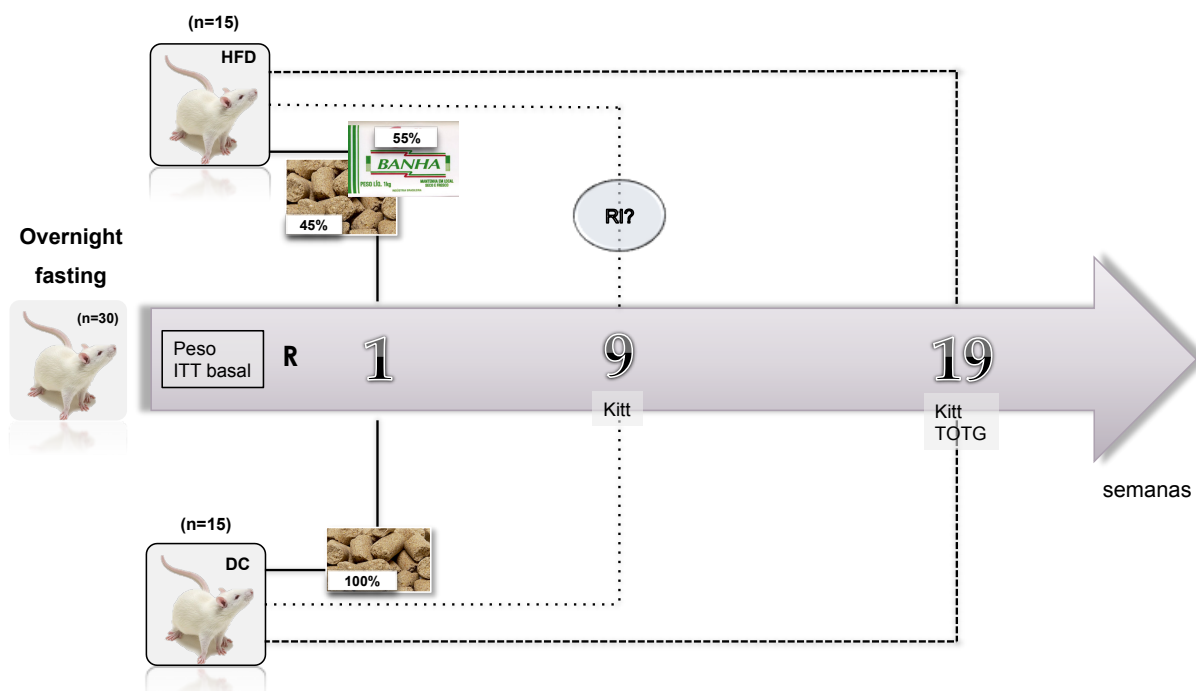
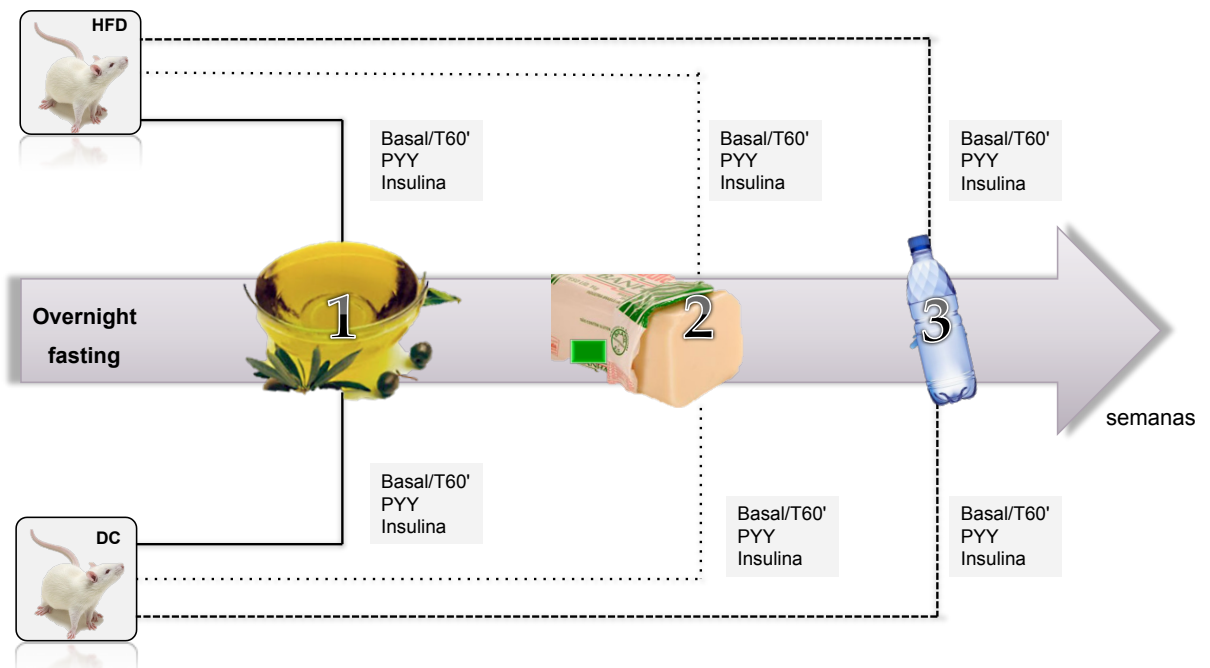


Tabela 1. Análise da composição da dieta e ração padrão

Constituintes	Tabela em g/100g	
	Dieta Controle (DC)	DIETA <i>High Fat Diet (HFD)</i>
Umidade	12,5	5,6
Resíduo Mineral Fixo	10	4,5
Lipídeos	4,5	57,0
Gordura poliinsaturada	-	7,5
Gordura monoinsaturada	-	23,3
Gordura saturada	-	21,8
Proteínas	22	9,9
Carboidratos	55	24,8
Fibras	8	3,6
Valor Calórico Total	348,5	652,9

Delineamento Estudo Fase II: Respostas Secretórias



8. ANEXOS

8.1 Prêmio SBD



8.2 ACUTE EFFECT OF MONOUNSATURATED AND SATURATED FATTY ACID OVERLOAD IN SERUM GLP-1, PYY and INSULIN SECRETION IN WISTAR RATS

Jornada MN¹ Antunes LC¹ Elkfury JL² Foletto KC¹ Bertoluci MC^{1,3}

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

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

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

From the Postgraduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Supported by the Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

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

Contributor statements: Jornada MN and Antunes LC designed the study, wrote the protocol, reviewed studies, drafted the article and interpreted the data. Foletto KC participated in the experimentation and conducted the statistical analysis and contributed to the writing of these sections. Elkfury, JL participated in the data collection. Bertoluci MC was the mentor of the project, coordinated the research group, study design, protocol, and was responsible for the final approval of the article version.

Corresponding author: Marcello Casaccia Bertoluci

Internal Medicine Service of HCPA, UFRGS

2350 Ramiro Barcelos St.

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

Phone/Fax: + 55 51 3359 8152

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

ABSTRACT

Aims: To evaluate the effects of an acute oral overload of unsaturated and saturated lipids in the release of GLP-1 and PYY. **Methods:** We conducted a controlled experimental study in Wistar rats, divided according to oral lipid overload: MUFA group (olive oil), SAT group (lard), GLUC group (glucose) and CONT group (water). We evaluated GLP-1 and PYY3-36 serum samples at baseline and 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after the oral load. Main outcomes were the area under the curve after the load (AUC) and the peak value any time. Statistical significance was determined by ANCOVA with Bonferroni correction. **Results:** We found significant GLP-1 increase in MUFA group at 30' when compared to baseline ($p=0.01$) and a higher GLP-1 secretion peak at 120' compared to CONT and GLUC ($p \leq 0.001$). PYY AUC was higher in the MUFA group when compared to CONT ($p=0.04$). PYY was greater after MUFA vs CONT at time 30' ($p=0.015$), at time 60' vs. CONT and GLUC ($p=0.019$) and at time 120' vs CONT and SAT ($p=0.02$). A positive linear Pearson's correlation was seen between PYY and GLP-1 ($r=0.57$; $p= 0.02$). **Conclusions:** MUFA promoted a slight but significant peak of GLP-1 compared to saturated fatty acid load and a more vigorous and sustained increase in PYY release while saturated fat overload did not change GLP-1 or PYY. The secretions of both peptides are were positively correlated to each other, indicating that they may be co-secreted after MUFA load. MUFA may have a unique mechanism for GLP-1 and PYY release not seen with saturated fat overload in this study.

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

INTRODUCTION

Peptides secreted by the gastrointestinal tract such as glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) play a fundamental role in controlling food intake, sending satiety signals to the central nervous system and producing either anorexic or orexigenic responses (1).

GLP-1, is a gut peptide originated from the pro-glucagon gene transcription in the entero-endocrine L-cells at small bowel and colon in response to food (2) exerting incretin effect by stimulating insulin secretion in a glucose-dependent manner. GLP-1 inhibiting glucagon release (3), slowing gastric emptying(4) and thus also increase satiety(5, 6).

Peptide YY is a gut peptide also secreted by L-cells at the distal ileum(7) in response to food intake that plays important role in controlling satiety by exerting anorexigenic effect mediated through the action of NPY-2 receptors at the arcuate nucleus in the hypothalamic (8). The acute endovenous administration of PYY3-36 results in a significant reduction in food intake and body weight, suggesting a potential application in obesity treatment (9).

Mechanisms in which food stimulates GLP-1 and PYY release have not been completely elucidated. Macronutrients such as lipids can increase intestinal release of both gut peptides (14,15), but the effect in GLP-1 and PYY secretion of a acute load of monounsaturated or saturated fatty acids is not known. If differences in lipids structure are important in inducing a higher secretion, it may justify its use as future intervention to study satiety in humans. The primary objective of the present study was to compare the monounsaturated and saturated lipid effect in PYY and GLP-1 in relation to insulin secretion after an acute oral overload in non-obese rats.

METHODS

Study design

We conducted a controlled experiment in which serum GLP-1, PYY and insulin levels were evaluated after an acute oral overload of either saturated or unsaturated fatty acid compared to water and glucose overload as controls at similar proportional infused volumes.

Animals and Intervention

A total of 44 male Wistar rats weighting 200-300g were included. Animals were randomized in blocks according to body weight. According to macronutrient overload, 4 groups were determined: MUFA group, which received olive oil; SAT group, which received liquid lard, control glucose group (GLUC) (oral glucose at 80%) and control water group (CONT).

Groups received isocaloric loads of each macronutrient in a mean of 0.026Kcal/g per body weight, except in the CONT group. All overloads were infused through gavage. Infused volume was calculated proportionally to rat body weight in order to occupy an estimate of 80% of animal gastric total capacity, to avoid provoking unintended gastric distension. Animals were kept in a 12/12hr light-dark cycle and fed with standard chow and water ad libitum. The night before experimentation animals were in overnight fasting state (12 hours). After 12-hour overnight fasting, blood was collected from the retro-orbital artery in a glass cannula directly to an Eppendorf™ tube. Samples were collected at baseline (fasting) (0) and at the time points: 15', 30', 60', 90' and 120 minutes after the load. The study participants who made the analyses were blind to the study intervention. All experimental procedures were performed in accordance with institutional animal welfare guidelines and approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas of Porto Alegre.

GLP-1, PYY, Insulin and Glucose measurements

GLP-1, PYY and Insulin were determined by Luminex™ technology using Milliplex Rat Map Gut Hormone Panel (Linco Research Inc., Billerica, MA). During the blood collection an appropriate amount of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-IV) inhibitor was added to stabilize GLP-1. Blood was mixed with DPP-IV inhibitor within

less than 30 seconds after collection. After break of 20 min for coagulation, the blood samples were centrifuged at 1000xg for 10 minutes to separate serum. The serum collected was immediately frozen at -80°C for later analysis. Capillary blood collected from the rat tail was used to determine glucose values by glucometer (Medisense Optium Xceed Meter, Abbot™).

Statistical analysis

Values for the area under the curve (AUC) of GLP-1, PYY, glycemia, and insulin after overloads were calculated through the trapezoidal method using the NCSS 7 Statistical Software (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA). The AUC and baseline parameters were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple pairwise comparisons. General linear model (GLM) for the repeated measures analyses of covariance (ANCOVA) with Bonferroni's adjustment was conducted to assess differences between groups and time (baseline vs. post-overload). The groups as a between-subjects factor, time overloading as a within subjects factor, and initial body weight as the covariate. Correlations were determined using the two-tailed Pearson correlation coefficient.

RESULTS

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

GLP-1

We verified that MUFA group presented a slight but significant 1,3x peak secretion of GLP-1 at 30 minutes relative to baseline ($p=0.01$). The GLP-1 levels remained elevated at 60 and 120 minutes. This sustained response became higher than glucose ($p<0.05$) and control ($p<0.05$) at 120 minutes, but not to saturated fat group, which remained stable at an intermediary level between MUFA and controls (Figure 1A). The mean area under the curve (AUC), which represented the total GLP-1 secretion load along the time after the lipid overload, was similar among groups (Figure 1B), and there were no differences between saturated and unsaturated in this analysis (Figure 1B). However 2 of 7 rats in MUFA group presented definitely increased response indicating a trend for increased response in this group.

PYY

MUFA overload provoked a 2,2x increase in PYY serum levels which was observed after 60 minutes compared to baseline ($p=0.042$), with a slight decrease at the 120 minutes (Fig 2A). This increase was significantly higher than water controls (CONT) at 30 ($p<0.05$), 60 ($p<0.05$) and 120 minutes ($p<0.05$) and higher compared to glucose (GLUC) at 60 minutes ($p<0.05$) (Figure 2A). This PYY peak in MUFA was higher than the saturated fat (SAT) group at 120 minutes ($p=0.02$). The area under the curve (AUC) was also significantly higher in the MUFA vs. CONT ($p=0.04$) (Figure 2B).

Insulin and Glucose

Insulin release was unchanged after MUFA or SAT overload. After glucose overload Insulin peaked at 15 minutes and remained increased in relation to controls at 30 ($p<0.05$) 60 and 120 minutes ($p<0.005$) (Figure 4A). As expected, glycemia and insulinemia excursions (AUC) were significantly higher only in the GLUC group

when compared to other groups as well as their released loads (Figure 3B and 4B). Glycemia in the GLUC group was higher at time points 15', 30', 60', 90' and 120' compared to all other groups. (Figure 3A).

Correlations

A significant linear positive correlation was found between GLP-1 and PYY at fasting ($r=0.57$; $p= 0.02$), and post overload (area under the curve) of GLP-1 and PYY ($r= 0.39$; $p\leq 0.001$) (Figures 5A and B).

We also found a significant correlation between fasting and post overload GLP-1 and PYY secretion after 120 minutes ($r= 0.62$; $p=0.002$ and $r=0.42$; $p= 0,011$ respectively) (Figures 5A and B).

DISCUSSION

In the present study we demonstrated that, in non-obese Wistar rats, monounsaturated fatty acid (MUFAs) overload can induce an acute and sustained increase in secretion of both GLP-1 and PYY an effect that is not seen with saturated fat overload. Insulin release, on the other hand, is not stimulated neither of both fat overloads.

In accordance with our findings, despite another via of administration, lakoubov et al(10) have been shown that intravenous and rectal infusion of long chain free fatty acids in rats promoted an 8-fold increase in GLP-1 secretion after long-chain FFA compared to short and medium-chain FFA against vehicle, 1h after the load. The sharp increase in relation to glp-1 secretion observed by that group was probably due to the rectal route of administration giving a higher exposure of L-cell in the distal ileum to macronutrients than using the oral route, once the ileum and colon are areas with the highest L-cell concentration. In the present study, however, we decided to use the oral administration to evaluate the response of GLP-1 in order to reproduce a more physiological way aiming to increase external validity of our experiment.

Evaluating the effect of long-term high-MUFA diet compared to an isocaloric standard diet and to a low glycemic index diet, authors have shown that MUFA is associated with increased fasting levels of GLP-1 and PYY (11). Although we have conducted an acute study, our current results extend these outcomes evidenced by the significant correlation found between baseline and post-overload in both GLP-1 and PYY.

This observation is in accordance to our findings since we reported a significant correlation between fasting and post overload GLP-1 and PYY secretion. In relation to PYY, some studies (25,26) indicate that lipid overload can increase PYY secretion (12). It was demonstrated in rats that intra-duodenal infusion of long-chain FFA such as fish-oil (20-22 carbons) and corn-oil (18 carbons) can increase total levels of PYY when compared to fasting levels and medium chain triacylglycerols. These findings are in accordance with our study since we also used a source of long-chain FFA olive oil, a 74% monounsaturated fat (MUFA) which contains 18 to 24 carbons, also.

Mechanisms involved in the stimulus for gut GLP-1 and PYY are still being elucidated. G-protein-coupled receptors (GPRs) can be found on the apical portion from L-cells lumen which role is to mediate nutrient induced satiety peptide secretion. Fatty acids bind to receptor site, evoke a specific increase in the intracellular calcium concentration, which triggers the phosphorylated kinase regulatory signal (ERK; p44/42), stimulating the release of GLP-1 and PYY by enteroendocrine L-cells (12-14).

Although vagal stimulus and GIP mediated secretion are also important(15), it has been suggested that luminal macronutrients at the gut play an important role in GLP-1 (16) and PYY (17) secretion. The presence of a G-protein-coupled receptor, named GPR 120, is abundantly expressed in the distal intestine, both in rats and humans, functioning as a receptor for unsaturated long-chain free fatty acids. Stimulatory activities were detected for free fatty acids with an unsaturated chain length of 16 to 22 carbons. Besides that, some membrane transport proteins associated at the L-cell membrane with fatty acids, as well as intracellular fatty acids binding proteins have been described to modulate Protein Kinase-C ζ (PKC ζ) activity in oleic acid-induced GLP-1 secretion(13, 18, 19).

Apparently, PYY release is stimulated by short chain fatty acids (SCFAs) which carbon chain length is about 2 up to 6 carbons. Another two G-protein coupled receptors, named GPR 41 and GPR 43, found in vitro and in vivo along L-cells from the small and large intestine (12, 20). It these GPRs act as receptors for SCFAs once in contact with it mediating the release of PYY by the intestinal L-cells.

However, it was not observed in our study the increase after SCFAs overload in serum levels of PYY. Instead, we found the increase of PYY release after the time 60 minutes in the MUFA (long chain) overload group. Furthermore, we also verified that MUFA group sustained a significantly more prolonged peak of PYY at time 120 minutes when compared to SAT (short chain) group.

As GLP-1 stimulus can generally result in reductions of blood glucose (10) and we were expecting that increases in GLP-1 would be able to stimulate the release of insulin through a beta-cell stimulus at the pancreas. However, in the present study, no such increase in insulin levels was seen after MUFA administration. We found that despite a huge amount of lipid overload was given, only a slight peak of GLP-1 was elicited that was not sufficient to elicit further stimulus in insulin secretion. Another possibility could that our study would not be

able to detect an insulin surge earlier than 15 minutes. However it is unlikely that it may have happened because glucose, which is a much faster insulinotropic stimulus, only showed a peak at 15 minutes, while insulin curve in MUFA group was flat. Comparison with other studies are difficult because we did not find similar studies with MUFA stimulus in insulin secretion in rats. A sustained peak of GLP-1 in both healthy and insulin resistant humans(21) and in rats after intravenous and rectal infusion of MUFAs (10). After all, we speculate that the GLP-1 peak induced by MUFA in the present study may be too short to have significant impact in the insulin secretion in this model. We believe that the MUFA effect in GLP-1 might not be relevant for inducing an acute significant alteration in the glucose-insulin relation at least in the time observed.

PYY release can be elicited by both macronutrient direct contact as well as by GPR41 and GPR43 (17, 22) in the intestinal lumen, by vagal tone stimulation or even by humoral stimulus through CCK release (23). In the present study our findings indicates that PYY stimulus may be a result from the type of the macronutrient rather than to gastric stimulation, because all groups were submitted to a equivalent gastric volume overload which was adjusted to rat weight and there was no response in PYY secretion after water overload in control group. As we did not measured CCK in the present study, we could not conclude in respect to its impact in PYY secretion.

As both PYY and GLP-1 are secreted by intestinal L-Cells it is not surprising that their secretion might be related to each other in vivo. Ballantynes et al., demonstrated that pharmacological infusions of GLP-1 can induce a decrease in basal PYY levels in humans, suggesting that GLP-1 augmentation directly inhibits PYY enteroendocrine L-cell secretion (24). Thus, GLP-1 would participate in a biofeedback loop which auto-regulates intestine L-cells secretion and down-regulates PYY release. In the present study, however, we did not confirm this finding, but we found it interesting that there was a strong correlation between GLP-1 and PYY, indicating that both peptides may be co-secreted by L-cells and also that the proportion of secretion (PYY to GLP-1 3:1) was similar in the fasting state as well as after MUFA overload. In this study it was impossible to define if any down-regulation occurred because we did not infuse any of these peptides.

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

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

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

REFERENCES

1. El Khoury D, El-Rassi R, Azar S, Hwalla N. Postprandial ghrelin and PYY responses of male subjects on low carbohydrate meals to varied balancing proportions of proteins and fats. *Eur J Nutr.* 2010 Dec;49(8):493-500.
2. Moller C, Sommer W, Thorsell A, Rimondini R, Heilig M. Anxiogenic-like action of centrally administered glucagon-like peptide-1 in a punished drinking test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002 Jan;26(1):119-22.
3. Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology.* 1988 Oct;123(4):2009-13.
4. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 1):E981-8.
5. Dossat AM, Lilly N, Kay K, Williams DL. Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake. *J Neurosci.* 2011 Oct 12;31(41):14453-7.
6. Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract Project Directly to the Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens to Control for Food Intake. *Endocrinology.* 2011 Nov 29.
7. Onaga T, Zabielski R, Kato S. Multiple regulation of peptide YY secretion in the digestive tract. *Peptides.* 2002 Feb;23(2):279-90.
8. Acosta A, Hurtado MD, Gorbatyuk O, La Sala M, Duncan D, Aslanidi G, et al. Salivary PYY: a putative bypass to satiety. *PLoS One.* 2011;6(10):e26137.
9. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 2002 Aug 8;418(6898):650-4.
10. Iakoubov R, Ahmed A, Lauffer LM, Bazinet RP, Brubaker PL. Essential role for protein kinase Czeta in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion in vivo in the rat. *Endocrinology.* 2011 Apr;152(4):1244-52.
11. Sloth B, Due A, Larsen TM, Holst JJ, Heding A, Astrup A. The effect of a high-MUFA, low-glycaemic index diet and a low-fat diet on appetite and glucose metabolism during a 6-month weight maintenance period. *Br J Nutr.* 2009 Jun;101(12):1846-58.

12. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;59 Suppl 2:251-62.
13. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005 Jan;11(1):90-4.
14. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11312-9.
15. Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ, Brubaker PL. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):580-91.
16. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Aug;297(2):G299-305.
17. Tazoe H, Otomo Y, Karaki S, Kato I, Fukami Y, Terasaki M, et al. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed Res*. 2009 Jun;30(3):149-56.
18. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, Whiteside CI, Brubaker PL. Protein kinase Czeta is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*. 2007 Mar;148(3):1089-98.
19. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1058-66.
20. Kaemmerer E, Plum P, Klaus C, Weiskirchen R, Liedtke C, Adolf M, et al. Fatty acid binding receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2010 Dec 15;1(5):147-53.
21. Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sanchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr*. 2007 Oct;26(5):434-44.
22. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-

acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 28;105(43):16767-72.

23. Burdyga G, de Lartigue G, Raybould HE, Morris R, Dimaline R, Varro A, et al. Cholecystokinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach. *J Neurosci*. 2008 Nov 5;28(45):11583-92.

24. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg*. 2006 May;16(5):651-8.

25. Maas, M. I. et al. Release of peptide YY and inhibition of gastric acid secretion by long-chain and medium-chain triglycerides but not by sucrose polyester in men. *Eur J Clin Invest*. 1998 Feb 28 (2);123-30.

26. Jonkers IJ, Ledebroer M, Steens J, Smelt AH, Masclee AA. Effects of very long chain versus long chain triglycerides on gastrointestinal motility and hormone release in humans. *Dig Dis Sci*. 2000 Sep; 45(9):1719–26.

Table 1. Baseline parameters

	CONT (n = 9)	GLUC (n = 9)	MUFA (n = 9)	SAT (n = 9)	<i>F statistic</i>
Weight (g)	290.37 ± 4.06	290.46 ± 5.49	289.19 ± 4.54	286.98 ± 3.51	$F(3, 32) = 0.13, p = 0.94$
Glycemia (mg/dl)	102.22 ± 3.70	103.56 ± 5.20	103.11 ± 7.74	102.67 ± 7.47	$F(3, 32) = 0.01, p = 1.00$
Insulinemia (pg/ml)	357.08 ± 87.50	465.72 ± 130.99	340.02 ± 58.99	381.01 ± 55.25	$F(3, 20.99) = 0.40, p = 0.76$
GLP-1 (pg/ml)	145.63 ± 7.53	142.21 ± 10.91	118.35 ± 16.12	127.56 ± 13.71	$F(3, 32) = 1.04, p = 0.39$
PYY (pg/ml)	49.02 ± 9.28	51.43 ± 11.31	35.19 ± 9.69	35.30 ± 4.50	$F(3, 32) = 0.92, p = 0.44$

Figure 1A. Acute time GLP-1 response after MUFA and SAT overload.

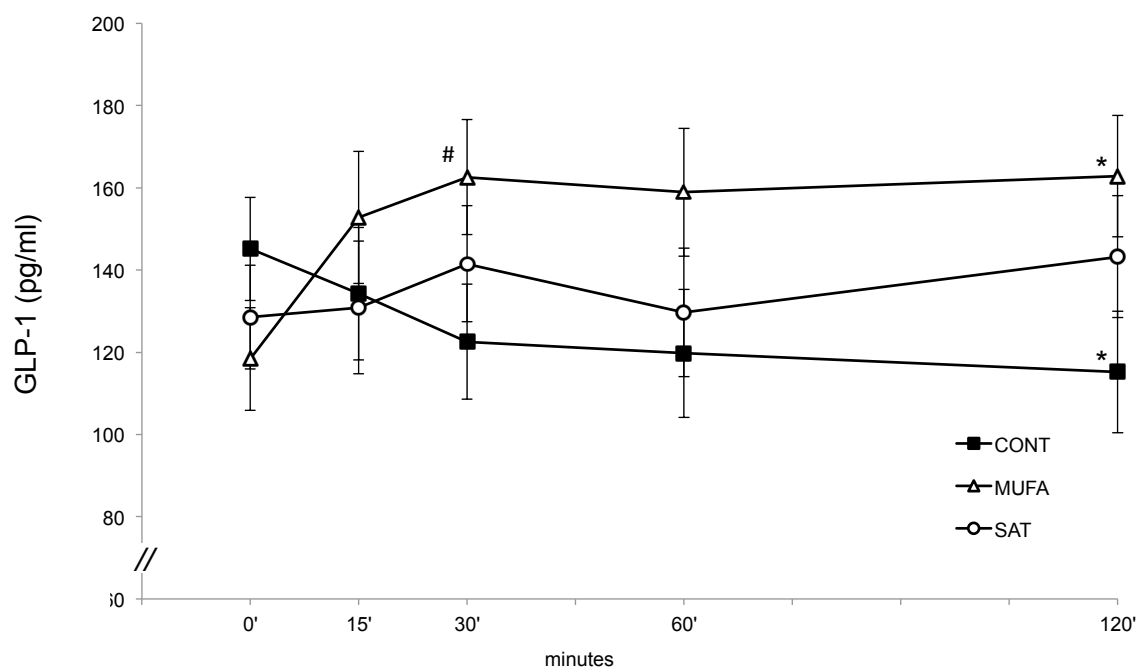


Figure 1a: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. (*) MUFA in relation to CONT at 120', $p < 0.05$. (#) MUFA in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group.

Figure 1B Acute total GLP-1 response after MUFA, SAT and Glucose overload. Area under the curve.

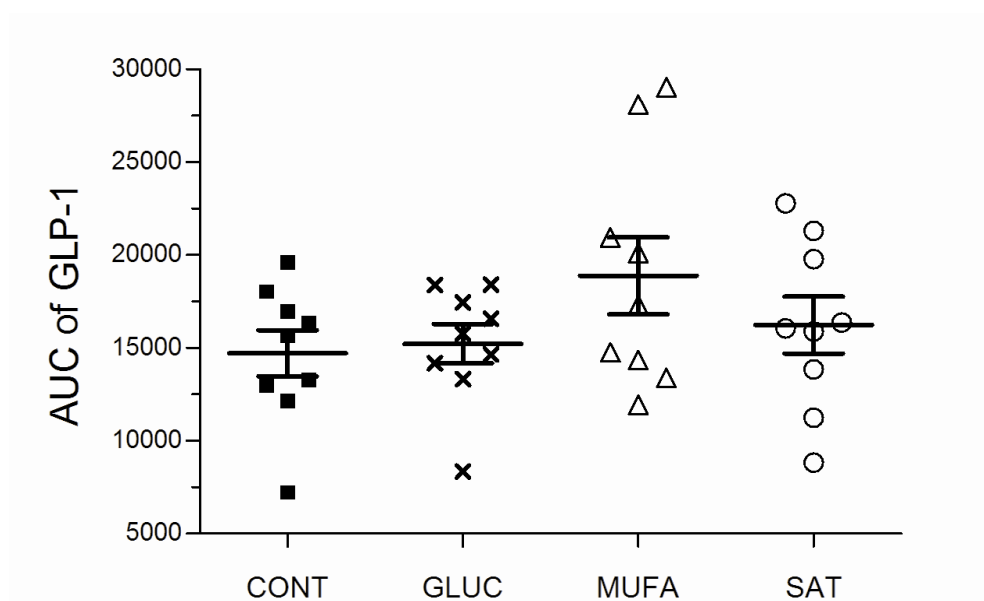


Fig. 1.b. The $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of GLP-1 did not differ between groups. ANOVA followed by Tukey post hoc, $n = 9$ per group. Values are mean \pm SE. $F(3, 35) = 1.48$, $p = 0.24$.

Figure 2A. Acute time PYY response after MUFA and SAT overload.

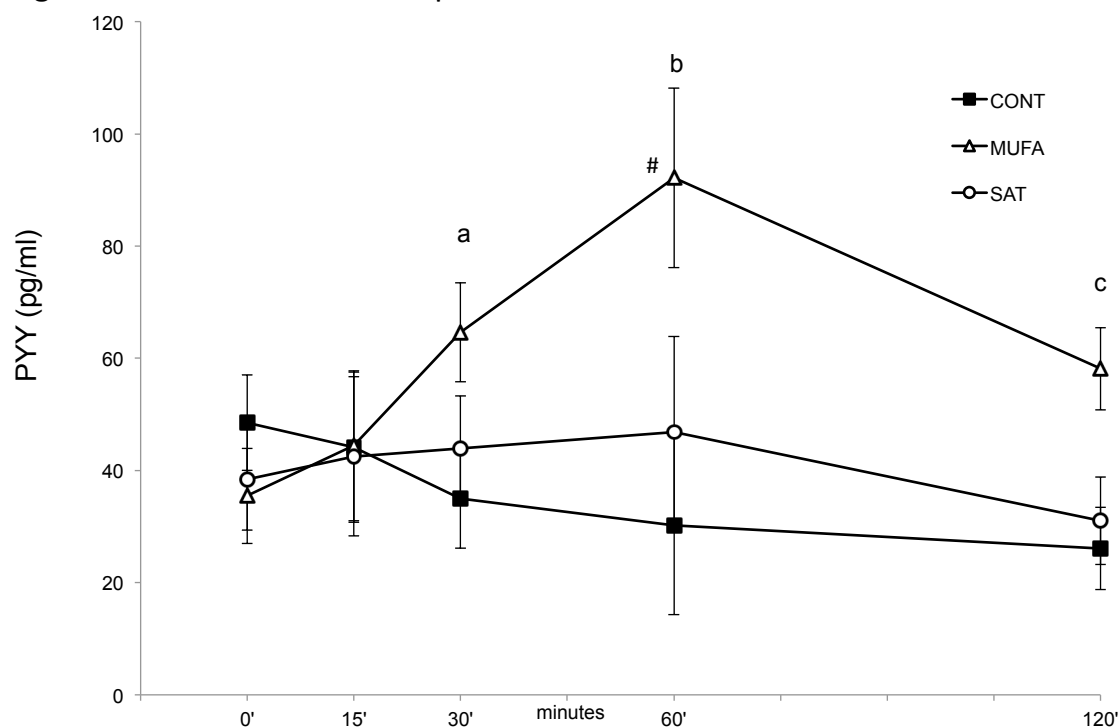


Fig 2a: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. $p < 0,05$: "a" MUFA vs CONT; "b" MUFA vs CONT and GLUC; "c" MUFA vs CONT and SAT. (#) MUFA (60') $p = 0,042$, in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group (8 for GLUC and SAT). $F(6.96, 67.29) = 3.67$, $p = 0.002$.

Figure 2B. Acute total PYY response after MUFA, SAT and Glucose overload: Area under the curve.

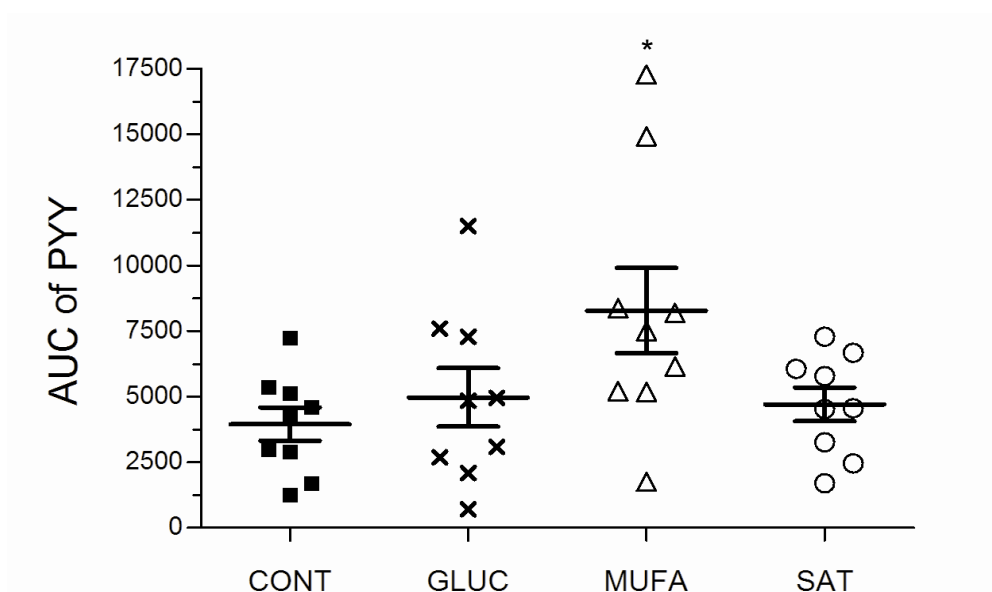


Fig. 2b: The $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of PYY was different between MUFA and CONT groups ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey post hoc, $n=9$ per group. Values are mean \pm SE.

Figure 3A. Acute time Glucose response after MUFA and SAT overload

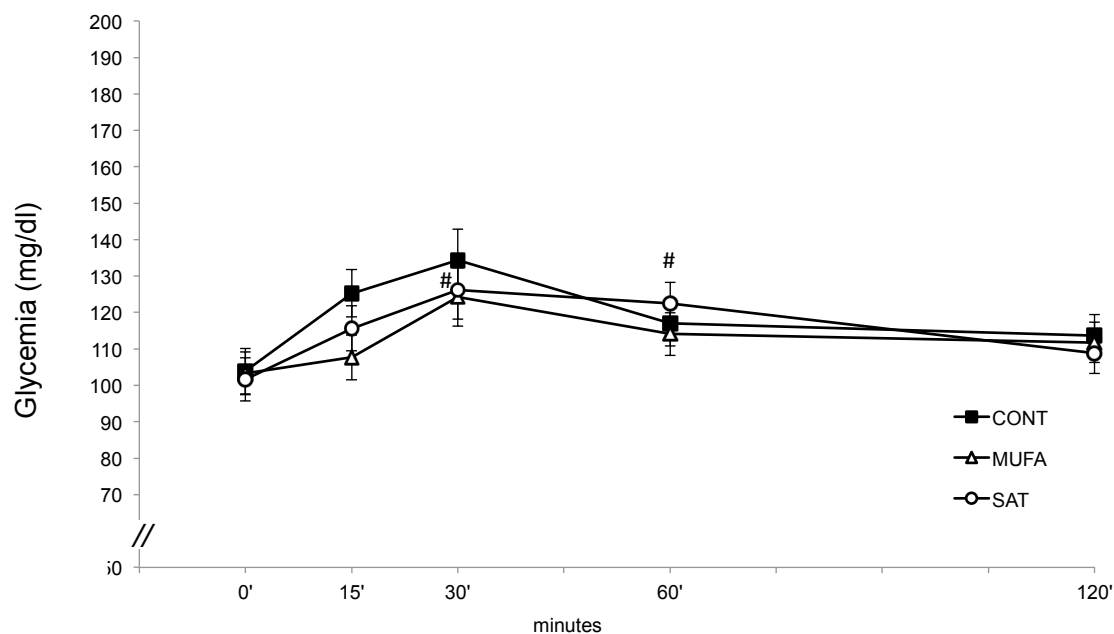


Figure 3a: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction. (#) SAT p 0,03 in relation to baseline and CONT (30', 60') $p < 0,05$ in relation to baseline. Error bars represent SE, $n = 9$ per group (8 for Control).

Figure 3B. Acute total Glucose concentration after MUFA, SAT and Glucose overload: Area under the curve.

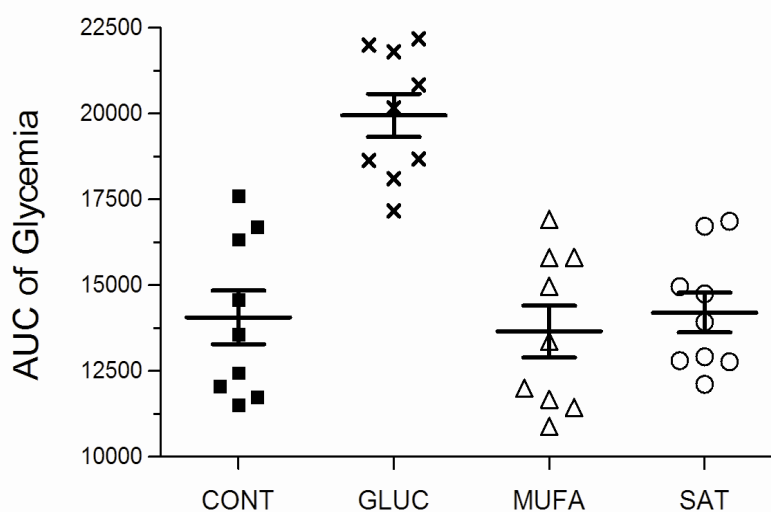


Fig. 3b: The GLUC group presented greater $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of glycemia in relation to others groups. ANOVA followed by Tukey post hoc, $n = 9$ per group. Values are mean \pm SE. $p < 0.001$. $F(3, 35) = 18.89$, $p < 0.001$.

Figure 4A. Acute time insulin response after MUFA and SAT overload.

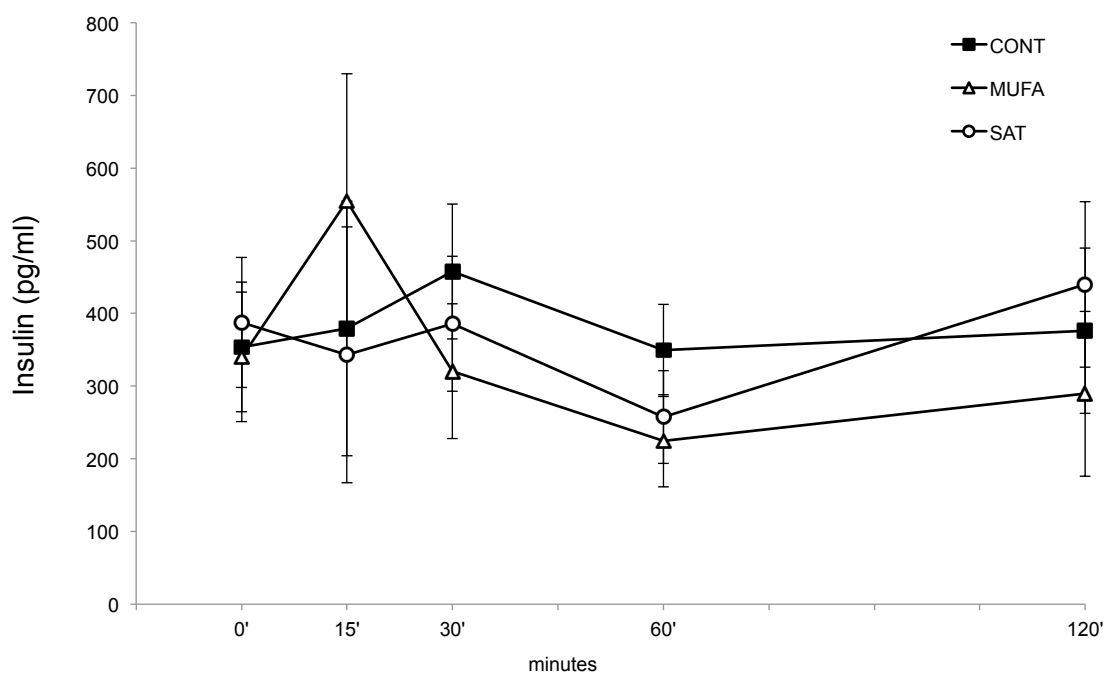


Figure 4a: Repeated measures ANCOVA with Bonferroni correction did not differ between groups. Error bars represent SE, n = 9 per group (8 for Control).

Figure 4B. Acute total secretory insulin response after MUFA, SAT and Glucose overload: Area under the curve.

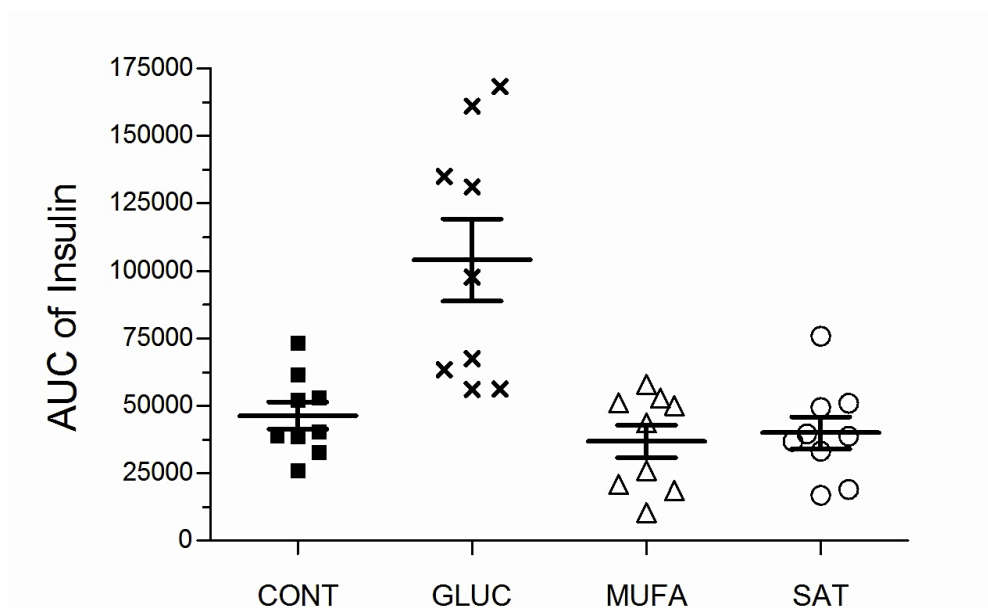


Fig. 4b: The GLUC group presented greater $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of insulin in relation to others groups. ANOVA followed by Tukey post hoc, n = 9 per group. Values are mean \pm SE. < 0.001 . $F(3, 35) = 12.31$, $p < 0.001$

Figure 5A. Correlation between the Fasting levels of GLP-1 and PYY

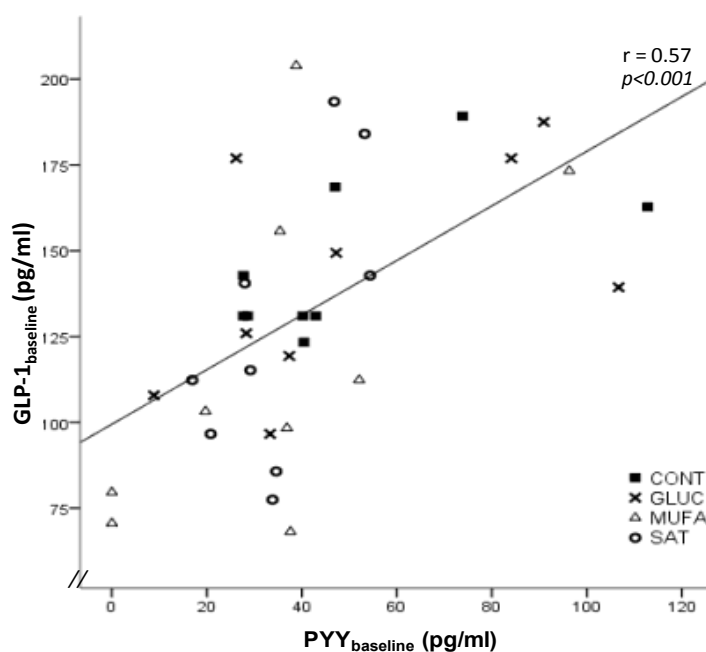


Fig.5a: Pearson correlation between GLP-1 and PYY at baseline indicate strong correlation at global, $r(34) = 0.57$, $p < 0.001$. There was no correlation when groups were evaluated separately.

Figure 5B. Correlation between the total Post overload GLP-1 and PYY secretion

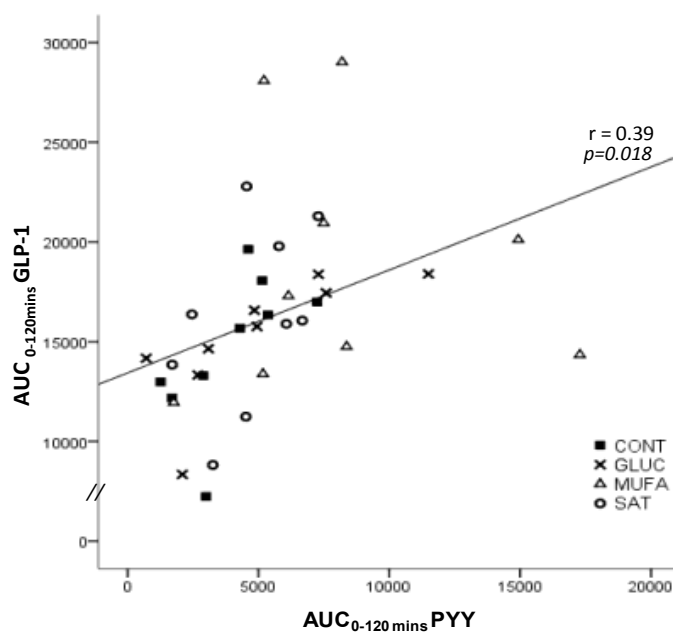


Fig.5b: Pearson correlation between $AUC_{0-120 \text{ mins}}$ of GLP-1 and PYY indicate regular correlation at global $r(34) = 0.39$, $p = 0.018$. When the groups were evaluated separately, the two variables were strongly correlated only in the GLUC group ($r(7) = 0.75$, $p = 0.02$).

Figure 5C. Correlation between the AUC 120min of GLP-1 and GLP-1 basal secretion

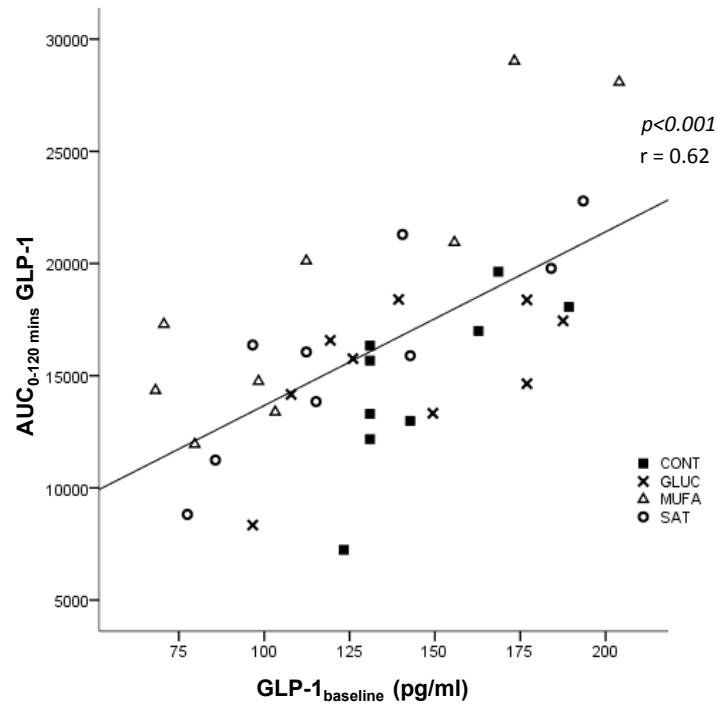


Fig 5C. Pearson correlation between AUC 120min of GLP-1 and GLP-1 at baseline.

Figure 5D. Correlation between the AUC 120min of PYY and PYY basal secretion

