

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BACHARELADO

**ALINE GABRIELY TORRES DUARTE**

**Efeito do tratamento *in vitro* com a Liraglutida sobre células epiteliais intestinais  
de ratos**

Maceió, AL

2023

**ALINE GABRIELY TORRES DUARTE**

**Efeito do tratamento *in vitro* com a Liraglutida sobre células epiteliais intestinais de ratos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, como requisito à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alagoas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Danielma dos Santos Reis

Máceió- AL

2023

**Catálogo na fonte Universidade Federal de  
Alagoas Biblioteca Central  
Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

D812e Duarte, Aline Gabriely Torres

Efeito do tratamento *in vitro* com a Liraglutida sobre células epiteliais intestinais de ratos / Aline Gabriely Torres Duarte. – 2023.

56 f. : il. color.

Orientadora: Maria Danielma dos Santos Reis.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 49-56.

1. Peptídeo 1 semelhante ao glucagon. 2. Fármacos. 3. Liraglutida. 4. Citotoxicidade. I. Título.

CDU: 577.112.6 : 615.451.1


## FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE GABRIELY TORRES DUARTE

### Efeito do tratamento *in vitro* com a Liraglutida sobre células epiteliais intestinais de ratos


Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao corpo da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas apresentado em 02 de Fevereiro de 2023.

#### Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 MARIA DANIELMA DOS SANTOS REIS  
Data: 07/02/2023 10:44:49-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>


---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dra. Maria Danielma dos Santos Reis  
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente  
 LUCAS SOUSA MAGALHAES  
Data: 07/02/2023 21:30:20-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Examinador Interno: Prof. Dr. Lucas Sousa Magalhães  
(Universidade Federal de Alagoas)

Documento assinado digitalmente  
 TAYHANA PRISCILA MEDEIROS SOUZA  
Data: 10/02/2023 11:12:12-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Examinadora Externa: Prof<sup>ª</sup>.Dra. Tayhana Priscila Medeiros Souza  
(Faculdade Pitágoras)

*Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida: Deus, pela força nos momentos mais difíceis e Angela Maria Torres Duarte (minha mãe), pela dedicação, amor e ser a minha maior inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo amor, proteção e fortalecimento nos dias mais sombrios.

Aos meus pais, em especial minha mãe, pela compreensão, amor e todo suporte durante a graduação.

Ao professor Beto Barros por apresentar-me a Biologia e ter contribuído para minha aprovação no vestibular.

À Universidade Federal de Alagoas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas. Como também a Pró- reitoria estudantil pela concessão de bolsas de assistência estudantil, que foi de grande contribuição para minha permanência na faculdade.

Aos organizadores da Semana da biologia por introduzir e divulgar com tanto amor essa área fenomenal.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas por todo aprendizado compartilhado, sendo essenciais na minha formação.

À Professora Doutora Salette Smaniotto pelo incentivo e por ter sido a responsável por apaixonar-me pela área de morfologia.

À Professora Doutora Vanessa Doro Abdallah pela amizade e oportunidade de fazer iniciação científica em seu laboratório.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Danielma dos Santos Reis, pelo carinho, aprendizagem, apoio e fazer-me amar trabalhar com essas células maravilhosas.

Ao laboratório de biologia celular que foi fundamental para a execução da minha pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, por todas as contribuições relevantes para melhoria do meu trabalho.

A minha amiga de laboratório, Everlaine Leite Estevam dos Santos Silva, pela colaboração, amizade e pelos momentos descontraídos, tornando os experimentos mais leves.

Ao meu amigo João Mateus Silva Feitoza pela amizade, força e por ter colaborado com o meu trabalho.

A minha amiga Monique Melo pela amizade e companheirismo nos momentos mais difíceis .

## RESUMO

Os análogos do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) são uma nova classe de medicamentos desenvolvida com o propósito de prolongar os efeitos fisiológicos do GLP-1 endógeno humano. Dentre esses fármacos, a Liraglutida se destaca por sua importância no controle de peso e na regulação dos níveis de glicose no sangue. No entanto, existem pesquisas que evidenciaram alguns efeitos adversos nos pacientes devido ao tratamento com a Liraglutida. O trato gastrointestinal foi um dos sistemas mais afetados, em que cerca de 81% dos pacientes relataram sentir, principalmente, náuseas, dores abdominais, diarreias e vômitos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos da Liraglutida nas células epiteliais do intestino de ratos normais (IEC-6), com o propósito de evidenciar as possíveis ações citotóxicas desencadeadas por esse fármaco. Para isso, as células IEC-6 foram tratadas com o cloridrato de Liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk) nas concentrações 1, 0,5 e 0,25  $\mu\text{M}$  diluídas em DMEM 2% SBF por 24 horas. A viabilidade celular foi verificada através da absorbância do MTT pelas células IEC-6. Já a taxa de apoptose e necrose das células foi avaliada pela verificação da degradação do DNA utilizando os corantes laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), ao microscópio de fluorescência. Também foi realizado um ensaio de morfologia, com o propósito de verificar alterações morfológicas e a disposição das fibras de actina nas células IEC-6. Neste experimento as células foram marcadas com faloidina conjugada a fluoresceína e visualizadas ao microscópio de fluorescência. Para analisar a motilidade das células IEC-6 foi aplicado o ensaio de *Scratch Wound Healing*, em que a migração das células foi acompanhada no microscópio de luz invertido até o fechamento de uma área livre de células. Por fim, a confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 7.00. Foi verificado que o tratamento com a Liraglutida não diminuiu a viabilidade das células nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ . Além disso, foi visto que o tratamento com o fármaco diminuiu a taxa de apoptose das células IEC-6 quando comparado ao controle. No ensaio de morfologia foi observado que algumas células tratadas com a Liraglutida possuíam estruturas mais alongadas e diminuição do citoplasma. Além disso, as células tratadas apresentaram fibras de estresse proeminentes. Ao se analisar a taxa de migração celular, foi observado uma diminuição no percentual de fechamento da área livre de células, principalmente no tempo de 24 horas, quando comparadas às células não-tratadas. Os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento com a Liraglutida diminuiu a taxa de apoptose, interfere na disposição do citoesqueleto de actina e reduz a migração celular em células IEC-6. Contudo, mais estudos são necessários para determinar o papel deste fármaco na fisiologia das células intestinais.

**Palavras- Chave:** análogos do GLP-1; efeitos citotóxicos; IEC-6; incretinomiméticos.

## ABSTRACT

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogues are a new class of drugs developed to prolong the physiological effects of human endogenous GLP-1. Among these drugs, Liraglutide stands out for its importance in weight control and the regulation of blood glucose levels. However, some studies have shown some adverse effects in patients due to treatment with Liraglutide. The gastrointestinal tract was one of the most affected systems, in which about 81% of the patients reported mainly nausea, abdominal pain, diarrhea, and vomiting. Thus, the objective of this study was to evaluate *in vitro* the effects of Liraglutide on intestinal epithelial cells of normal rats (IEC-6) to highlight the possible cytotoxic actions triggered by this drug. IEC-6 cells were treated with Liraglutide (Victoza®, Novo Nordisk) at concentrations of 1, 0.5, and 0.25 M diluted in DMEM 2% containing fetal bovine serum for 24 hours. Cell viability was verified through MTT absorbance by IEC-6 cells. Apoptosis and necrosis of cells exposed to Liraglutide were evaluated by checking DNA degradation using acridine orange (AO) and propidium iodide (PI) dyes under a fluorescence microscope. A morphology assay was also carried out to verify morphological changes and the arrangement of actin fibers in IEC-6 cells. In this experiment, cells were stained with phalloidin conjugated to fluorescein and visualized under a fluorescence microscope. To analyze the motility of IEC-6 cells, the scratch wound healing assay was applied, in which cell migration was monitored under an inverted light microscope until the closure of an area free of cells. The graphics and statistical analyses were done using the GraphPad Prism program, version 7.00. The treatment with Liraglutide did not decrease cell viability at concentrations of 0.25, 0.5, and 1 M. Furthermore, the drug treatment decreased the rate of apoptosis in IEC-6 cells when compared to the control. In the morphology test, it was observed that some cells treated with Liraglutide had more elongated structures and decreased cytoplasm. Furthermore, the treated cells showed prominent stress fibers. When analyzing the cell migration, a decrease in the percentage of closure of the cell-free area was observed, mainly at 24 hours, compared to non-treated cells. These results showed that treatment with Liraglutide decreased apoptosis, interfered with the disposition of the actin cytoskeleton, and reduced cell migration in IEC-6 cells. However, further studies are needed to determine the role of this drug in the physiology of intestinal cells.

**Keywords:** GLP-1 analogues; cytotoxic effects; IEC-6; incretinomimetics.



## **LISTA DE FIGURAS**

GRÁFICO 01- Percentual de viabilidade das células IEC-6 após tratamento com diferentes concentrações de Liraglutida .....	36
---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

FIGURA 01- Fotomicrografia de um corte histológico do intestino delgado .....	17
FIGURA 02- Epitélio intestinal com foco nas células epiteliais absortivas (enterócitos).....	18
FIGURA 03- Renovação celular no epitélio do intestino delgado e grosso .....	19
FIGURA 04- Células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6) visualizadas ao microscópio de luz invertido.....	21
FIGURA 05- Secreção do GLP-1 .....	23
FIGURA 06- Órgãos e tecidos-alvo do GLP-1 e seus efeitos .....	24
FIGURA 07- Efeitos do GLP-1 ou dos análogos do GLP-1 no organismo em condições experimentais.....	26
FIGURA 08- Composição molecular do GLP-1 humano e da Liraglutida.....	27
FIGURA 09- Efeitos da Liraglutida sobre as células epiteliais intestinais .....	48

## LISTA DE TABELAS

PAINEL 1- Análise morfológica das células IEC-6 após a marcação com o laranja de acridina e iodeto de propídio .....	37
PAINEL 2- Efeito da Liraglutida sobre a apoptose e necrose das células intestinais epiteliais de ratos após 24 horas de tratamento .....	38
PAINEL 3- Percentual de células apoptóticas, necróticas e viáveis após tratamento com Liraglutida.....	39
PAINEL 4- Efeito da Liraglutida na morfologia das células IEC-6 .....	40
PAINEL 5- Efeito da Liraglutida sobre disposição das fibras de F-actina na linhagem IEC-6 .....	41
PAINEL 6- Efeito da Liraglutida na migração das células IEC-6 .....	42
PAINEL 7- Percentual de migração das células IEC-6- tratadas com Liraglutida.....	43
PAINEL 8- Efeito da Liraglutida sobre a migração das células IEC-6 após 24 horas de tratamento. ....	44

## **LISTA DE PAINÉIS**

TABELA 1- Farmacocinética dos principais incretinomiméticos .....	26
TABELA 2- Efeitos da Liraglutida .....	28

## LISTA DE TABELAS

**ALT-** Alanina aminotransferase

**AKT-** Serina/treonina quinase

**AKT1-** Serina/treonina quinase 1

**Bax-** Proteína x associado a BCL2, Regulador de morte

**Bcl2-** Linfoma 2 de células B, Regulador de morte

**Bcl-xL/Bcl-2 (BAD)-** Homólogo promotor de morte associado

**BCRJ-** Banco de Células do Rio de Janeiro

**cAMP-** Monofosfato cíclico de adenosina

**DAPI- 4'6-** 4',6-diamidino-2-phenylindole

**DMEM-** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO-** Dimetilsulfóxido

**DPP-IV-** Enzima dipeptidil peptidase IV

**eNos-** Óxido nítrico endotelial

**ERK 1/ 2-** Quinase extracelular regulada por sinal 1 e 2

**ERK-** Quinase extracelular regulada por sinal

**GIP-** Peptídeo insulinotrópico dependente de glicose

**GLP-1-** Peptídeo 1 semelhante ao glucagon

**GLP1-R-** Receptor do Peptídeo 1 semelhante ao glucagon

**GRP-** Peptídeo liberador de gastrina

**GSK3 $\beta$ -** Glicogênio sintase quinase 3  $\beta$

**HbA1c-** Hemoglobina glicada

**HGF-** Fator de crescimento de hepatócitos

**HO-1-** Heme oxigenase

**ICAM-1-** Molécula de adesão intercelular 1

**IL-12-** Interleucina 12

**IL-1b-** Interleucina 1b

**IL-6-** Interleucina 6

**IP-** Iodeto de propídio

**ISL-1-** ISL LIM homeobox 1

**LA-** Laranja de Acridina

**MDA-** Malondialdeído

**mTOR-** Alvo mecanista da Rapamicina quinase

**NEP 24.11-** Endopeptidase neutra 24.11

**Nrf-2-** Fator nuclear derivado de eritróide 2

**P13K, PI-3K, PI3- quinase, PI 3- quinase -** Fosfoinosítídeo 3-quinase

**p70S6K-** Proteína ribossomal S6 quinase  $\beta$ -1

**PAI-I-** Inibidor 1 do ativador do Plasminogênio

**PBS-** Phosphate Buffered Saline

**PDK1-** Piruvato desidrogenase quinase 1

**Pdx-1-** Proteína homeobox pancreático e duodenal

**PKC, PKC $\beta$ IF-** Proteína quinase C

**PPAR $\beta$ - $\delta$ -** Receptor  $\delta$  ativado por proliferador de peroxissoma

**POMC-** pro opiomelanocortina

**SBF-** Soro bovino fetal

**SOD-** Superóxido dismutase

**TGF- $\beta$ -** Fator de crescimento transformador  $\beta$

**TNF- $\alpha$ -** Fator de necrose tumoral

**VCAM-1-** Molécula de adesão celular vascular

## SÚMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
	2.1 Objetivo Geral .....	16
	2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
	3.1 Epitélio Intestinal.....	17
	3.2 Peptídeo-1 semelhante ao glucagon .....	21
	3.3 Análogos do peptídeo-1 semelhante ao glucagon.....	25
	3.3.1 Liraglutida .....	26
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	31
	4.1 Cultivo celular .....	31
	4.2 Tratamento <i>in vitro</i> .....	31
	4.3 Ensaio de viabilidade celular.....	32
	4.4 Quantificação de apoptose e necrose celular.....	32
	4.5 Análise morfológica .....	33
	4.6 Ensaio de migração celular.....	34
	4.7 Análises estatísticas .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
	5.1 Efeito da Liraglutida sobre a viabilidade de células intestinais .....	36
	5.2 Avaliação da morte celular em células intestinais tratadas com Liraglutida	37
	5.3 Efeito da Liraglutida sobre a morfologia de células intestinais.....	39
	5.4 Análise de migração celular das células intestinais durante o tratamento com Liraglutida .....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49





## 1 INTRODUÇÃO

O sistema incretina é composto principalmente pelos hormônios peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1). A principal função dessas moléculas é aumentar a secreção de insulina dependente de glicose através da ingestão de alimentos (CAMPBELL; DRUCKER, 2013). Dentre as incretinas, o GLP-1 se destaca por seu importante papel em órgãos centrais como intestino, fígado e pâncreas, além de exercer funções neuroprotetoras e cardioprotetoras (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Todavia, o GLP-1 endógeno apresenta uma meia vida plasmática de curta duração, cerca de 2 minutos, sendo rapidamente degradado pela enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) (DEACON, *et al.*, 1995).

Com o objetivo de prolongar as funções benéficas do GLP-1 no organismo, foram desenvolvidos incretinomiméticos resistentes a ação da DPP-IV. Essa nova classe de medicamentos ficou conhecida como análogos do GLP-1, tendo como função primordial a regulação dos níveis glicêmicos (BAGGIO; DRUCKER, 2007). De início esses medicamentos foram aprovados para utilização no tratamento do diabetes mellitus 2, porém verificaram que os pacientes tratados com os análogos do GLP-1 apresentavam redução de peso. Uma possível explicação para esse efeito se deve a ação dos análogos do GLP-1 em regiões do cérebro responsáveis pelo controle da fome, aumentando a saciedade (NOVO NORDISK, 2019).

Dentre os medicamentos sintéticos do GLP-1, a Liraglutida se destaca por sua importância no controle de peso e na regulação dos níveis de glicose no sangue. A principal característica desse análogo deve-se a forte homologia da sua estrutura molecular com o GLP-1 endógeno. Vários estudos relatam as funções da Liraglutida na redução de peso (NOVO NORDISK, 2019), na melhora da função cardíaca (GASPARI, *et al.*, 2011), na proteção contra doenças neurodegenerativas (IWAI, *et al.*, 2006; MCCLEAN; HÖLSCHER, 2014) e na esteatose hepática (OHKI *et al.*, 2012; GAO, *et al.*, 2015). No entanto, pesquisas indicam que o tratamento com a Liraglutida pode provocar efeitos adversos em humanos. Um estudo clínico investigou a segurança e a eficácia da Liraglutida em pacientes com esteatose hepática não-alcoólica e foi demonstrado que cerca de 88% dos indivíduos apresentaram efeitos adversos (ARMSTRONG, *et al.*, 2015). Nessa pesquisa, o trato gastrointestinal foi o sistema mais afetado pelo análogo, com cerca de 81% dos pacientes apresentando, principalmente, episódios de diarreia, náusea, dor abdominal e vômitos. Em outro trabalho, Sun, *et al.* (2012) verificou

maior incidência de diarreia em pacientes tratados com a Liraglutida nas concentrações de 1,2 e 1,8 mg/ml. Outro fato preocupante é a suspensão do tratamento devido aos eventos adversos. Com base nisso, a pesquisa Exenatide SPC (2014) demonstrou que cerca de 4% dos pacientes submetidos ao tratamento com a Exenatida, também um análogo do GLP-1, desistem por causa de episódios de náuseas.

Acredita-se que o aumento de náuseas em decorrência do tratamento com análogos do GLP-1 esteja relacionado à função de esvaziamento gástrico realizada por esses fármacos (FILIPPATOS, *et al.*, 2014). Porém são escassos os trabalhos que possuem o objetivo de testar a segurança dos análogos do GLP-1, resultando assim que os pacientes abandonem o tratamento e busquem novas terapias com eficácia duvidosa. Além disso, observa-se a necessidade de mais pesquisas relatando a interação da Liraglutida com as células epiteliais intestinais, visto o papel essencial que essas células apresentam para homeostasia do trato gastrointestinal. Dessa forma, neste estudo, foi avaliado *in vitro* os efeitos da Liraglutida nas células epiteliais do intestino de ratos, com o propósito de evidenciar as possíveis ações citotóxicas desencadeadas por esse fármaco.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Examinar os efeitos da exposição *in vitro* à Liraglutida em células epiteliais intestinais de ratos

### **2.2 Objetivos Específicos**

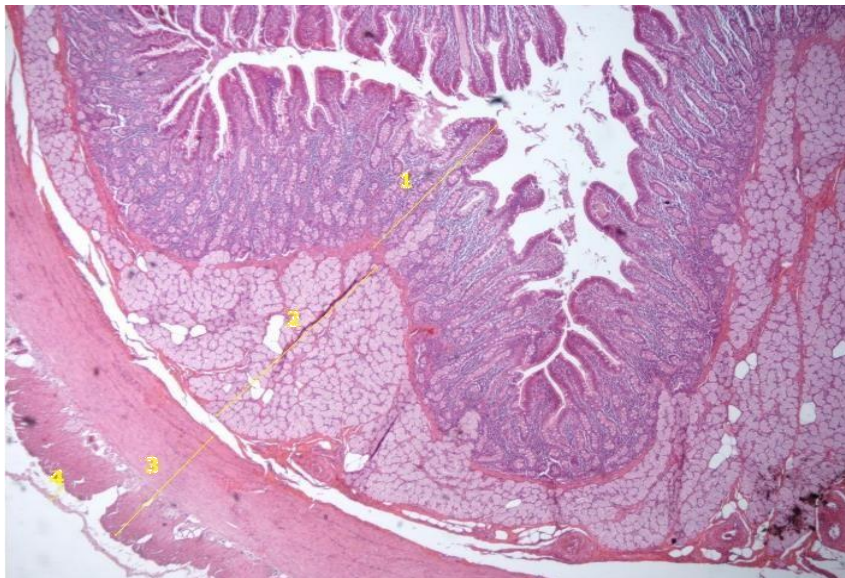
- Analisar a viabilidade das células após a exposição *in vitro* à Liraglutida;
- Quantificar apoptose e necrose nas células epiteliais intestinais após tratamento *in vitro* com a Liraglutida;
- Analisar a morfologia das células epiteliais intestinais após a exposição *in vitro* à Liraglutida;
- Analisar a migração de células epiteliais intestinais após o tratamento *in vitro* com Liraglutida.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Epitélio Intestinal

Dentre as estruturas que compõem o trato gastrointestinal, o intestino se destaca por sua grande capacidade de absorção, digestão, reabsorção de água e íons. O intestino possui quatro camadas formadas pelos seus respectivos tecidos: camada mucosa, composta pelo epitélio intestinal, tecido conjuntivo (lâmina própria) e tecido muscular (muscular da mucosa); camada sub-mucosa, contendo tecido conjuntivo e algumas glândulas; camada muscular com tecido muscular liso formando uma túnica circular interna e uma túnica longitudinal externa; camada serosa, composta por uma membrana mesentérica formada por células mesoteliais que revestem o abdômen (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

**Figura 1.** Fotomicrografia de um corte histológico do intestino delgado.

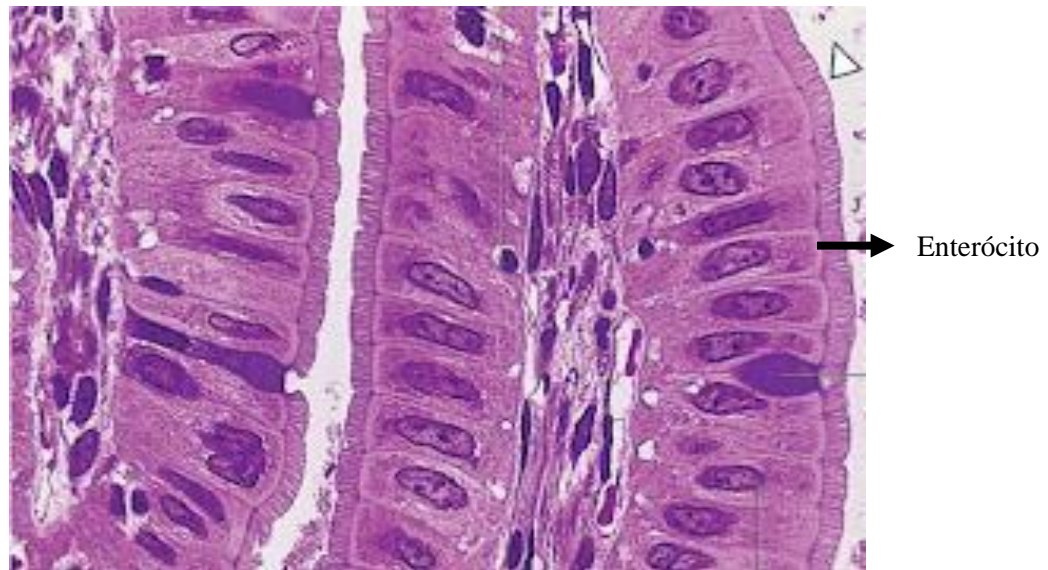


As numerações estão indicando as camadas do intestino delgado. **1.** Mucosa. **2.** Submucosa. **3.** Muscular. **4.** Serosa. **Fonte:** Camillo (2012).

O epitélio intestinal é composto por uma camada simples de células especializadas responsáveis pela homeostasia do sistema digestivo. No interior dessa camada são encontradas as células absorptivas (enterócitos), células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth, células-tronco e células M. As células absorptivas são o tipo celular mais abundante do epitélio intestinal, cuja principal função é absorver os nutrientes produzidos durante a digestão. Em relação à morfologia, os enterócitos são células epiteliais colunares com um núcleo oval

disposto de maneira basal e apresentam em sua superfície uma camada homogênea de microvilosidades formando a borda em escova (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

**Figura 2.** Epitélio intestinal com foco nas células epiteliais absorptivas (Enterócitos).



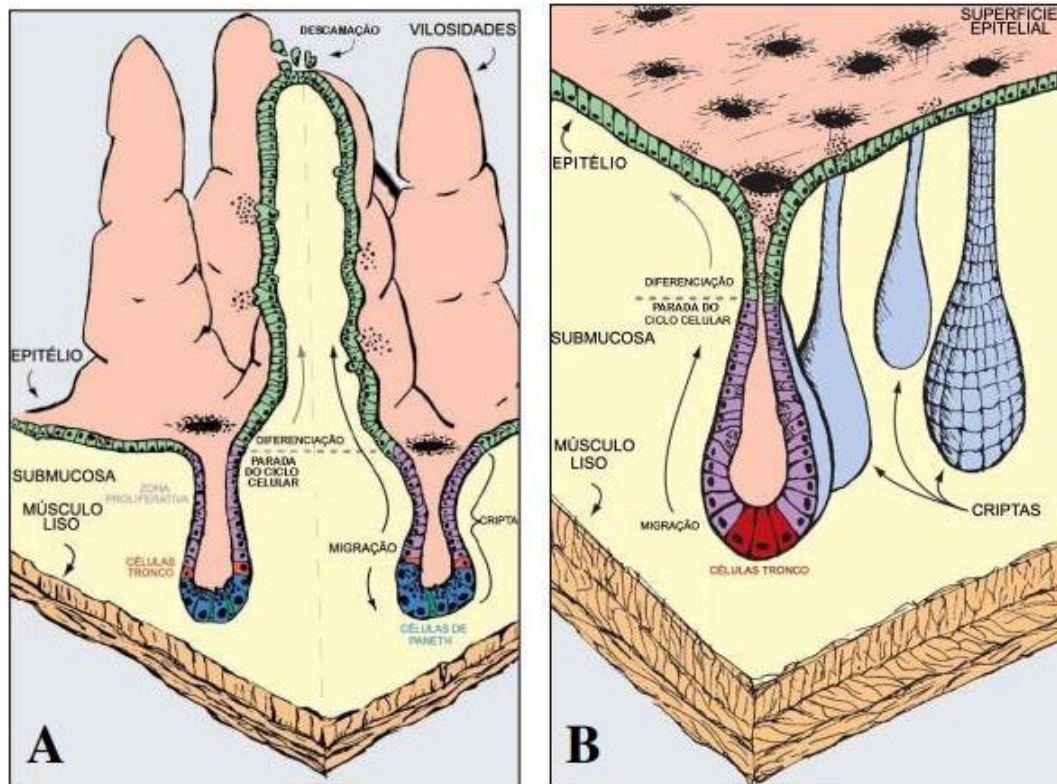
**Fonte:** Junqueira e Carneiro (2011).

Nos enterócitos, os nutrientes podem ser transportados através do transporte transcelular (atravessando a célula) ou transporte paracelular (entre as células adjacentes) (SNOECK; GODDEERIS; COX, 2005). Moléculas menores, como aminoácidos e íons, entram nas células por canais ou bombas iônicas acopladas na membrana (CONNER; SCHMID, 2003). Em contrapartida, macromoléculas passam pelo processo de endocitose, estritamente ligada a pinocitose (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Esse processo consiste na invaginação da membrana plasmática a partir do contato com as partículas alimentares, formando vesículas digestivas (pinossomos).

Devido ao contato com substâncias tóxicas e microrganismos, o epitélio intestinal é renovado constantemente (Figura 3). Estima-se que esse processo ocorra a cada 3-4 dias, com início na cripta intestinal, a partir de células-tronco (CHENG, 1974b). As células-tronco residem nas criptas, acima das células de Paneth e tem como função primordial a produção das células do epitélio intestinal (LOEFFLER *et al.*, 1993; SANCHO; BATLE; CLEVERS, 2004). Durante a renovação do epitélio, as células progenitoras proliferam ao longo da superfície epitelial até a junção cripta-vilosidade, expressam marcadores de diferenciação e fornecem novas células epiteliais. Após o período de diferenciação, os enterócitos, as células enteroendócrinas e as células caliciformes migram até o topo das vilosidades (CHENG;

LEBLOND, 1974a), enquanto as células de Paneth migram para baixo em direção às criptas. Esse processo migratório dura aproximadamente 5 dias (SNOECK; GODDEERIS; COX, 2005). Ao chegar no ápice das vilosidades ou na superfície colorretal, as células epiteliais morrem e são expelidas para o lúmen intestinal (HALL *et al.*, 1994).

**Figura 3.** Renovação celular no epitélio do intestino delgado e grosso.



**A.** No intestino delgado, as células-tronco ficam situadas nas criptas acima das células de Paneth e são responsáveis por produzir as células epiteliais. A proliferação celular é finalizada no eixo cripta-vilosidades. No final do processo, o epitélio sofre descamação e as células epiteliais são expelidas para o lúmen intestinal **B.** O intestino grosso é desprovido das células de paneth e vilosidades. **Fonte:** Moreira (2017).

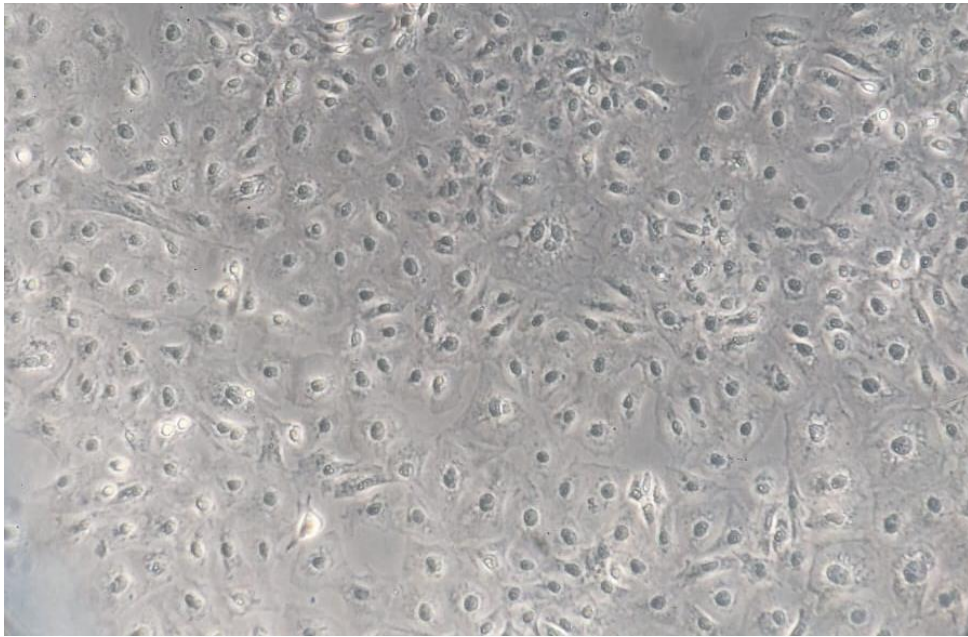
A integridade do epitélio intestinal é essencial por fornecer uma barreira física e imunológica contra toxinas e agentes microbianos. A barreira física é mantida através das junções intercelulares presentes nas células epiteliais (GUMBINER, 1993). Outro mecanismo físico mantido pelo epitélio intestinal é a formação da camada de muco. As células caliciformes produzem as mucinas, proteínas responsáveis pela sintetização de muco, que podem ser encontradas fixadas na membrana celular formando um gel contínuo (PEREZ-VILAR; HILL, 1999; DESSEYN *et al.*, 2000). Essas proteínas fornecem ao epitélio a manutenção do PH

neutro, uma camada permeável seletiva, lubrificação do epitélio e proteção contra a acidez do lúmen e agentes patológicos (MONTAGNE; PIEL; LALLES, 2004; OSWALD, 2005). Além disso, as células epiteliais têm um papel crucial na resposta imune inata e adaptativa do organismo, com a produção de quimiocinas e citocinas e são capazes apresentar antígenos (STADNYK, 2002). Estudos demonstraram que os enterócitos expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II em sua membrana basolateral, local em que interagem com os linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria (KAISERLIAN; VIDAL; REVILLARD, 1989; MAYRHOFE; SPARGO, 1990; BRANDEIS *et al.*, 1994; HERSHBERG *et al.*, 1997; HERSHBERG *et al.*, 1998). Segundo Hershberg e Mayer (2000), quando a integridade das junções aderentes está comprometida pode haver a passagem de antígenos luminiais para a membrana basolateral, se tornando imunogênico.

Linhagens de células epiteliais intestinais são bastante usadas em modelos de estudos farmacológicos. Dentre esses modelos, a linhagem obtida do intestino de ratos IEC-6 ( células epiteliais intestinais de ratos) se destaca por seu amplo uso em pesquisas por novos alvos terapêuticos contra agentes microbianos e para diabetes mellitus 2 (Figura 4). Kojima e colaboradores (2002) demonstraram que as células IEC-6 podem se diferenciar em células enteroendócrinas e endócrinas, por meio da expressão combinada da proteína homeobox pancreático e duodenal 1(PDX-1) e da ISL LIM homeobox 1 (ISL-1), tornando-se capazes de produzir insulina. Estudos identificaram que o teor de insulina plasmática nas células IEC-6 diferenciadas são maiores do que as encontradas em condições normais (KOJIMA; *et al.*, 2002. YOSHIDA; *et al.*, 2002).

Além disso, existem trabalhos pré-clínicos utilizando as células IEC-6 para avaliar o efeito citotóxico de substâncias com potencial terapêutico para o tratamento de mucosite intestinal e infecção entérica. No estudo de Zanchett (2017), foi possível identificar o efeito citoprotetor de flavonóides nas células IEC-6 contra a ação de irunotecano, agente causador da mucosite. Usando essa mesma abordagem, foi demonstrado que micronutrientes, como a glutamina, alanil-glutamina,  $\beta$ -caroteno, zinco e do leite de cabra transgênico, possuem ação protetora na infecção de *Escherichia coli* em células IEC-6 (CARVALHO, 2011).

**Figura 4.** Células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6) visualizadas ao microscópio de luz invertido.



Aumento de 200x. **Fonte:** Próprio Autor.

### 3.2 Peptídeo-1 semelhante ao glucagon

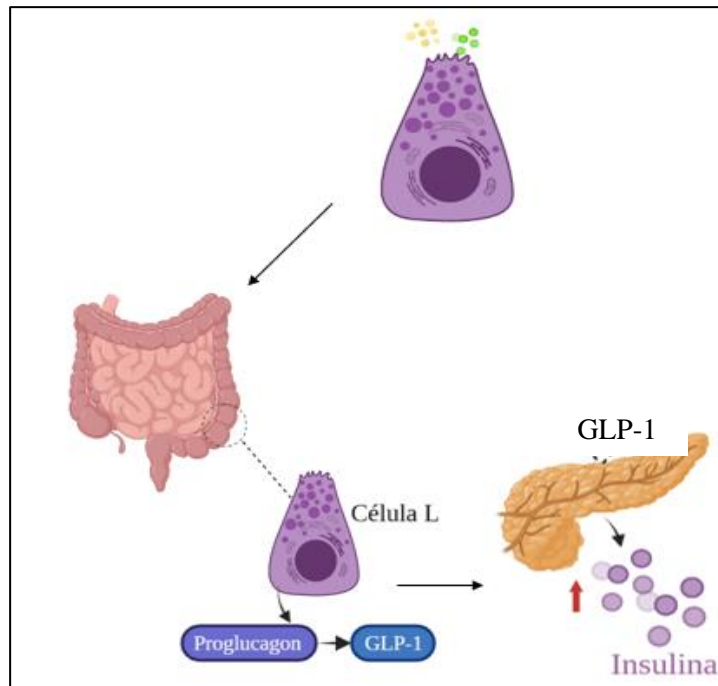
Desde o início do século XX, acreditava-se na existência de mediadores produzidos no intestino que estimulavam a secreção de insulina em resposta a ingestão de nutrientes, esses fatores foram primeiramente denominados como secretinas (BAYLISS; STARLING, 1902; MOORE, *et al.*, 1906). A partir de 1920, o termo incretina foi usado para descrever os mediadores endócrinos produzidos pelo intestino (LA BARRE, 1932), contudo, a interação existente entre o intestino e o pâncreas somente foi confirmada na década de 1960, em um estudo clínico em que foi verificado um aumento nos níveis plasmáticos de insulina após a ingestão oral de glicose (UNGER; EISENTRAUT, 1969). Hoje sabe-se que essa regulação endócrina é desempenhada pelas incretinas, cuja principal função é potencializar a secreção de insulina (CAMPBELL; DRUCKER, 2013). Dentre as incretinas, destaca-se o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), que além de atuar na regulação da secreção da insulina, também age sobre diferentes órgãos do corpo.

A síntese do GLP-1 ocorre a partir da expressão da proteína proglucagon no pâncreas, especificamente nas células alfa das ilhotas pancreáticas. Dados da literatura mostram que essa proteína é então processada pelas células L intestinais que ficam localizadas na parte distal do



intestino, encontradas em alta densidade no colón. Também há relatos do processamento do proglucagon em neurônios localizados no tronco cerebral caudal e no hipotálamo, produzindo os peptídeos: enteroglucagon (glicentina), GLP-1 e GLP-2 (FEHMANN *et al.*, 1995; GAUTIER *et al.*, 2008). Apesar de ter estrutura semelhante, o GLP-2 não possui a mesma ação insulínica que o GLP-1, porém foi evidenciado que esse hormônio pode estimular a proliferação de células epiteliais contribuindo para homeostasia intestinal (JASLEEN, *et al.*, 2002).

O GLP-1 pode ser secretado a partir do contato da membrana apical das células L com os nutrientes luminiais, como gorduras e carboidratos (Figura 5). Em geral, a região basolateral das células é o local por onde ocorre a secreção dos hormônios para a corrente sanguínea (KOEPPEN; STANTON, 2009). Apesar das células L serem encontradas primordialmente na parte distal do intestino, estudos indicam que a liberação do GLP-1 ocorre entre 5 e 10 minutos. Dessa forma é possível sugerir que a secreção imediata do hormônio incretina é regulada pela ação de mediadores neurais e endócrinos em resposta à entrada de nutrientes na região proximal do trato digestivo, ao invés do contato direto com as células L (GAUTIER *et al.*, 2008). Neste contexto, dados da literatura sugerem que a secreção do GLP-1 pode ocorrer de maneira bifásica, sendo a primeira fase estimulada principalmente por fatores neurais e endócrinos, ou pelos estímulos captados pelas células L encontradas no intestino proximal (MORTENSEN *et al.*, 2003; THEODORAKIS, *et al.*, 2006; BAGGIO; DRUCKER, 2007). Enquanto na fase tardia ocorre a interação direta dos nutrientes com as células L da região distal do intestino (ROBERGE; BRUBAKER 1991; BAGGIO; DRUCKER, 2007).

**Figura 5.** Secreção do GLP-1.

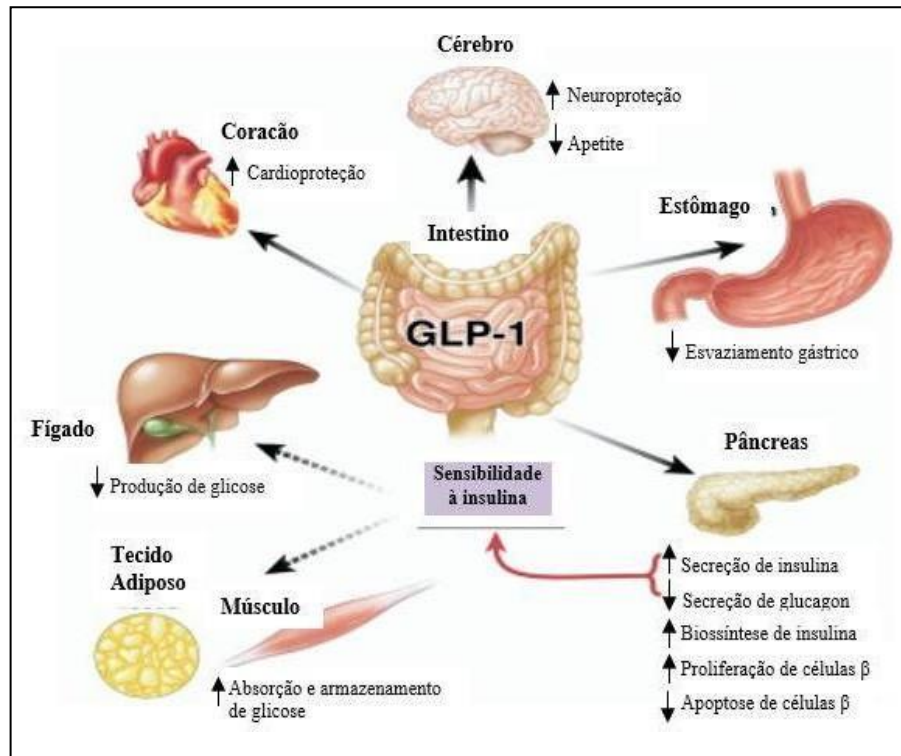
**Fonte:** Próprio autor (2023).

Acredita-se que o principal fator neural envolvido na regulação da secreção de GLP-1 seja o nervo vago. Essa evidência foi comprovada através de estudos com roedores, no qual foi verificado que estímulos elétricos devido ao contato direto dos ramos celíacos do vago com o intestino aumentaram a secreção de GLP-1 (ROCCA; BRUBAKER *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que os neurotransmissores peptídeo liberador de gastrina (GRP) e acetilcolina podem desencadear a secreção rápida de GLP-1 (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Em estudos com roedores e em células L caninas foi demonstrado que o hormônio incretina GIP pode servir como mecanismo de secreção do GLP-1, através do receptor GRP (KREYMANN *et al.*, 1987; NAUCK *et al.*, 1993).

As incretinas atuam diretamente no pâncreas, aumentando a secreção de insulina e proliferação das células  $\beta$  e células  $\alpha$ . Além disso, o GLP-1 destaca-se por sua extensa capacidade de agir em vários tecidos, através do seu receptor está acoplado na membrana celular (BAGGIO e DRUCKER, 2007). As principais funções desse peptídeo estão relacionadas a melhoria da saúde das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, inibição da secreção de ácido gástrico, inibição da secreção do glucagon (hiperglicemia em jejum) e retardamento do esvaziamento gástrico. Devido a esses efeitos fisiológicos, o GLP-1 possui a capacidade de reduzir o consumo alimentar, levando a perda de peso (ALVAREZ-LEITE *et al.*, 2016).

Na figura 6 estão mostradas as ações direta e indireta do GLP-1 em vários órgãos como no cérebro, ossos, coração, intestino e fígado.

**Figura 6.** Órgãos e tecidos-alvo do GLP-1 e seus efeitos.



**Fonte:** Adaptado de Baggio e Drucker (2007).

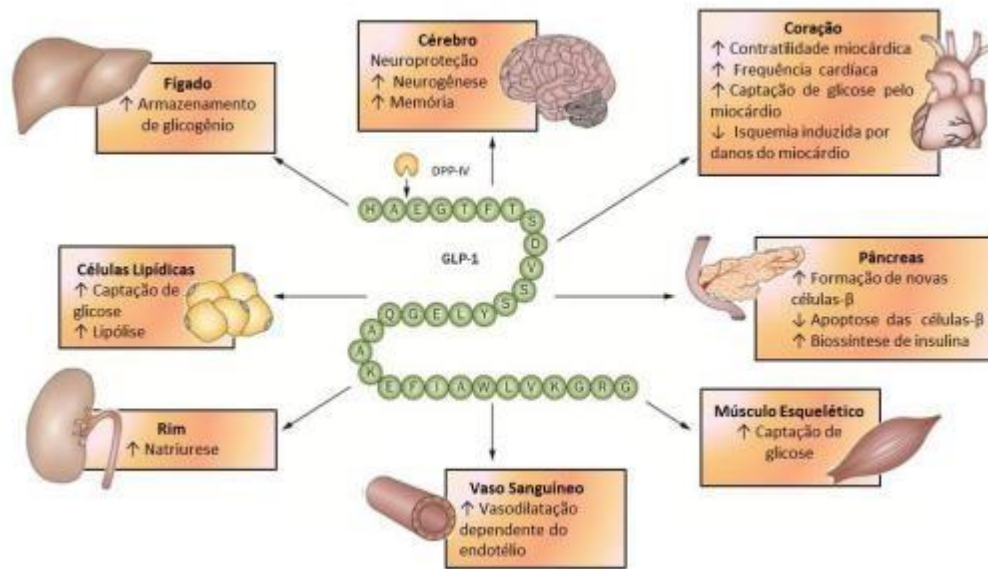
De acordo com a literatura, as incretinas permanecem na circulação sanguínea por cerca de 2 a 7 minutos, devido a ação metabólica da enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) (DEACON, *et al.*, 1995). A DPP-IV desempenha sua função clivando rapidamente a porção 2 da alanina do GLP-1, produzindo a forma inativa desses hormônios (MENTLEIN, *et al.*, 1993; DEACON, *et al.*, 1995). Essa proteína é encontrada abundantemente acoplada nas células ou solúvel na circulação (MENTLEIN, 1999). Outra proteína com potencial de inibir a ação das incretinas é a endopeptidase neutra 24.11 (NEP 24.11). Estudos relataram que a NEP 24.11 pode ser eficaz na degradação do GLP-1, clivando as porções N-terminal (HUPE-SODMANN *et al.*, 1995; HUPE-SODMANN *et al.*, 1997). Com base na rápida degradação enzimática do GLP-1 foram produzidos medicamentos com potencial de prolongar os seus efeitos, através de inibidores da DPP-IV, para o tratamento de diabetes mellitus 2 (BAGGIO; DRUCKER, 2007).

### 3.3 Análogos do peptídeo-1 semelhante ao glucagon

Com objetivo de prolongar os efeitos metabólicos do hormônio GLP-1 no organismo, principalmente aumentando o nível de insulina, uma nova classe de incretinomiméticos semelhantes ao GLP-1 foi desenvolvida. A principal característica dos análogos do GLP-1 consiste na modificação da sua estrutura molecular, permitindo resistência à enzima DPP-IV (JUHL *et al.*, 2002). Essas alterações moleculares podem ocorrer pela conjugação do GLP-1 ao ácido graxo (HEINEMANN *et al.*, 1999), à peptídeos que aumentam a afinidade com a albumina (HOLZ *et al.*, 2003; KIM, *et al.*, 2003) e pode ser conjugado com o ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), que possui estruturas de D-aminoácido importantes para proteção contra a proteólise (NORRIS *et al.*, 2009). Dessa forma, os fármacos análogos ao GLP-1 possuem uma meia vida plasmática maior comparado ao GLP-1 endógeno.

Inicialmente esses medicamentos foram produzidos como possível terapia para o controle do diabetes mellitus 2. Além de seu papel no controle glicêmico, os incretinomiméticos possuem a capacidade de atuar nas ilhotas pancreáticas, coração, intestino, subpopulações de células imunes, rins e cérebro através do receptor do GLP-1, encontrado na membrana plasmática celular (CAMPBELL; DRUCKER, 2013) ( Figura 7). Os principais medicamentos análogos do GLP-1 aprovados para uso são a Albiglutida, Dulaglutida, Exenatida e Liraglutida (suas propriedades farmacocinéticas podem ser visualizadas na tabela 1). Dentre esses fármacos, a Liraglutida tem destaque pelo seu recente uso no controle de peso, através do aumento na saciedade (NOVO NORDISK, 2019). Informações a respeito das características biológicas e farmacológicas da Liraglutida serão discutidas no próximo tópico.

**Figura 7.** Efeitos do GLP 1 ou dos análogos do GLP1 no organismo em condições experimentais.



Fonte: Marques (2016)

**Tabela 1.** Farmacocinética dos principais incretinomiméticos.

Fármaco	Fabricante	Meia vida plasmática	Administração	Dosagem
Albiglutida	Tanzeum	6 a 8 dias	Semanal/ mensal	30 mg
Dulaglutida	Trulicity)	90 horas	Semanal	1,5 mg/ 0,75 mg
Exenatida	Byetta	2,4 horas	Diária/ semanal	5 mcg/10mcg
Exenatida LAR	Elilly/Amylin	4 dias	Semanal	2 mg
Liraglutida	Victoza, Saxenda	13 horas	Diária	0,6 mg/ 1,8 mg/ 3 mg

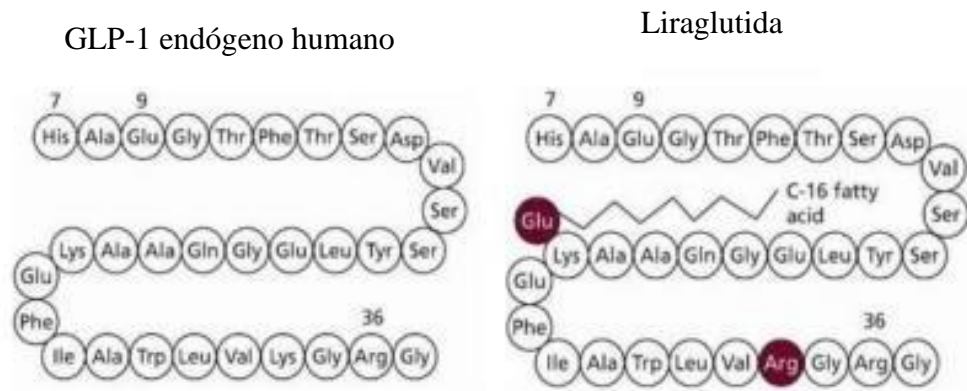
Fonte: Adaptado de Gupta, 2013.

### 3.3.1 Liraglutida

A Liraglutida é um análogo sintético da incretina GLP-1, com a função primordial de aumentar a secreção de insulina. Em relação a sua estrutura molecular, a Liraglutida apresenta substituição do aminoácido lisina por arginina na posição 34 e introdução do ácido graxo C-16 (ácido palmitoil), conferindo-lhe uma homologia de 97% a GLP-1 humano (Figura 8)

(KNUDSEN, *et al.*, 2000). Devido a essas alterações moleculares, a Liraglutida possui algumas propriedades farmacocinéticas essenciais para prolongar a sua meia-vida plasmática, como uma liberação lenta do local da injeção e forte ligação à albumina sérica, fornecendo proteção à degradação pela DPP-IV e menor depuração renal (JUHL, *et al.*, 2002).

**Figura 8.** Composição molecular do GLP-1 humano e da Liraglutida.



**Fonte:** Mesquita (2017).

Sobre seu mecanismo de ação, os análogos do GLP-1 agem principalmente sobre as células do trato gastrointestinal e sistema nervoso central através da ativação dos receptores do GLP-1, que ficam situados na membrana celular (NERES *et al.*, 2019). No sistema nervoso, a Liraglutida age em receptores presentes na região do hipotálamo, aumentando a produção de pró-opiomelanocortina (POMC), responsável por induzir saciedade (NOVO NORDISK, 2019; ARD, *et al.*, 2021). Essa atividade leva a uma redução do apetite, com diminuição da ingestão calórica e consequente redução do peso corporal. Já no sistema gastrointestinal, o peptídeo atua no retardamento do esvaziamento gástrico, aumento da secreção de insulina e regula negativamente a secreção de glucagon e a gliconeogênese (LOPES *et al.*, 2020). Devido às suas funções metabólicas a Liraglutida vem sendo utilizada para o tratamento do diabetes mellitus 2 e obesidade.

Em humanos, a Liraglutida é administrada uma vez ao dia através da injeção subcutânea no abdômen, coxa ou parte superior do braço (ELBRØND *et al.*, 2002; NIGRO *et al.*, 2021). Recomenda-se iniciar o tratamento com a Liraglutida na dose de 0,6 mg/mL uma vez ao dia até o máximo de 1,8 mg/mL, no caso de indivíduos diabéticos (GUPTA, 2013). Enquanto para o tratamento da obesidade a dose aprovada é de 3,0 mg/mL (JENSTERLE, 2017).

Devido a absorção lenta, a Liraglutida atinge sua concentração máxima entre 8 a 12 horas após administração, estimando uma concentração de 34 nmol para a dose de 1,8 mg/mL (NERES *et al.*, 2019, citado por NIGRO *et al.*, 2021, pág. 10). Sua degradação acontece em até 18 horas após administração pela ação da enzima DPP-IV e endopeptidases neutras (GUPTA, 2013).

Além do uso clínico no diabetes tipo 2 e obesidade, a Liraglutida vem sendo amplamente estudada como tratamento para doenças neurodegenerativas, hepáticas e cardiovasculares (Tabela 2). Um estudo experimental utilizando modelo de doença de Alzheimer com camundongos APP/PS1 mostrou que o tratamento com a Liraglutida na concentração de 25 nM/kg foi capaz de reverter o comprometimento da memória, a perda sináptica e reduzir a deposição de placa amilóide, indicando seus possíveis efeitos restauradores na doença (MCCLEAN; HÖLSCHER, 2014). Adicionalmente, Parthasarathy e Hölscher (2013) mostraram que a Liraglutida reduz a inflamação crônica induzida por irradiação no cérebro de camundongos a partir da diminuição na expressão das citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL-) 6, IL-12p70 e IL-1 $\beta$  e a concentração total de nitrito. Corroborando com esses achados, verificou-se que o tratamento com o GLP-1 na concentração de 1  $\mu$ M diminuiu significativamente a produção da IL-1 em astrócitos a partir de córtices cerebrais de ratos E18 Wistar (IWAI *et al.*, 2006). Esses estudos demonstram alguns efeitos benéficos que a Liraglutida apresenta no sistema nervoso central, podendo ser utilizada como terapia para doenças neurodegenerativas.

**Tabela 2.** Efeitos da Liraglutida.

<b>Dosagem</b>	<b>Organismo modelo</b>	<b>Efeito</b>
25 nM/kg	Camundongos APP/PS1	Tratamento de doenças neurodegenerativa
100 nM	Células endoteliais humanas	Melhora na função cardíaca
-----	Camundongos normais e diabéticos	Melhora na função cardíaca
0,6mg/kg	Ratos	Reversão da esteatose hepática e resistência à insulina
0,9 mg/mL	Humanos com esteatose hepática e diabetes mellitus 2	Tratamento do diabetes mellitus 2 e doença hepática

Uma das complicações evidenciadas em indivíduos acometidos pelo diabetes tipo 2 é a aterosclerose, que pode ser causada por disfunção das células endoteliais (VANHOUTTE, 2009). Neste sentido, Gaspari e colaboradores (2011) observaram que a Liraglutida (100 nM) causou inibição na expressão do inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) e da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) em células endoteliais humanas da linhagem C11-STH. Em adição, verificaram um aumento na produção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e redução da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no endotélio aórtico de ratos exposto ao fármaco. No estudo produzido por Noyan-Ashraf *et al.* (2009) constatou-se que a Liraglutida melhorou a função cardíaca de camundongos normais e diabéticos através da ativação dos fatores cardioprotetores serina/treonina quinase (AKT), Glicogênio sintase quinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), receptor  $\delta$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- $\delta$ ), fator nuclear derivado de eritróide 2 (NRF-2) e Heme oxigenase (HO-1).

O efeito protetor da Liraglutida sobre o fígado foi observado em modelo de doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida por dieta em ratos. Os animais tratados com a Liraglutida (0,6 mg/kg) apresentaram redução em marcadores de estresse oxidativo, como malondialdeído (MDA), diminuição na citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e aumento na superóxido dismutase (SOD) e de adiponectina no fígado. Possivelmente esses fatores contribuíram para a reversão da esteatose hepática e resistência à insulina pela Liraglutida (GAO, *et al.*, 2015).

Anteriormente, no estudo clínico de Ohki *et al.* (2012) pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica e diabetes mellitus 2 foram tratados com a Liraglutida por via subcutânea uma vez ao dia. O tratamento foi realizado da seguinte forma: na primeira semana os pacientes foram tratados com a dose de 0,3 mg/mL e na semana posterior aumentou-se para 0,6 mg/mL até à dose limite de 0,9 mg/mL. Com isso foi demonstrado que a Liraglutida melhorou significativamente os níveis de alanina aminotransferase (ALT), a glicemia e hemoglobina glicada (HbA1c), mostrando que o uso desse fármaco pode ser promissor tanto para o tratamento do diabetes mellitus 2 quanto para doenças associadas ao dano hepático.

Apesar dos seus benefícios, principalmente para o trato gastrointestinal, a Liraglutida pode apresentar efeitos colaterais significativos. No estudo de Armstrong *et al.* (2015) foi investigada a segurança e eficácia da Liraglutida em pacientes com esteatose hepática não-alcoólica. Com base na biópsia hepática dos pacientes, o tratamento com a Liraglutida (1,8 mg/dia) causou a resolução da esteatose.



Em contrapartida, foi verificado que dos 26 pacientes submetidos ao tratamento com a Liraglutida, 23 apresentaram efeitos adversos, sendo o trato gastrointestinal o sistema mais afetado com cerca de 81% dos pacientes apresentando, principalmente, episódios de diarreia, náusea, dor abdominal e vômitos. Outro estudo comparou tratamento com análogos do GLP-1 e o placebo. Foi verificado que tratamento com os análogos causaram um impacto maior nos sintomas de náusea, vômito e diarreia do que o placebo. Dentre esses sintomas, os episódios de diarreia possuíram maior incidência nos grupos tratados com a Liraglutida nas concentrações de 1,2 mg e 1,8 mg (SUN, *et al.*, 2012).

Nesses estudos o grau de gravidade dos sintomas foi considerado leve a moderado, não havendo nenhum relato de morte. Porém, cerca de 8% dos pacientes apresentaram efeitos adversos graves para o tratamento com a Liraglutida, com sintomas de dor de cabeça, diarreia e síncope. Além disso uma acentuada parte dos pacientes suspenderam o tratamento com a Liraglutida devido a evento adverso (ARMSTRONG, *et al.*, 2015). Dados semelhantes relatados na pesquisa Exenatide SPC (2014) demonstrou que cerca de 4% dos pacientes submetidos ao tratamento com a Exenatida desistem por causa dos episódios de náuseas. Acredita-se que o aumento de náuseas decorrente do tratamento com análogos do GLP-1 esteja relacionado à função de esvaziamento gástrico realizada por esses fármacos (FILIPPATOS, *et al.*, 2014).

## 4 METODOLOGIA

Esta pesquisa fez parte de um projeto em colaboração com a Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas e foi realizada no laboratório de Biologia celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, situado na Universidade Federal de Alagoas. Os experimentos foram realizados utilizando as células epiteliais intestinais de ratos, pertencentes à linhagem IEC-6. Para isso, foi realizado primordialmente o cultivo celular e em seguida o tratamento *in vitro* com a substância Liraglutida. A etapa final foi composta pelos procedimentos de viabilidade celular, análise morfológica, ensaio de migração celular e ensaio de apoptose e necrose

### 4.1 Cultivo celular

As células epiteliais intestinais da espécie *Rattus norvegicus* pertencentes à linhagem IEC-6 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O cultivo das células ocorreu de acordo com o fabricante, em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com alta concentração de glicose (4,5 g/L) e suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 4 mM de L-glutamina, 0,1 U/mL de insulina humana e 0,02 ml de solução penicilina/estreptomicina. Quando necessário, a passagem das células foi realizada utilizando solução de Tripsina-EDTA a 0,25%. Primeiramente, as células foram lavadas com solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline, PBS) estéril, com o intuito de remover os inibidores da tripsina e assim potencializar sua ação. Em seguida, a solução de tripsina foi adicionada à cultura por cerca de 5 minutos. Após a ação da tripsina, foi realizada a coleta das células dispostas no sobrenadante, depositando-as em um tubo contendo o meio de cultura. Logo em seguida, as células foram centrifugadas por 10 minutos, ressuspensas em meio DMEM completo e um alíquota foi retirada para contagem das células em câmara de Neubauer através do método de exclusão de Trypan. Depois, as células foram adicionadas em garrafa própria para cultivo celular contendo o meio DMEM 10% SBF e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até utilização nos procedimentos experimentais.

### 4.2 Tratamento *in vitro*

O tratamento *in vitro* foi realizado utilizando o cloridrato de Liraglutida

(Victoza®, Novo Nordisk) nas concentrações de 100, 50, 25, 1, 0,5 e 0,25  $\mu\text{M}$ , diluídos em meio DMEM contendo 2% SBF por 24 horas.

### **4.3 Ensaio de viabilidade celular**

As células foram plaqueadas em uma concentração de  $10^4$  células/poço em uma placa de 96 poços. O tratamento foi realizado no dia posterior, utilizando a Liraglutida nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , diluídos em meio DMEM contendo 2% SBF por 24 horas.

Em seguida ao tratamento, foi depositado nos poços 23  $\mu\text{L}$  de Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; 5 mg/mL) e as células foram incubadas por 3 horas. Após esse período, o meio foi retirado e adicionado 150  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), responsável por causar a lise das células e permitir a liberação dos cristais de formazan. Para quantificar a absorbância do MTT pelas células IEC-6 foi utilizado o espectrofotômetro (Polaris<sup>2</sup> Celer Biotecnologia S.A) no comprimento de onda de 540 nm.

### **4.4 Quantificação de Apoptose e Necrose Celular**

A apoptose das células em estudo foi avaliada pela verificação da degradação do DNA utilizando os corantes laranja de acridina (LA, 1 mg/mL) e iodeto de propídio (IP, 1 mg/mL) ao microscópio de fluorescência. As células foram plaqueadas na concentração de  $10^4$  células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 12 mm e tratadas com cloridrato de Liraglutida nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  diluída em DMEM 2% SBF por 24 horas.

Para a marcação, LA e IP foram diluídos em PBS 1X. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 2 minutos com a solução contendo os corantes. Após esse período, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e visualizadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. A marcação do LA foi visualizada no filtro com comprimento de onda de 528 nm. Para visualizar as células marcadas com IP foi utilizado o filtro com comprimento de onda 461 nm.

No microscópio de fluorescência foi possível observar as células coradas em verde e laranja. De acordo com esse método, o LA pode ser absorvido por células viáveis e

não-viáveis, corando-as verde. Já o IP apenas penetra em células que não possuem a membrana íntegra (não-viáveis), corando-as em laranja ou vermelho (RENVOIZE; *et al.*, 1998 citado por RIBBLE; *et al.*, 2005). Dessa forma, a análise da apoptose das células foi feita com base na coloração e morfologia celular, sendo dividida em três grupos: 1. células viáveis - que apresentaram núcleo corado em verde; 2. células em apoptose - coradas em verde, com alterações em sua membrana; 3. células em necrose - com coloração laranja ou avermelhadas.

A quantificação das células foi realizada em 5 campos aleatórios de cada poço com auxílio do ImageJ. O cálculo da frequência das células viáveis, apoptóticas e necróticas utilizando a seguinte fórmula:

$$\% = \frac{A}{T} \times 100$$

Onde A= nº de células viáveis/apoptóticas/ necróticas no campo e T= nº total de células por campo.

#### 4.5 Análise morfológica

Para a análise morfológica e avaliação do citoesqueleto de F-actina, as células IEC-6 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço em placas de 8 poços tipo Labtek®. Após 24 horas, as células foram tratadas com Liraglutida diluída em DMEM 2% SBF nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1  $\mu$ M por um período de 24 horas. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS 1X e depois foram incubadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas novamente com PBS 1X e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso do permeabilizador. As células IEC-6 foram marcadas para F-actina com faloidina conjugada ao isocianato de fluoresceína (FITC) por um período de uma hora, no escuro. Na etapa final, após nova lavagem com PBS, foi feita a montagem das lâminas com glicerol na proporção de 1:3 em PBS para a análise ao microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. A análise da marcação foi realizada de maneira qualitativa, observando as possíveis alterações morfológicas e a disposição das fibras de F-actina.

#### 4.6 Ensaio de migração celular

As células foram plaqueadas em uma concentração de  $8 \times 10^4$  células/poço em uma placa de 24 poços. Antes do plaqueamento foi realizado um traço na parte externa inferior da placa, atrás de cada poço, dividindo-o em duas regiões: acima e abaixo. Esse traço foi realizado utilizando uma caneta permanente na cor preta e serviu de referencial para o acompanhamento da migração. No dia do tratamento foram realizados riscos paralelos na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira estéril. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, com objetivo de retirar os restos celulares que ficaram no sobrenadante e no centro do poço. Após lavagem, as células foram tratadas com o cloridrato de Liraglutida nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  diluídas em DMEM 2% SBF.

A migração das células foi acompanhada no microscópio de luz invertido T1-SM Nikon até o fechamento da área livre de células quando foram tiradas fotomicrografias nos períodos de 0, 12 e 24 horas. Foram tiradas duas fotos por poço, acima e abaixo do traço, sempre no mesmo local, durante os períodos analisados. A quantificação da área de migração celular foi realizada utilizando o programa de computador ImageJ em que foi delimitada, manualmente, a área (em  $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$ ) que permaneceu aberta após o tempo de tratamento. O cálculo da porcentagem de fechamento da área celular foi realizado no Excel através da metodologia descrita por Yue *et al.*, 2010, usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de fechamento} = \frac{At_0 - Ath}{At_0} \times 100$$

Onde  $At_0$  é a medida da área riscada no tempo zero e  $Ath$  é o tempo a ser analisado.

Depois das 24 horas de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos. Logo em seguida foi feita a lavagem das células com água destilada para retirada do excesso do fixador. As células IEC-6 foram coradas utilizando cristal violeta (2 mg/mL) por 5 minutos e depois foram lavadas duas vezes com água destilada. A última etapa consistiu na visualização das células no microscópio invertido, em que foram adquiridas fotomicrografias na objetiva de 20x.

#### **4.7 Análises estatística**

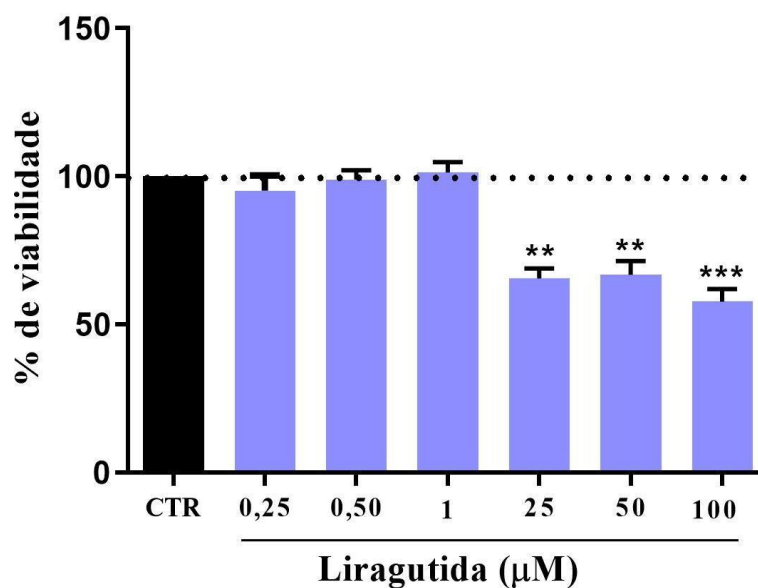
A confecção dos gráficos e a análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, com um nível de significância selecionado para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da Liraglutida sobre a viabilidade de células intestinais

As células IEC-6 foram expostas às diferentes concentrações de Liraglutida por 24 horas. Após esse tempo, verificou-se que a Liraglutida, nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , causou uma redução significativa de aproximadamente 25 e 30% na viabilidade celular comparado ao grupo de células não-tratadas (controle). Em contrapartida, as concentrações de 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  não alteraram significativamente a viabilidade das células, sendo então escolhidas para a realização dos experimentos posteriores (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Percentual de viabilidade das células IEC-6 após tratamento com diferentes concentrações de Liraglutida.

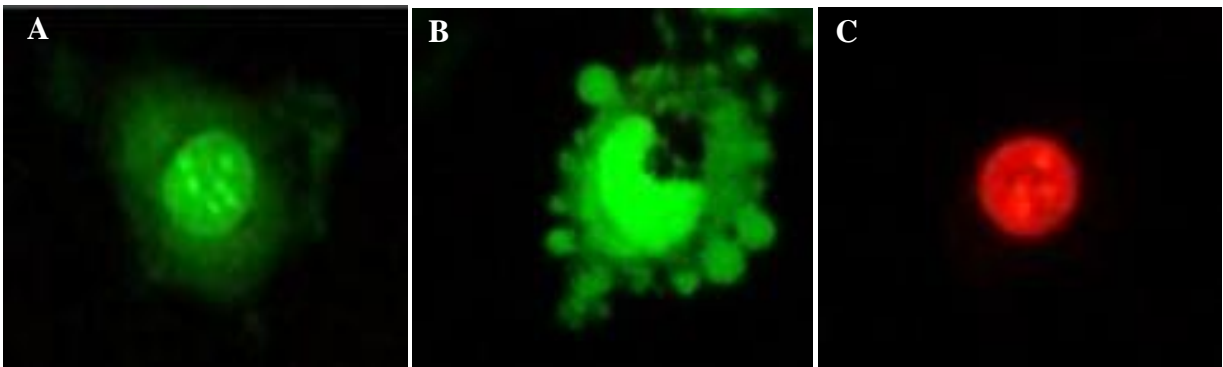


O gráfico mostra média  $\pm$  SEM do percentual de células viáveis após tratamento com liraglutida nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas. A viabilidade das células não-tratadas foi considerada como 100%. \*\* $p > 0,01$  e \*\*\*  $p > 0,0001$  comparado ao controle (células mantidas apenas em DMEM 2% SBF). **Fonte:** Próprio Autor

## 5.2 Avaliação da morte celular em células intestinais tratadas com Liraglutida

Através da marcação com o laranja de acridina e iodeto de propídio foi possível avaliar o efeito da Liraglutida sobre a morte celular das células IEC-6. No painel 1 é possível observar que as células apoptóticas apresentaram bolhas na membrana celular, cromatina verde e citoplasma fragmentado. Enquanto as células necróticas apresentaram núcleos normais semelhantes as células viáveis, porém com a cromatina corada em laranja (Painel 2). O tratamento com o fármaco diminuiu significativamente o percentual de células apoptóticas (2,5% na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ ; 1,62% na concentração de 0,50  $\mu\text{M}$ ; 1,66% na concentração de 1  $\mu\text{M}$ ) em comparação ao controle (9%). Também foi observado que as células tratadas com a Liraglutida não tiveram a sua viabilidade alterada, como observado anteriormente no teste de viabilidade celular. Em contrapartida foi visto que o tratamento com a Liraglutida aumentou o número de células em necrose, mas não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Painel 3).

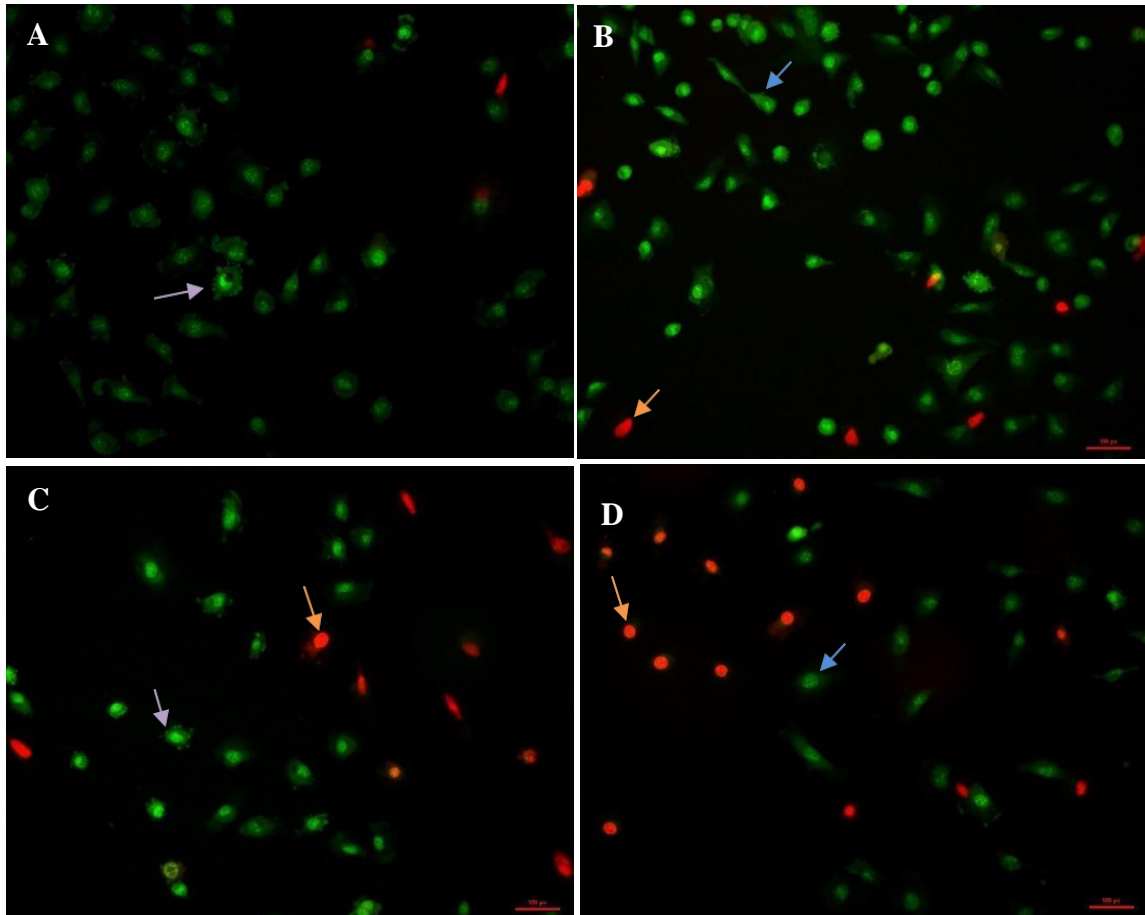
**Painel 1.** Análise morfológica das células IEC-6 após a marcação com o laranja de acridina e iodeto de propídio.



As fotomicrografias mostram em (A) célula viável, (B) célula apoptótica e (C) célula necrótica. Aumento 200x. **Fonte:** Próprio autor

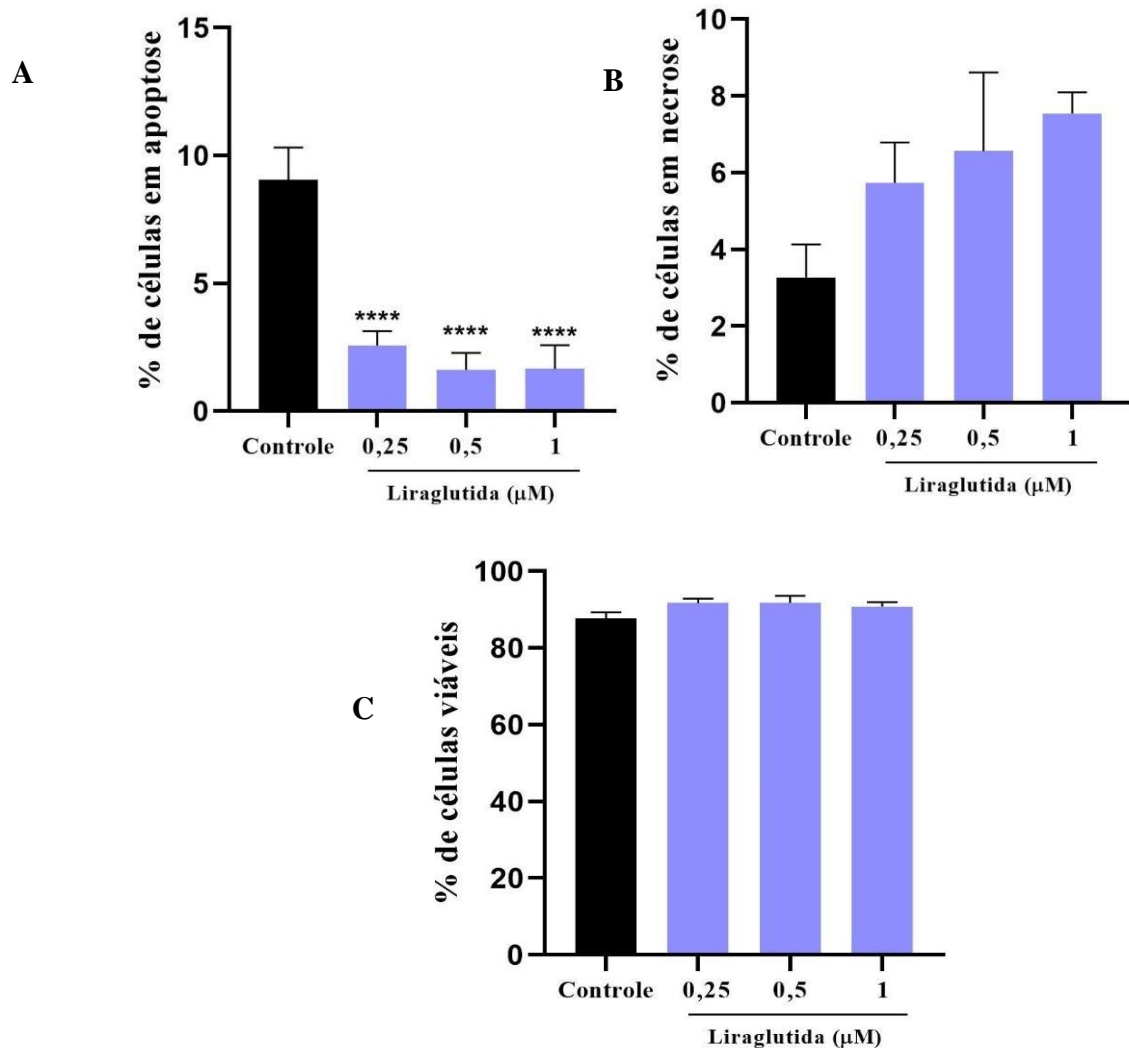


**Painel 2.** Efeito da Liraglutida sobre a apoptose e necrose das células intestinais epiteliais de ratos após 24 horas de tratamento.



As fotomicrografias mostram em (A) células do grupo controle mantidas em DMEM 2% SBF, (B) células tratadas com a liraglutida na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ , (C) células tratadas com a liraglutida na concentração de 0,50  $\mu\text{M}$  e em (D) células tratadas com a a liraglutida na concentração de 1  $\mu\text{M}$  após coloração com laranja de acridina (verde) e iodeto de propídio (vermelho). As setas roxas indicam células em apoptose, com formação de bolhas na membrana, as laranjas mostram células em necrose e as setas azuis indicam células viáveis. Aumento 200x. **Fonte:** Próprio autor

**Painel 3.** Percentual de células apoptóticas, necróticas e viáveis após tratamento com Liraglutida

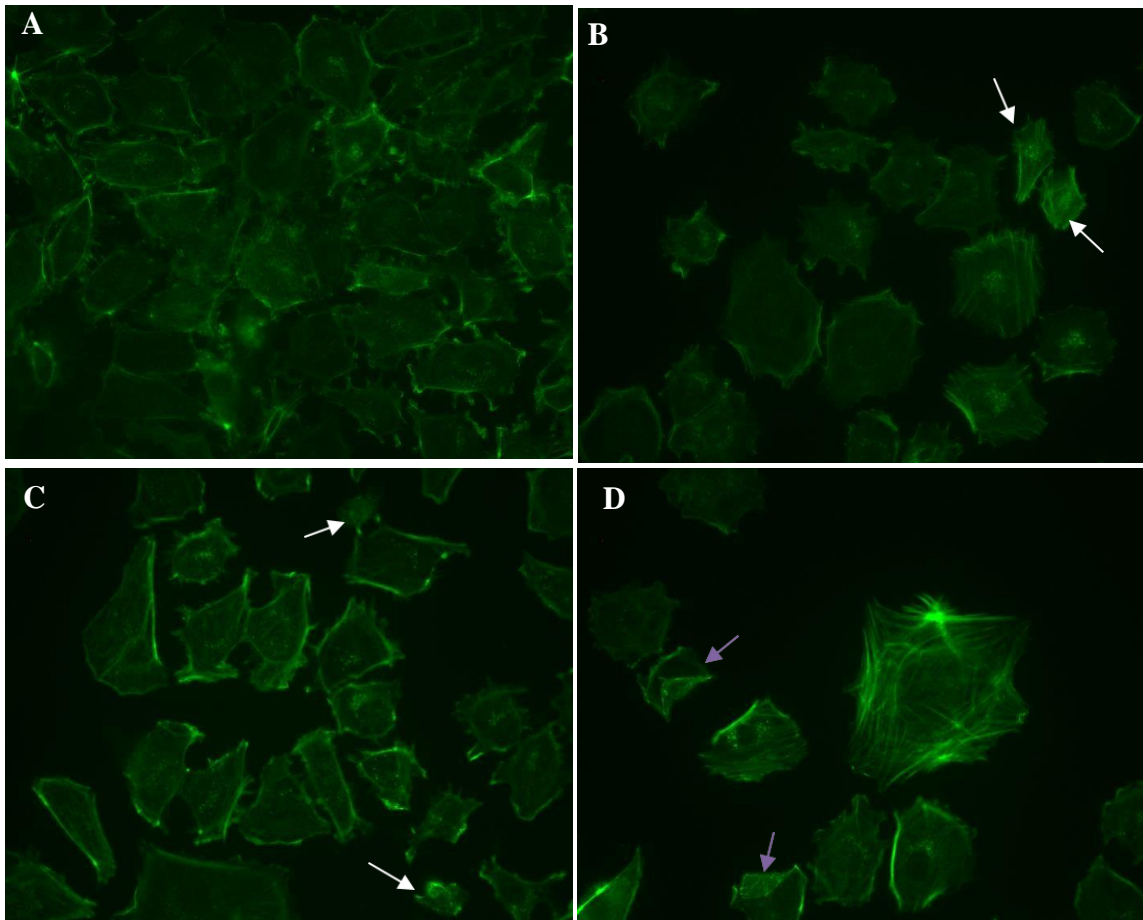


Nos gráficos está representado em **(A)** porcentagem de células apoptóticas, **(B)** porcentagem de células necróticas e em **(C)** porcentagem de células viáveis. As barras indicam média  $\pm$  SEM (n = 6-9). \*\*\*p < 0,0001 comparado ao controle (células mantidas apenas em DMEM 2% SBF). **Fonte:** Próprio Autor

### 5.3 Efeito da Liraglutida sobre a morfologia das células IEC-6

As células IEC-6 no grupo controle apresentaram morfologia característica de epitélio, com formas prismáticas e aderidas em monocamada (Painel 4, figura A). Em contrapartida, foi observado que algumas células tratadas com a Liraglutida tinham morfologia mais alongada e diminuição do citoplasma (Painel 4, figuras B e C). Com base nas junções celulares, nos grupos tratados foi observado menos contato célula-célula comparado ao controle .

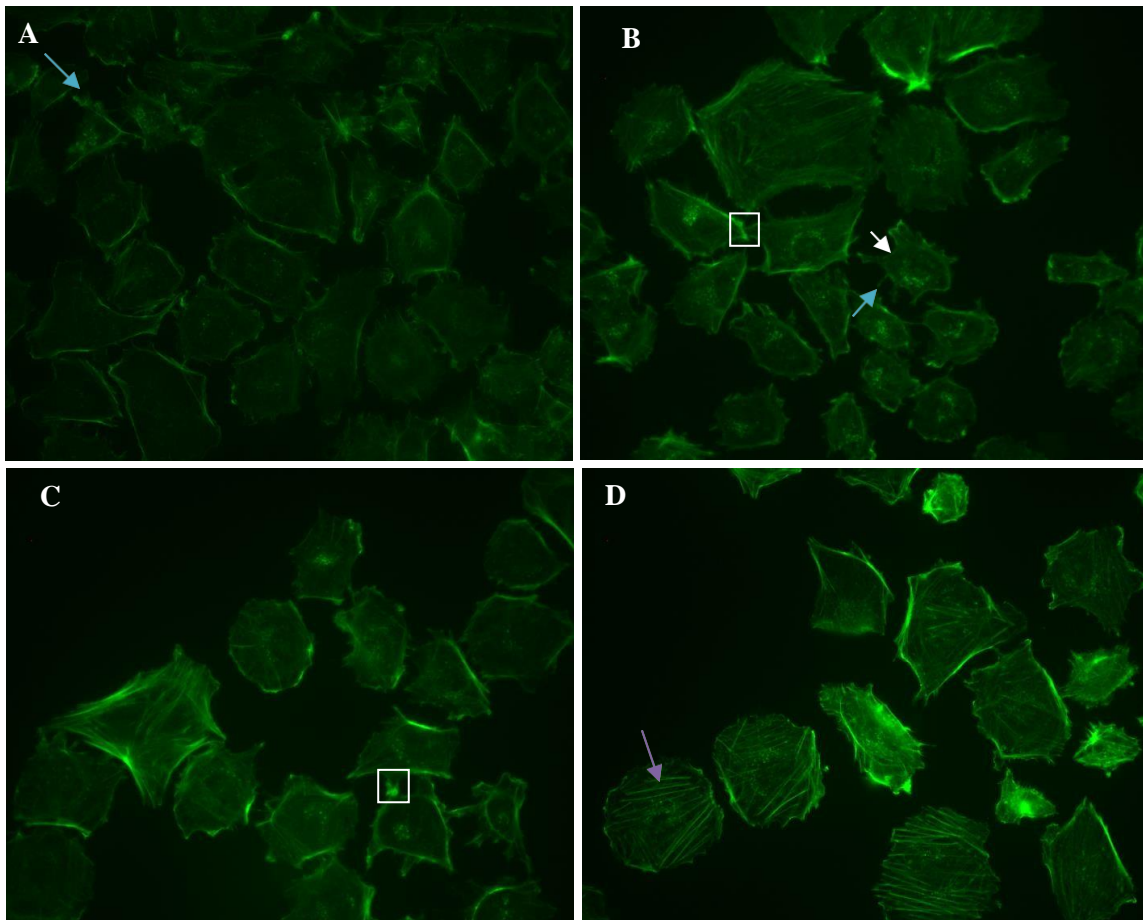
**Painel 4.** Efeito da Liraglutida na morfologia das células IEC-6



As fotomicrografias mostram em (A) células do grupo controle mantidas em DMEM 2% SBF, (B) células tratadas com a Liraglutida na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ , (C) células tratadas com a Liraglutida na concentração de 0,50  $\mu\text{M}$  e em (D) células tratadas com a Liraglutida na concentração de 1  $\mu\text{M}$  após marcação dos filamentos de actina utilizando faloidina-FITC (verde). As setas brancas indicam células alongadas e com retração do citoplasma. Setas na cor roxa evidenciam células elevadas. Aumento de 400x. **Fonte:** Próprio Autor

Em relação a organização do citoesqueleto de actina, nas células IEC-6 que não receberam nenhum tipo de tratamento verificou-se a presença das fibras de F-actina na periferia das células (Painel 5, figura A). Enquanto isso, as células tratadas com a Liraglutida nas concentrações de 1, 0,5 e 0,25  $\mu\text{M}$  apresentaram fibras de estresse proeminentes, sendo possível observar distintos rearranjos de actina, sendo actina concentrada na periferia e na parte interna distribuída em feixes perpendiculares (Painel 5, figuras B, C e D). As células IEC-6 possuíam maior quantidade de fibras nas regiões de junções célula-célula, sendo comprovada pelo aumento da intensidade de fluorescência no local.

**Painel 5.** Efeito da Liraglutida sobre disposição das fibras de F-actina na linhagem IEC-6.



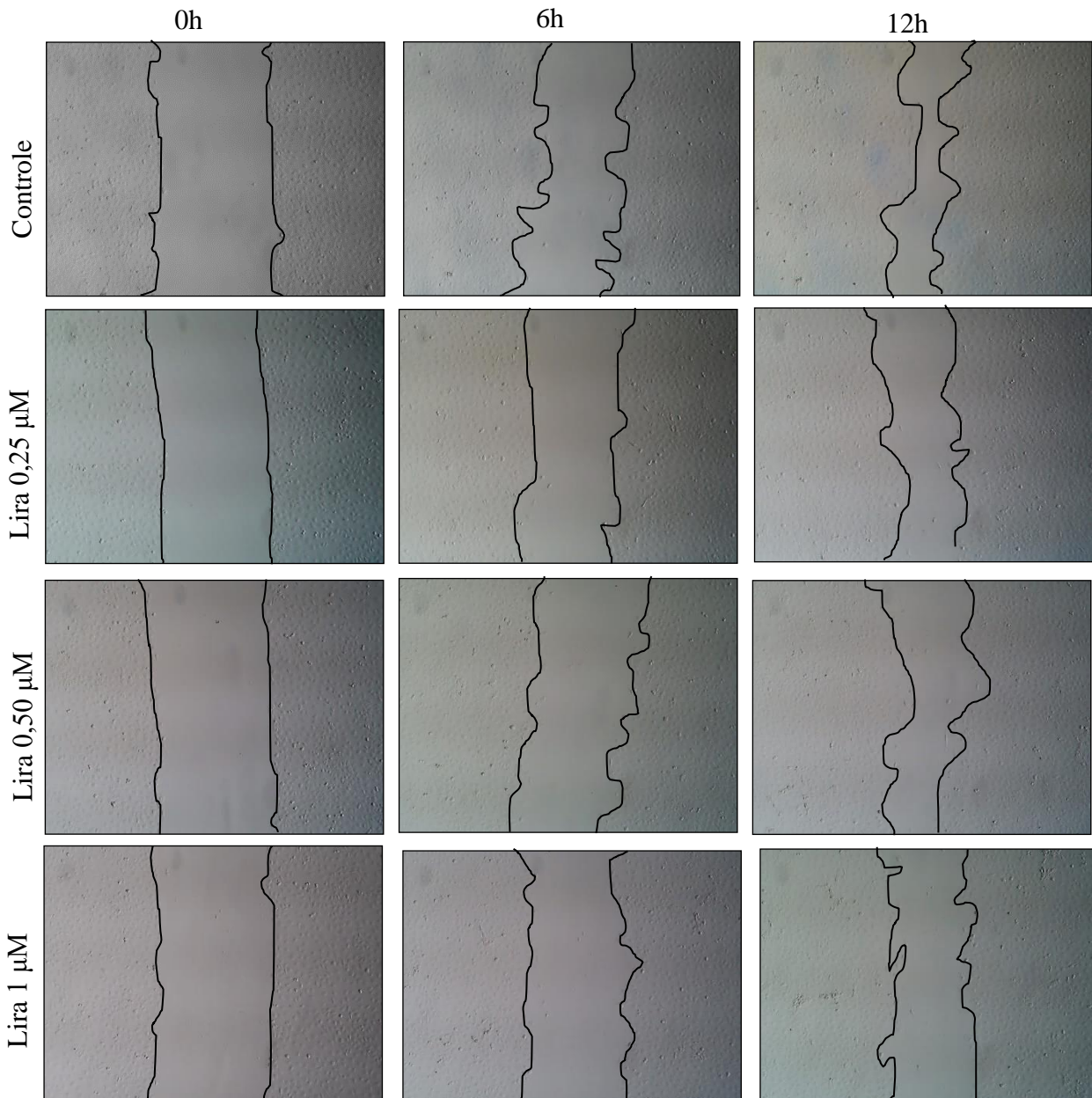
As fotomicrografias mostram em (A) células do grupo controle mantidas em DMEM 2% SBF, (B) células tratadas com a Liraglutida na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ , (C) células tratadas com a Liraglutida na concentração de 0,50  $\mu\text{M}$  e em (D) células tratadas com a Liraglutida na concentração de 1  $\mu\text{M}$  após marcação dos filamentos de actina utilizando faloidina-FITC (verde). O quadrado branco destaca as junções célula-célula, enquanto que a seta branca evidencia o lamelipódio, as setas azuis os filopódios e a seta roxa as fibras de estresse. Aumento de 400x **Fonte:** Próprio Autor.

#### 5.4 Análise de migração celular das células intestinais durante o tratamento com Liraglutida

O ensaio de migração celular por *scratch wound healing assay* foi aplicado para quantificar a porcentagem de migração das células IEC-6. Como é possível observar no painel 6, as células tratadas com a Liraglutida apresentaram menor percentual de migração quando comparada ao controle. Em relação a migração celular avaliada nos tempos de 6 e 12 horas, apenas o tratamento com 0,25 e 1  $\mu\text{M}$  de Liraglutida obtiveram diferença estatística significativa em comparação com as células não-tratadas (Painel 7, gráficos A e B). No tempo de 24 horas, os tratamentos de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  com o fármaco apresentaram redução significativa

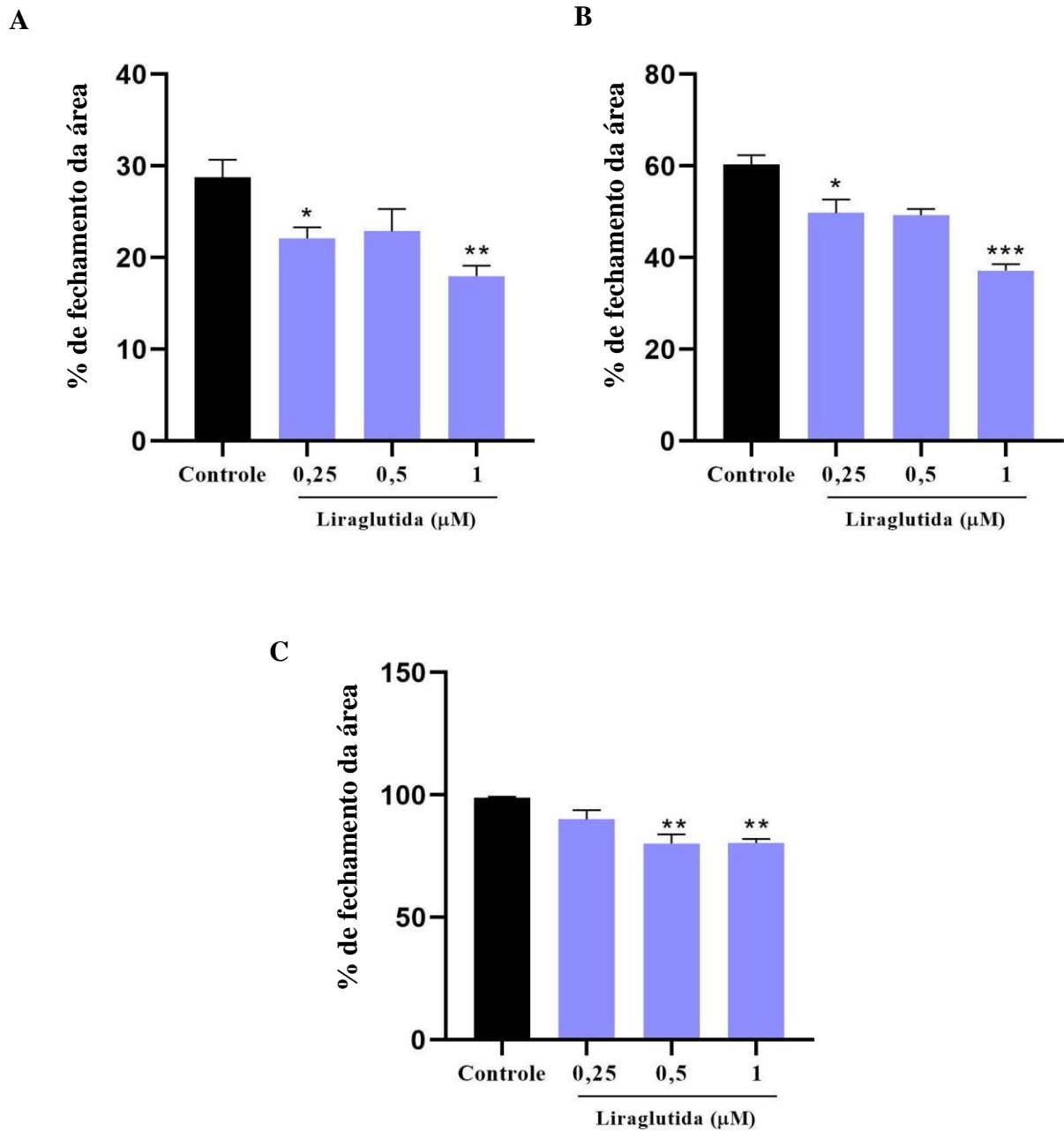
na migração celular (Painel 7, gráfico C). No painel 8 é possível observar as células do grupo controle ocupando toda a área que tinha sido lesionada anteriormente após 24 horas de tratamento, enquanto que nos grupos tratados, ainda são observadas áreas livres de células.

**Painel 6.** Efeito da Liraglutida na migração das células IEC-6.



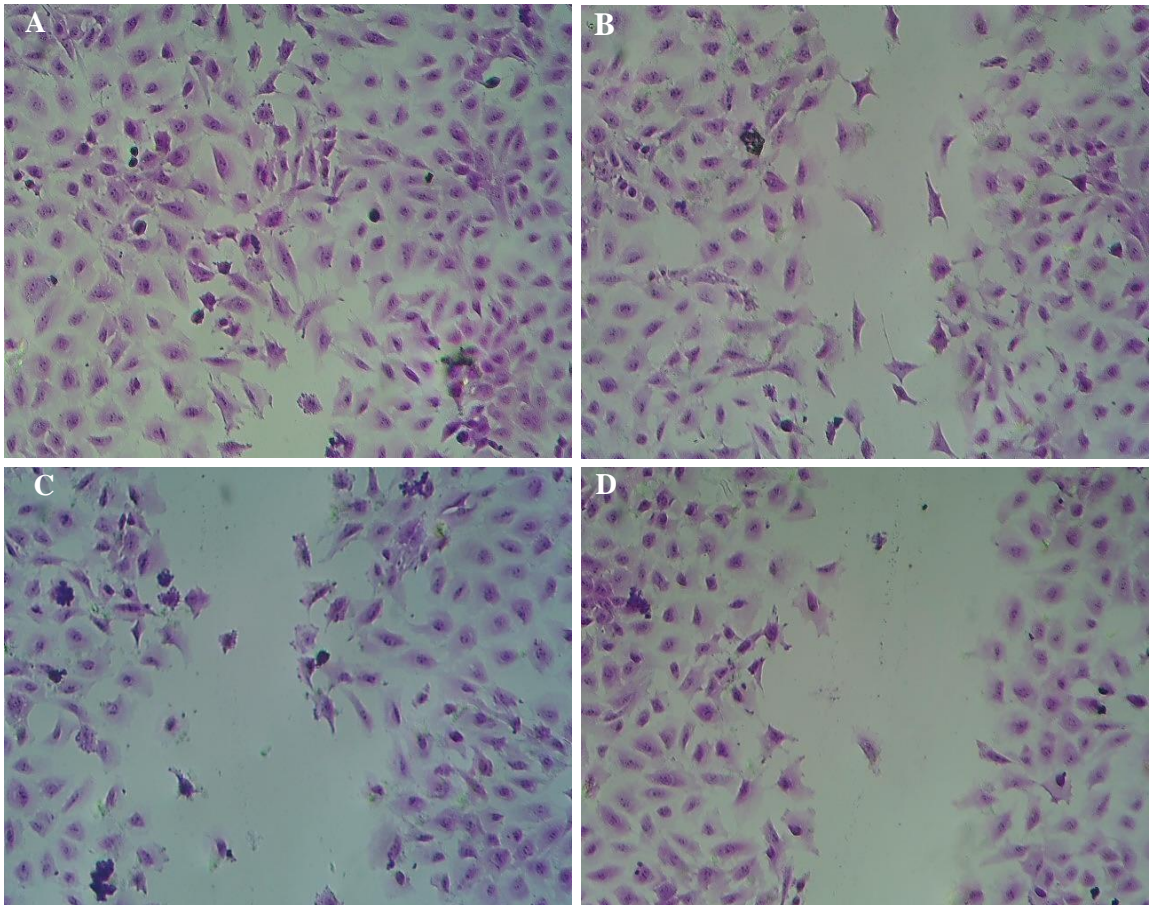
As células IEC-6 foram mantidas em uma placa de 24 poços com o meio DMEM 2% SBF (grupo controle) ou com Liraglutida nas concentrações de 0,25, 0,50, 1 μM diluída em DMEM 2% SBF. No dia do tratamento foram realizados riscos paralelos na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira estéril. A migração das células foi acompanhada no microscópio de luz invertido até o fechamento da área livre de células (delimitação em preto) em que foram tiradas fotomicrografias nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas. Aumento de 40x. **Fonte:** Próprio Autor

**Painel 7.** Percentual de migração das células IEC-6- tratadas com Liraglutida.



Nos gráficos está representado o percentual de fechamento da área livre de células durante o ensaio de migração *wound healing* nos tempos de (A) 6 horas, (B) 12 horas e (C) 24 horas. Os dados indicam média  $\pm$  SEM (n = 3-6). \*p < 0,05 e \*\*p < 0,01 comparado ao controle (células mantidas apenas em DMEM 2% SBF). **Fonte:** Próprio Autor

**Painel 8.** Efeito da Liraglutida sobre a migração das células IEC-6 após 24 de tratamento.



No painel está apresentado em (A) células do grupo controle mantidas em DMEM 2% SBF, (B) células tratadas com a liraglutida na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$ , (C) células tratadas com a liraglutida na concentração de 0,50  $\mu\text{M}$  e em (D) células tratadas com a a liraglutida na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Coloração com cristal violeta a 2%. Aumento de 200x. **Fonte:** Próprio Autor

## 6 DISCUSSÃO

A Liraglutida é um importante fármaco para o tratamento do diabetes mellitus 2 e obesidade, agindo sobre receptores do hipotálamo que aumentam a saciedade. Porém, efeitos colaterais são relatados, mas seus mecanismos ainda não foram completamente esclarecidos. Dessa maneira, o presente estudo buscou investigar o efeito da Liraglutida em células intestinais. Foi observado que o tratamento com a Liraglutida reduziu o número de células apoptóticas. Este dado concorda com estudos anteriores sobre o papel do GLP-1 na apoptose celular. Hui *et al.* (2003) verificou que o GLP-1 inibiu a apoptose em células de insulinoma de camundongos (MIN6) através de uma via de sinalização dependente do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). Pesquisas com ilhotas pancreáticas humanas recém-isoladas mostraram que o tratamento com o GLP-1 reduziu o número de células apoptóticas através da regulação negativa da caspase-3 ativa e à regulação positiva da proteína anti-apoptótica BCL-2 (FARILLA *et al.*, 2003).

Corroborando com esse resultado, o estudo de Challa *et al.* (2012) verificou a diminuição da apoptose em pré-adipócitos 3T3-L1 tratados com GLP-1 e Liraglutida na concentração de 0,01  $\mu$ M. Os autores mostraram que o efeito protetor das substâncias foi resultado da ativação das vias de sinalização da quinase extracelular regulada por sinal (ERK), da proteína quinase C (PKC) e da AKT, vias importantes na supressão de apoptose. De acordo com Quoyer *et al.* (2010), a inibição da apoptose em células  $\beta$  pancreáticas pelo GLP-1 é mediada pela  $\beta$ -arrestina 1, causando a ativação da via ERK1/2. Esse estudo demonstrou que a ativação dessa via pode acarretar na fosforilação do homólogo promotor de morte associado a Bcl-xL/Bcl-2 (BAD), inativando-o.

Resultados semelhantes foram relatados na literatura, por exemplo, o estudo de Yao, *et al.* (2021) observou a capacidade protetora da Liraglutida contra a apoptose das células do núcleo pulposo, causando diminuição na expressão de moléculas pró-apoptose, como a proteína x associada a BCL2, regulador de morte (BAX) e da caspase 3, e aumento da proteína BCL2. Seguindo o mesmo mecanismo anti-apoptótico, foi verificado que a Exenatida inibiu a apoptose de fibroblastos de rim de hamster bebê também por meio da redução da síntese de caspase-3, caspase-8 e caspase-9 (LI *et al.*, 2003). Com isso, podemos evidenciar possíveis mecanismos celulares pelos quais o GLP-1 e a Liraglutida estão agindo para inibir a apoptose das células IEC-6.

As células epiteliais colunares são mantidas conectadas por junções oclusivas (*tight junctions*), de suma importância para a passagem de nutrientes e antígenos. Essas conexões são formadas por um conjunto de proteínas intracelulares e transmembranares (KOEPPEN STANTON, 2009). Estudos demonstraram que a permeabilidade das conexões intercelulares



pode ser alterada devido ao contato com insumos tóxicos e agentes patológicos (YUHAN *et al.*, 1997; FASANO; UZZAU, 1997; PHILPOTT *et al.*, 1998; HOLMGREN *et al.*, 2003). Isso pode ocorrer devido a mudança no rearranjo dos filamentos de F-actina que compõem a membrana do enterócito, causando abertura dos poros nas junções aderentes e levando a um aumento da absorção intestinal (YUHAN *et al.*, 1997; PHILPOTT *et al.*, 1998).

Devido a isso, a próxima etapa do trabalho foi analisar a disposição das fibras de actina nas células IEC-6 após tratamento com a Liraglutida. Foi observado que as células tratadas com a Liraglutida apresentaram fibras de estresse e reorganização do citoesqueleto, diferente do observado no grupo controle. Resultados semelhantes foram relatados por Zhao e colaboradores (2019), mostrando que o tratamento com a Exenatida, um análogo do GLP-1, causou aumento nas fibras de estresse e alterações morfológicas nas linhagens celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y e em células PC12 derivadas de feocromocitoma de rato.

A remodelação do citoesqueleto pode ser desencadeada a partir da fosforilação da enzimacofilina, que é responsável pelo estado de polimerização e despolimerização das fibras de actina. Com base nisso, foi verificado que células tratadas com a Exenatida apresentaram aumento na expressão da cofilina fosforilada (inativação) podendo ser um indicativo da polimerização da actina (Zhao *et al.*, 2019). Essa reorganização do citoesqueleto pode estar associada a diminuição na capacidade migratória das células, como será abordado mais adiante.

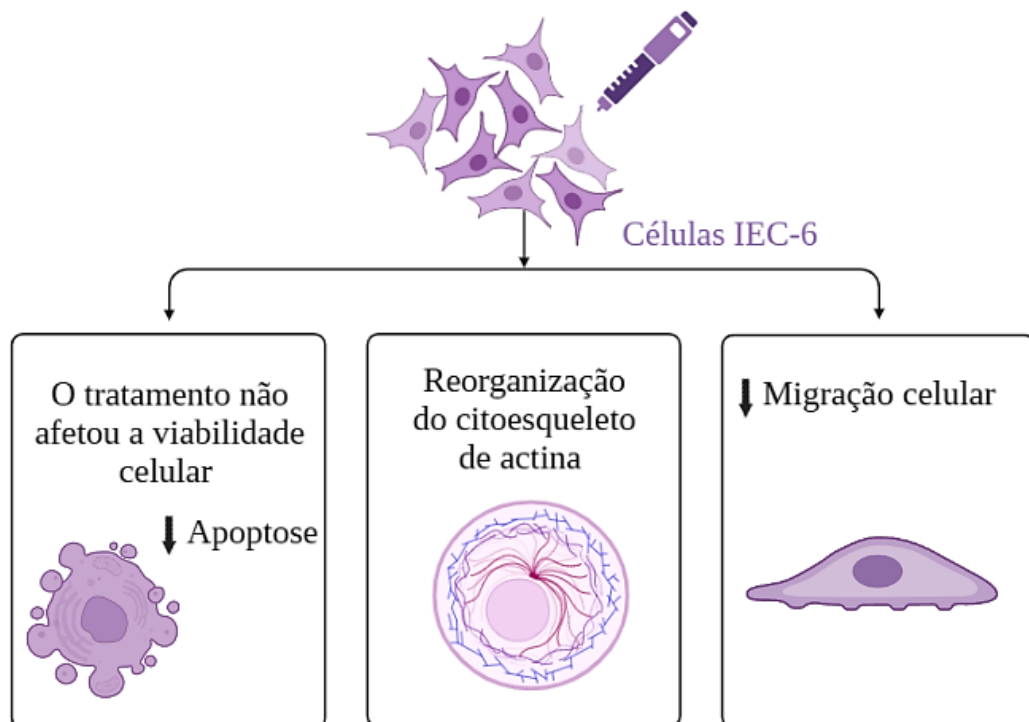
Como apresentado nos resultados, a Liraglutida diminuiu significativamente a capacidade de migração das células epiteliais intestinais de ratos durante o tratamento de 24 horas. De forma semelhante, o tratamento com a Exenatida reduziu significativamente a migração das células SH-SY5Y através da inativação da proteína cofilina (ZHAO *et al.*, 2019). Neste contexto, a reorganização das fibras de actina pode ser um fator importante para a motilidade das células. Existe uma quinase denominada de S6 70-kDa endógena (p70S6K) - proteína ribossomal S6 quinase  $\beta$ -1, cuja ativação é importante para organização das fibras de actina e regulação da migração celular. De acordo com Berven *et al.* (2004), a p70 S6K pode ser encontrada no arco da actina, onde estão os ativadores da motilidade celular, e nas fibras de estresse que servem para inibir o processo de migração. Além disso, fatores como a rapamicina podem inibir a migração de fibroblastos e de células epiteliais através da inibição da p70 S6K (CHANDRASEKHER *et al.*, 2001). Assim, é possível sugerir que a diminuição da migração induzida pelos análogos do GLP-1 seja mediada pela inativação das proteínas relacionadas a reorganização do citoesqueleto de actina.

Os achados presentes neste trabalho evidenciam a importância de mais estudos com o objetivo de analisar a influência da Liraglutida na expressão de proteínas importantes para os processos de morte celular e migração das células epiteliais intestinais de ratos. Dessa forma, poderemos averiguar com mais precisão os possíveis mecanismos celulares envolvidos na colateralidade do tratamento com a Liraglutida.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que o tratamento com a Liraglutida não afeta a viabilidade celular e tem a capacidade de inibir a apoptose das células. No entanto, observamos que a Liraglutida causa uma reorganização do citoesqueleto de actina, formando fibras de estresse proeminentes e diminuindo as junções célula-célula. Além disso, o fármaco inibe a capacidade migratória das células. Diante disso, sugere-se que o tratamento com a Liraglutida seja prejudicial para as células epiteliais intestinais, devido as alterações na morfologia e na motilidade celular (Figura 9). Todavia, são necessários mais estudos para confirmar esses resultados, avaliando, por exemplo, a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e a migração celular não apenas nas células IEC-6, mas também em outras linhagens de células intestinais. De posse desses dados, será possível compreender o papel da Liraglutida na fisiologia das células intestinais e sua possível relação com os eventos adversos gastrointestinais causados pela sua administração.

**Figura 9.** Efeitos da Liraglutida sobre as células epiteliais intestinais.



**Fonte:** Próprio autor (2023).

## REFERÊNCIAS

ADEREM, A; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu. Rev. Immunol.* Adverse effects of GLP-1 receptor agonists. The review of diabetic studies: RDS, v. 11, n. 1999.

ALVAREZ-LEITE, J. I; SOARES, F. L. P; TEIXEIRA, L. G. Controle Neuroendócrino da Sociedade. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**, November, 389–410. 2016.

ARD, Jamy et al. Weight loss and maintenance related to the mechanism of action of glucagon-like peptide 1 receptor agonists. **Advances in therapy**, v. 38, n. 6, p. 2821-2839, 2021.

ARMSTRONG, Matthew James *et al.* Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. **The Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 679-690, 2016.

BAGGIO, Laurie L.; DRUCKER, Daniel J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, 2007.

BAYLISS WM, STARLING EH. On the causation of the so-called ‘peripheral reflex secretion’ of the pancreas. **Proc R Soc Lond Biol**; 1902.

KOEPPEN, Bruce; STANTON, Bruce. **Berne e Levy: Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BERVEN, Leise A.; WILLARD, Francis S.; CROUCH, Michael F. Role of the p70S6K pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. **Experimental cell research**, v. 296, n. 2, p. 183-195, 2004.

BRANDEIS, J.M. SAYEGH, M.H. Gallon, L. Blumberg, R.S. Carpenter, C.B. Rat intestinal epithelial cells present major histocompatibility complex allopeptides to primed T cells, **Gastroenterology** 107 (1994) 1537–1542.

BUCHAN AM; POLAK JM; CAPELLA C; SOLCIA E; PEARSE AG. Electronimmunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. **Histochemistry** 1978;56

CAMMILO, Christina. Atlas virtual histologia UFRN. Disponível em: [histologiaufrn.blogspot.com](http://histologiaufrn.blogspot.com). Acessado em: 5 jan. 2023.

CAMPBELL, Jonathan E.; DRUCKER, Daniel J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. **Cell metabolism**, v. 17, n. 6, p. 819-837, 2013.

CARVALHO, Eunice Bobô de. **Efeito da modulação da glutamina, alanil-glutamina, β-**

**caroteno, zinco e do leite de cabra transgênico contendo lisozima humana, em células epiteliais intestinais sob ação da Escherichia coli enteroagregativa.** 2011.

CHALLA, Tenagne Delessa *et al.* Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6421-6430, 2012.

CHANDRASEKHER, Gudiseva; KAKAZU, Azucena H.; BAZAN, Haydee EP. HGF-and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells: its relevance in wound healing. **Experimental eye research**, v. 73, n. 2, p. 191-202, 2001.

CHENG, H. LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main intestinal cell types in the mouse small intestine. **Am. J. Anat.** 141 (1974a) 461–562.

CHENG, H. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells, **Am. J. Anat.** 141 (1974b) 521–536.

CONNER, S.D. SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell, **Nature** 422 37–44. (2003)

CREUTZFELDT W, EBERT R. New developments in the incretin concept. **Diabetologia**. 1985.

DEACON CF; JOHNSEN AH; HOLST JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. **J Clin Endocrinol Metab** 1995.

DEACON CF; NAUCK MA; TOFT-NIELSEN M; PRIDAL L; WILLMS B; HOLST JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide 1 are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. **Diabetes** 1995.

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

DESSEYN J.L., AUBERT J.P., PORCHET N., LAINE A., Evolution of the large secreted gel-forming mucins, **Mol. Biol. Evol.** 17 (2000) 1175– 1184.

ELBRØND B; JAKOBSEN G; LARSEN S *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon like peptide 1 derivative, in healthy male subjects. **Diabetes Care** 2002.

**Exenatide SPC.** Disponível em:

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/humano/000698/WC500051845.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/humano/000698/WC500051845.pdf). Acesso em: 05 jan. 2023.

FARILLA, Loredana *et al.* Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5149-5158, 2003.

FASANO, A; UZZAU, S. Modulation of intestinal tight junctions by Zonula occludens toxin permits enteral administration of insulin and other macromolecules in an animal model, **J. Clin. Invest.** 99 (1997).

FEHMANN HC; GÖKE R; GÖKE B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. **Endocr Rev** 1995.

FILIPPATOS, Theodosios; PANAGIOTOPOULOU, D; THALIA V.; ELISAF; MOSES S. GAO, Huiting *et al.* The glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide inhibits oxidative stress and inflammatory response in the liver of rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 694-702, 2015.

GASPARI, Tracey *et al.* A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE<sup>-/-</sup> mouse model. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 8, n. 2, p. 117-124, 2011.

GAUTIER, J.-F.; CHOUKEM, S.-P.; GIRARD, J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. **Diabetes & metabolism**, v. 34, p. S65-S72, 2008.

GUMBINER B.M., Breaking through the tight junction barrier, **J. Cell Biol.** 123 (1993) 1631–1633

GUPTA, Vishal. Glucagon-like peptide-1 analogues: an overview. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 17, n. 3, p. 413-421, 2013.

HALL, P.A. COATES, P.J. Ansari, . B. Hopwood, D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis, **J. Cell Sci.** 1994.

HEINEMANN L, Sinha K, Weyer C, Loftager M, Hirschberger S, Heise T. Time-action profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin analogue NN304. **Diabet Med.** 1999.

HERSHBERG, R.M. Framson, P.E. Cho, D.H. Lee, L.Y. Kovats, S. Beitz, J. *et al.*, Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing, **J. Clin. Invest.** 1997.

HERSHBERG, R.M. Mayer, L.F. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells—polarity and complexity, **Immunol. Today** 2000.

HERSHBERG, R.M. Cho, D.H. Youakim, A. Bradley, M.B. Lee, J.S. Framson, P.E. Nepom, G.T. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells, **J. Clin. Invest.** 1998.

HOLMGREN, J. Czerkinsky, C. Eriksson, K. Mharandi, A. Mucosal immunization and

adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. **Vaccine** **21** (S2/89–S2/95). 2003.

HOLZ GG, Chepurny OG. Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: New therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus. **Curr Med Chem**. 2003.

HUI, Hongxiang et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A-and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1444-1455, 2003.

HUPE-SODMANN K, Goke R, Goke B, Thole HH, Zimmermann B, Voigt K, et al. Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1 (7 – 36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells. **Peptides** 1997.

HUPE-SODMANN K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Goke R, Goke B, Thole H, et al. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7 – 36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. **Regul Pept** 1995.

ISHII H, Sato Y, Takei M, Nishio S, Komatsu M. Glucose-incretin interaction revisited. *Endocrine journal*. **Epub** 2011.

IWAI, Takashi et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1 $\beta$  production in cultured rat astrocytes. **Neuroscience research**, v. 55, n. 4, p. 352-360, 2006.

JENSTERLE, M., *et al.* Short-term effectiveness of low dose liraglutide in combination with metformin versus high dose liraglutide alone in treatment of obese PCOS: randomized trial. **BMC Endocrine Disorders**. Eslovênia, v. 17. P. 1-6, 2017.

JUHL CB, Hollingdal M, Sturis J, Jakobsen G, Agersø H, Veldhuis J, et al. Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. **Diabetes**. 2002.

JUHL CB, Hollingdal M, Sturis J, Jakobsen G, Agersø H, Veldhuis J, et al. Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. **Diabetes**. 2002.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAISERLIAN, D. Vidal, K. Revillard, J.P. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells, **Eur. J. Immunol**. 1989.

KIM JG, Baggio LL, Bridon DP, Castaigne JP, Robitaille MF, Jetté L, et al. Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: The ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. **Diabetes**. 2003.

KNUDSEN LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. **J Med Chem** 2000.

KOJIMA, Hideto *et al.* Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1398-1408, 2002.

KREYMANN B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. **Lancet** 1987.

LA BARRE J. Sur les possibilites d'un traitement du diabete par l'incrétine. **Bull Acad R Med Belg** 1932.

LEE, Choon-Soo *et al.* Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor increases vascular leakage in retina through VE-cadherin phosphorylation. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2016.

LI, Y. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates b cell apoptosis. **J. Biol. Chem.** 2003.

LOEFFLER, H. Birke, A. Winton, D. Potten, C. Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt, **J. Theor. Biol.** 1993.

LOPES, G. G. C., Pullig, E. de A., Netto, G. P. M., Matos, I. C., Ribeiro, J. M., & de Oliveira, A. M. Liraglutida e outros análogos do glp-1: nova perspectiva no tratamento do sobrepeso e obesidade. **Revista Atenas Higeia**, 2020.

MAYRHOFER, G. Spargo, L.D. Distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the rat jejunum and their association with organelles of the endocytic pathway. **Immunology**, 1990.

MCCLEAN, Paula L.; HÖLSCHER, Christian. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 57-67, 2014.

MEIER JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol.** 2012.

MENTLEIN R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **Eur J Biochem** 1993.

MENTLEIN R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)–role in the inactivation of regulatory peptides. **Regul Pept** 1999.

MESQUITA, Fernanda Cristina de *et al.* **Efeito da Liraglutida sobre a fibrose hepática e células estreladas ativadas.** 2017.

MONTAGNE L., Piel C., Lalles J.P., Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications, **Nutr. Rev.** 2004.



MOORE B, Edie ES, Abram JH. On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane. **Biochem J**, 1906.

MOREIRA, Luciana de Souza et al. **Estudo da modulação de corpúsculs lipídicos em células epiteliais**. 2007. Tese de Doutorado.

MORTENSEN K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. **Regul Pept** 2003.

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

NERES, M S; NETTO, P A; GUSMÃO, R V. **A Liraglutida no tratamento da obesidade**. Faculdade Unidas de Campinas - Goiânia, 2019.

NIGRO, Ana Helena Lancellotti et al. Medicamentos utilizados no tratamento da obesidade: revisão da Literatura. **International Journal of Health Management Review**, v. 7, n. 3, 2021.

NORRIS SL, Lee N, Thakurta S, Chan BKS. Exenatide efficacy and safety: A systematic review. **Diabet Med**. 2009.

NOVO NORDISK. (2019). **Saxenda ® Liraglutida**. 1–27.  
[https://www.novonordisk.com.br/content/dam/brazil/affiliate/www-novonordiskbr/Profissionais\\_da\\_Saude/Bulas-profissionais-de-saude/Saxenda\\_Bula\\_Profissional.pdf](https://www.novonordisk.com.br/content/dam/brazil/affiliate/www-novonordiskbr/Profissionais_da_Saude/Bulas-profissionais-de-saude/Saxenda_Bula_Profissional.pdf). Acesso em: 5 jan. 2023.

NOYAN-ASHRAF, Mohammad Hossein et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 975-983, 2009.

OHKI, Takamasa et al. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone. **The Scientific World Journal**, 2012.

OSWALD, Isabelle P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. **Veterinary research**, v. 37, n. 3, p. 359-368, 2006.

PAPPENHEIMER, J.R. Volpp, K. Transmucosal impedance of small intestine: correlation with transport of sugars and amino acids, **Am. J. Physiol**. 1992.

PARTHSARATHY, Vadivel; HÖLSCHER, Christian. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. **European journal of pharmacology**, v. 700, n. 1-3, p. 42-50, 2013.

PEREZ-VILAR J., Hill R.L., The structure and assembly of secreted mucins, **J. Biol. Chem.** (1999).

PETRITSCH, Claudia et al. TGF- $\beta$  inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest. **Genes & development**, v. 14, n. 24, p. 3093-3101, 2000.

PHILPOTT, D.J. McKay, D.M. Mak, W. Perdue, M.H. Sherman, P.M. Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic Escherichia coli-induced alterations in T84 epithelial permeability, **Infect. Immun.** (1998).

QUOYER, Julie et al. GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a  $\beta$ -arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic  $\beta$ -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1989-2002, 2010.

ROBERGE JN, Brubaker PL. Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. **Endocrinology** 1991.

ROCCA AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. **Endocrinology** 1999.

SANCHO, Elena; BATLLE, Eduard; CLEVERS, Hans. Signaling pathways in intestinal development and cancer. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 695-723, 2004.

SNOECK, Veerle; GODDEERIS, Bruno; COX, Eric. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. **Microbes and infection**, v. 7, n. 7-8, p. 997-1004, 2005.

STADNYK A.W., Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines, *Can. J. Gastroenterol.* (2002).

SUN, Feng et al. Impact of GLP-1 receptor agonists on major gastrointestinal disorders for type 2 diabetes mellitus: a mixed treatment comparison meta-analysis. **Experimental diabetes research**, v. 2012, 2012.

THEODORAKIS MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. **Am J Physiol** 2006.

UNGER RH, Eisentraut AM. Entero-insular axis. **Arch Intern Med** 1969.

VANHOUTTE, Paul M. Endothelial dysfunction the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. 4, p. 595-601, 2009.

VELLA A, Shah P, Reed AS, Adkins AS, Basu R, Rizza RA. Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7,36)-amide on insulin action in nondiabetic humans. **Diabetologia**. 2002.

YAO, Mingyan et al. Liraglutide protects Nucleus Pulposus Cells against high-glucose induced apoptosis by activating PI3K/Akt/mTOR/caspase-3 and PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ /caspase-3 Signaling Pathways. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 630962, 2021.

YOSHIDA, Shigeru et al. PDX-1 induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2505-2513, 2002.

YUHAN, R. Koutsouris, . A. Savkovic, S.D. Hecht, G. Enteropathogenic Escherichia coli-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability, **Gastroenterology**, 1997.

ZANCHETT, CAMILE CECCONI CECHINEL. **Avaliação dos efeitos das frações ricas em flavonoides das folhas de *Bauhinia forficata* e *Campomanesia reitziana* na mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico irinotecano em camundongos.** Itajaí (SC), 2017.

ZHAO, Fei et al. Exendin-4 promotes actin cytoskeleton rearrangement and protects cells from Nogo-A- $\Delta$ 20 mediated spreading inhibition and growth cone collapse by down-regulating RhoA expression and activation via the PI3K pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 135-143, 2019.