



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCO JÚLIO WERNER DOS SANTOS SIQUEIRA

**ALTERAÇÃO DA BARREIRA MORFOFUNCIONAL INTESTINAL PELA
HIPERGLICEMIA E MODULAÇÃO DA ALANIL-GLUTAMINA NA DINÂMICA
HIDROELETROLÍTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES COM
ENTEROPATIA E DIARREIA SECRETÓRIA**

FORTALEZA

2018

FRANCISCO JÚLIO WERNER DOS SANTOS SIQUEIRA

**ALTERAÇÃO DA BARREIRA MORFOFUNCIONAL INTESTINAL PELA
HIPERGLICEMIA E MODULAÇÃO DA ALANIL-GLUTAMINA NA DINÂMICA
HIDROELETROLÍTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES COM
ENTEROPATIA E DIARREIA SECRETÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Linha de Pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias, vinculado ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI).

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S235a Santos Siqueira, Francisco Júlio Werner dos.
Alteração da barreira morfofuncional intestinal pela hiperglicemia e modulação da alanil-glutamina na dinâmica hidroeletrolítica em modelo animal de diabetes com enteropatia e diarreia secretória / Francisco Júlio Werner dos Santos Siqueira. – 2018.
129 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Diabetes Mellitus Experimental. 2. Diarreia. 3. Junções firmes. 4. Glutamina. I. Título.
- CDD 615.1
-

FRANCISCO JÚLIO WERNER DOS SANTOS SIQUEIRA

**ALTERAÇÃO DA BARREIRA MORFOFUNCIONAL INTESTINAL PELA
HIPERGLICEMIA E MODULAÇÃO DA ALANIL-GLUTAMINA NA DINÂMICA
HIDROELETROLÍTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES COM
ENTEROPATIA E DIARREIA SECRETÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Linha de Pesquisa: Doenças Infecciosas e Parasitárias, vinculado ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI).

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renan Magalhães Montenegro Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha família

Como é feliz quem teme ao Senhor, quem anda em seus caminhos! Você comerá do fruto do seu trabalho, e será feliz e próspero. Sua mulher será como videira frutífera em sua casa; seus filhos serão como brotos de oliveira ao redor da sua mesa. Assim será abençoado o homem que teme ao Senhor! Que o Senhor o abençoe desde Sião, para que você veja a prosperidade de Jerusalém todos os dias da sua vida, e veja os filhos dos seus filhos. Haja paz em Israel!

Salmos 128:1-6

AGRADECIMENTOS

Faltar-me-iam palavras para ser grato a todos aqueles que se fizeram participantes nesta jornada científica e nesta fase de minha vida. Foram mais de dois anos intensos. Houveram muitos temores, angústias e pesares, porém grandes realizações. Foi neste período, entre 14 de março de 2016 e julho de 2018, que pude mergulhar em uma dependência de Deus sincera e, através da esperança Nele, pude me manter focado em fechar este ciclo e buscar ser melhor. Este processo me trouxe um fortalecimento do caráter, da minha humanidade e do meu conhecimento científico. Desta forma sou grato a:

Jesus – meu Senhor, meu Rei e meu Salvador. Devo-lhe minha vida e meu coração, sendo grato por tudo o que tem feito até aqui

Lydia Vieira Freitas dos Santos – minha amada esposa, amiga, confidente e ajudadora. Devo a ela todo o crédito de nunca ter deixado desistir e por ser participante de todas as etapas da minha vida e da minha formação profissional. Sou grato pelas noites em que acolheu minha tristeza com amor e ternura e por ter sido a excelente corretora das minhas normas.

Caleb e Maria Júlia – meus amados filhos. Eles são a minha fonte de inspiração de ser um pai melhor, um esposo melhor, um homem melhor e um profissional melhor. Caleb é meu primogênito e só tinha três meses quando iniciei o meu mestrado. Maria Júlia virá em breve, mas já é a coroa que celebra o final desta caminhada científica.

Maria do Socorro – minha preciosa mãe. Ela me ensinou a valorizar o conhecimento e o trabalho, as únicas formas de verdadeiramente mudar a realidade de vida de um ser humano. Amo por ter se sacrificado por mim e por meus irmãos, por ter se mantido idônea e um exemplo de ser humano que almejo em ser. O seu sacrifício desde a infância tem sido recompensado por Deus.

Maria Miriam e Francisco Davi – meus avós. Tenho saudades de compartilhar as minhas vitórias com eles. Devoto muita gratidão pela acolhida amorosa em momento mais importante de nossas vidas e os seus esforços na labuta da vida humilde que construiu um legado que eles contemplaram apenas pela fé.

Felipe Giordano e Evne – meus preciosos irmãos. Sou grato pela companhia e por ter o privilégio de compartilhar os sonhos desde os menores até os mais utópicos.

Francisco José Costa Freitas – meu sogro e pai na fé. O meu verdadeiro pai que tive o privilégio de escolher e ser escolhido. Sou grato a Deus por ter me dado este presente, podendo me ter a oportunidade de aprender a ser esposo, pai, amigo.... A pessoa que mais

sinto falta e que tenho certeza que estaria vibrando com esta conquista. Não consigo mensurar o quanto o amava.

Leonízia, Aline, Rafael, Karine, Mariana e Clenilson – irmãos amados, amigos preciosos e componentes inestimáveis do meu núcleo familiar. São fonte de inspiração e promotores de uma cultura dos céus.

Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima – meu querido orientador. Sua postura idônea, comprometimento com a pesquisa, determinação em encontrar os caminhos e visão humanitária são uma marca que o diferencia de tantos outros. Sou grato pela oportunidade de crescimento, mesmo diante dos momentos mais difíceis e de grandes tensões, por ter aberto as portas do laboratório desde quando estava na iniciação científica.

Dr. Alexandre Havt Bindá – um verdadeiro co-orientador. Sou grato pelas palavras de incentivo, pela gentileza e paciência em compartilhar o conhecimento e buscar as respostas em meio ao oceano de perguntas.

Dr. Francisco Advane – um pesquisador nato. Sou grato pela amizade, companheirismo e por ter sido um promotor de crescimento científico. As discussões que iam além das paredes do pubmed também foram enriquecedoras. Agradeço por participar ativamente da formulação deste trabalho.

Discentes do laboratório e do programa de pós graduação – Herlice, Samilly, Cleber, Daynesi, Karolina, Nathalia, Marília, Mariana, Pedro, Mara, Rafaelas, Lívia, Josi, Rômulo, Jéssica. Estes amigos, e uma verdadeira família, participaram direta e indiretamente para que o sacrifício dos ratos não ficasse ao ermo e os resultados pudessem gerar a formação de conhecimento científico. Sou grato a Deus por tê-los colocado em minha vida.

Staff do laboratório - José, Terezinha, Conceição, Chales, Charliene, Luciana, Kátia, Quirino, Júnior, Jefferson, Cláudia. Pessoas que com características distintas compõem um time que supre as necessidades do ambiente e contribuem para que o futuro seja escrito para a posteridade.

Aos estudantes de pós graduação do Brasil – sou grato a Deus por todos os homens e mulheres, jovens, que estão produzindo o futuro do conhecimento e da tecnologia que podem promover uma revolução nesta nação. Sou grato pelo esforço, dedicação e comprometimento destes que de diversas formas passam por dificuldades, constrangimentos e até mesmo por episódios de degradação dos sentimentos e das reservas psicológicas. Sou grato por eles enxergarem na educação a porta de um futuro mais promissor. Sou grato por eles levantarem a cabeça mesmo quando as infraestruturas físicas e humanas não favorecem ao seu desenvolvimento.

RESUMO

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome crônica multifatorial que afeta milhões de pacientes no mundo. Sua ocorrência desencadeia inúmeras desordens funcionais e metabólicas, dentre estas a lesão barreira epitelial intestinal, associada a manifestação de diarreia. O presente estudo avaliou a patobiologia da lesão da barreira intestinal desencadeada pela DM1 e investigando a eficácia da reidratação com solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) na ocorrência de uma diarreia secretória aguda em modelo animal. Ratos wistar (12-16 semanas, pesando ± 300 g), foram divididos aleatoriamente nos grupos controle (CTRL) e DM-1. O grupo DM-1 foi induzido com estreptozotocina (70mg/Kg) por via intraperitoneal. Todos animais foram mantidos por 14 dias em gaiolas metabólicas. Ao final do protocolo experimental foram realizadas análises de bioimpedância, perfusão intestinal, dosagem de aminoácidos e de permeabilidade intestinal (teste de lactulose e manitol) pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), além das determinações bioquímicas e investigação histopatológica. No tecido intestinal foram avaliadas expressão gênica de proteínas de junções firmes Claudina-2, Claudina-15, Ocludina e ZO-1; além dos transportadores SGLT-1, PEPT-1, NHE3, CFTR. Também foi avaliada solução de ALGLN na recuperação hidroeletrólítica de animais CTRL e DM1 e após a indução de diarreia secretória com $1\mu\text{g/ml}$ de toxina do Cólera através de perfusão intestinal na presença ou ausência de soluções de ringer (R), glicose (OMS) e ALGLN. A DM1 induziu uma hiperglicemia ($> 400\text{mg/dL}$) associada com polidipsia, polifagia, poliúria, perda de massa gorda, massa magra e aumento de vilos e criptas do intestino delgado; redução da concentração sérica de glutamina, arginina, Ac. glutâmico e alanina. Foram observadas perdas intestinais CTRL vs DM1: Na^+ ($-0,3564 \pm 4,383 \text{ mEq}$ vs $-14,42 \pm 0,6168 \text{ mEq}$) K^+ ($-0,4553 \pm 0,1351 \text{ mEq}$ vs $-1,052 \pm 0,04292 \text{ mEq}$) Cl^- ($-2,129 \pm 3,264 \text{ mEq}$ vs $-12,73 \pm 0,9536 \text{ mEq}$); Osm ($-1,526 \pm 8,454 \text{ mOsm/Kg}$ vs $-36,07 \pm 2,138 \text{ mOsm/Kg}$). Houve redução de perdas após perfusão com solução de ALGLN. Os animais DM-1 aumentaram a permeabilidade intestinal observada pela maior excreção Lactulose (CTRL: $1,510 \pm 0,2218$ vs DM1: $8,502 \pm 0,5271$). A razão lac/man confirmou essa exacerbação do transporte via rota paracelular (CTRL: $0,4183 \pm 0,01474$ vs DM1: $1,916 \pm 0,2258$). Houve redução da expressão gênica relativa de Claudina-2, -15 e NHE₃ e aumento de RNAm de SGLT-1. Observou-se um efeito secretório da toxina do cólera no DM1 [Na^+ ($-43,80 \pm 4,809 \text{ mEq}$), K^+ ($-2,508 \pm 0,2069 \text{ mEq}$), Cl^- ($-35,97 \pm 4,275 \text{ mEq}$), Osm: ($-87,82 \pm 10,73 \text{ mOsm/Kg}$)]. No entanto, a solução de ALGLN foi capaz de reduzir tais perdas hidroeletrólíticas [Na^+ ($-6,559 \pm 1,127 \text{ mEq}$), K^+ ($0,9492 \pm 0,2036 \text{ mEq}$), Cl^- ($-3,013 \pm 1,020 \text{ mEq}$), Osm: ($-21,12 \pm 5,630 \text{ mOsm/Kg}$)]. A partir desses resultados ALGLN se mostrou eficiente para recuperação hidroeletrólítica durante a disfunção intestinal no diabetes, assim apresentando reversão do dano desencadeado pela toxina colérica. Assim, sugere-se a ALGLN como futura ferramenta farmacológica para intervenção das desordens intestinais desencadeadas no DM-1 e infecções por cólera.

Descritores: Diabetes Mellitus Experimental. Diarreia. Junções firmes. Glutamina

ABSTRACT

ALTERATION OF THE MORPHFUNCTIONAL INTESTINAL BARRIER FOR HYPERGLYCEMIA AND MODULATION OF ALANYL-GLUTAMINE IN THE HYDROELECTROLYTIC DYNAMICS IN ANIMAL MODEL OF DIABETES WITH ENTEROPATHY AND SECRETORY DIARRHEA

Diabetes Mellitus type 1 (DM-1) is a chronic multifactorial syndrome that affects millions of patients worldwide. Its occurrence triggers innumerable functional and metabolic disorders, among them the intestinal epithelial barrier lesion, associated with the manifestation of diarrhea. The present study evaluated the pathobiology of the intestinal barrier injury triggered by DM-1 and investigated the efficacy of Alanil-glutamine-based solution (ALGLN) on the occurrence of acute secretory diarrhea in the animal model. Wistar rats (12 - 16 weeks, weighing \pm 300g), which were randomly divided into control (CTRL) and DM-1 groups. The DM-1 group was induced with intraperitoneal streptozotocin (70mg / kg). All animals were kept for 14 days in metabolic cages. At the end of the experimental protocol, bioimpedance, intestinal perfusion, amino acid and intestinal permeability tests (lactulose and mannitol test) were performed by high performance liquid chromatography (HPLC), as well as biochemical and histopathological investigations. In the intestinal tissue we evaluated the gene expression of Claudine-2, Claudine-15, Occludin and ZO-1 firm junction proteins; in addition to the SGLT-1, PEPT-1, NHE3, CFTR transporters. We also evaluated ALGLN solution in the hydroelectrolytic recovery of CTRL and DM1 animals and after induction of secretory diarrhea with 1 μ g / ml Cholera toxin through intestinal perfusion in the presence or absence of ringer, glucose (OMS) and ALGLN solutions. DM1 induced hyperglycemia (> 400mg / dL) associated with polydipsia, polyphagia, polyuria, loss of fat mass, lean mass and increase of villi and crypts of the small intestine; reduction of serum glutamine concentration, arginine, Ac. glutamic and alanine. Intestinal losses CTRL vs. DM1: Na + (-0.3564 \pm 4.333 mEq vs. -14.42 \pm 0.6168 mEq) K + (-0.4553 \pm 0.1331 mEq vs. -1.052 \pm 0.04292 mEq) 2,129 \pm 3,264 mEq vs -12.73 \pm 0.9536 mEq); Osm (-1.526 \pm 8.454 mOsm / kg vs. -36.07 \pm 2.138 mOsm / kg). There was reduction of losses after perfusion with ALGLN solution. DM-1 animals increased the intestinal permeability observed by increased Lactulose excretion (CTRL: 1.510 \pm 0.2218 vs DM1: 8.502 \pm 0.5271). The lac / man ratio confirmed this exacerbation of paracellular route transport (CTRL: 0.4183 \pm 0.01474 vs DM1: 1.916 \pm 0.2258). There was a reduction of the relative gene expression of Claudine-2 and -15 and increase of SGLT-1 mRNA. A secretory effect of cholera toxin on DM1 (Na + (-43.80 \pm 4.809), K + (-2.508 \pm 0.2069), Cl- (-35.97 \pm 4.275), Osm: (-87, 82 \pm 10.73)]. However, the ALGLN solution was able to reduce such hydroelectrolytic losses (Na + (-6.559 \pm 1.127), K + (0.9492 \pm 0.2036), Cl- (-3.013 \pm 1.020), Osm: (-21.12 \pm 5.630)]. From these results ALGLN proved to be efficient for hydroelectrolytic recovery during intestinal dysfunction in diabetes, thus showing reversion of the damage triggered by the cholera toxin. Thus, ALGLN is suggested as a future pharmacological tool for intervention of intestinal disorders triggered in DM-1 and cholera infections.

Keywords: Diabetes Mellitus, Experimental. Diarrhea. Tight Junctions. Glutamine

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Estrutura molecular da Glutamina.....	18
FIGURA 2 -	Via de conversão da glutamina.....	19
FIGURA 3 -	Metabolismo energético pelo ciclo do ácido tricarboxílico.....	20
FIGURA 4 -	Atividade endógena da glutamina.....	21
FIGURA 5 -	Atividade do transportador de di/tripeptídeo (PEPT-1).....	23
FIGURA 6 -	Componentes da barreira morfofuncional intestinal.....	25
FIGURA 7 -	Componentes proteicos da barreira morfofuncional intestinal.....	26
FIGURA 8 -	Distribuição das claudinas no trato gastrointestinal.....	27
FIGURA 9 -	Relação entre claudinas 2 e 15 com a dinâmica da absorção de glicose.....	28
FIGURA 10 -	Princípio farmacológico da reidratação oral pelo transportador SGLT-1..	30
FIGURA 11 -	Linha de tempo experimental.....	36
FIGURA 12 -	Desenho esquemático da perfusão intestinal.....	43
FIGURA 13 -	Mecanismo de ação da toxina do cólera.....	51
FIGURA 14 -	Representação esquemática dos grupos experimentais para perfusão intestinal.....	53
FIGURA 15 -	Fluxograma da análise estatística dos dados.....	55
FIGURA 16 -	Bioquímica plasmática CTRL x DM1.....	56
FIGURA 17 -	Aminoácidos quantificados em soro de animais CTRL e DM1 no D14.....	58
FIGURA 18 -	Medida de Balanço Nitrogenado ente CTRL x DM1.....	59
FIGURA 19 -	Alteração de parâmetros fisiológicos após 14 dias de indução diabética...	60
FIGURA 20 -	Análise da composição corporal de ratos controles e diabéticos nos dias D0 e D14.....	62
FIGURA 21 -	Morfometria de vilos e criptas do duodeno de animais CTRL x DM1.....	63
FIGURA 22 -	Morfometria de vilos e criptas do jejuno de animais CTRL x DM1.....	64
FIGURA 23 -	Morfometria de vilos e criptas do íleo de animais CTRL x DM1.....	65
FIGURA 24 -	Alteração da permeabilidade intestinal em animais controle e diabéticos a partir do D14 da indução diabética.....	66

FIGURA 25 -	Quantificação do transporte hidroeletrolítico no íleo intestinal de ratos controles e diabéticos pelo método de perfusão intestinal no D14.....	69
FIGURA 26 -	Estresse oxidativo em segmento de íleo de CTRL x DM1.....	70
FIGURA 27 -	Quantificação da transcrição gênica de proteínas componentes das junções firmes em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14.....	75
FIGURA 28 -	Quantificação da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14.....	76
FIGURA 29 -	Avaliação da eficácia da solução de Alanil- glutamina na recuperação da perda hidroeletrolítica de animais diabéticos.....	77
FIGURA 30 -	Alteração hidroeletrolítica em modelo de diarreia secretória induzida pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos.....	79
FIGURA 31 -	Avaliação das soluções de reidratação na recuperação hidroeletrolítica após indução de diarreia secretória em animais controles e diabéticos.....	81
FIGURA 32 -	Metabolismo da glutamina e hipótese da lesão de barreira intestinal desencadeada pela diabetes.....	93
FIGURA 33 -	Alanil-Glutamina restabelece equilíbrio hidroeletrolítico intestinal na DM1.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Iniciadores de genes e condições e das temperaturas de anelamento.....	50
TABELA 2 -	Composição das soluções empregadas na perfusão intestinal.....	52
TABELA 3 -	Bioquímica plasmática de animais controles e diabéticos.....	56
TABELA 4 -	Aminoácidos quantificados em soro de animais CTRL e DM1 no D14.....	58
TABELA 5 -	Quantificação das alterações clínicas e laboratoriais após indução do diabetes.....	60
TABELA 6 -	Comparação entre valores brutos da bioimpedanciometria em animais controles e diabéticos no D14.....	61
TABELA 7 -	Morfometria de vilos e criptas de segmentos do intestino delgado medida no dia 14 após a indução do diabetes.....	63
TABELA 8 -	Quantificação do percentual de excreção de sacarídeos relacionados com a permeabilidade intestinal de ratos controles e diabéticos no D14.....	66
TABELA 9 -	Avaliação do transporte hidroeletrolítico entre controle e diabético por perfusão intestinal.....	69
TABELA 10 -	Comparativo na alteração do estresse oxidativo e da inflamação em segmento de intestino delgado de animais CTRL x DM1 no D14.....	70
TABELA 11 -	Avaliação comparativa da transcrição gênica de componentes das junções firmes em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14.....	74
TABELA 12 -	Avaliação comparativa da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14.....	76
TABELA 13 -	Comparação entre solução de Ringer e de Alanil-glutamina na recuperação hidroeletrolítica dos animais diabéticos.....	77
TABELA 14 -	Avaliação da alteração hidroeletrolítica promovida pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos.....	79
TABELA 15 -	Avaliação da eficácia na recuperação hidroeletrolítica de soluções após indução de diarreia osmótica pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos.....	80

LISTA DE QUADROS DE ANÁLISES

QUADRO 1 - Correlação entre os valores de glicemia no D7 e a relação Lactulose / manitol excretado no D14.....	67
QUADRO 2 - Correlação entre os valores de glicemia no D7 e a excreção de lactulose no D14.....	67
QUADRO 3 - Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e a excreção de lactulose no D14.....	68
QUADRO 4 - Correlação entre os valores de glicemia no D7 e MPO no D14.....	71
QUADRO 5 - Correlação entre os valores de glicemia no D7 e GSH no D14.....	72
QUADRO 6 - Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e atividade da mieloperoxidase no intestino delgado.....	72
QUADRO 7 - Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e a concentração de glutathiona reduzida no intestino delgado.....	73
QUADRO 8 - Correlação entre a atividade de mieloperoxidase e a excreção de lactulose no D14.....	73
QUADRO 9 - Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e a excreção de lactulose no D14.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
\$	Dólares americanos
AA	aminoácido
ALGLN	L-Alanil-L-Glutamina
AMPc	Adenosina monofostafa cíclica
ANOVA	Análise de Variância
Arg	Arginina
Ca ²⁺	Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
epm	Erro padrão da média
g	Gramma
Gli	Glicose
GLN	Glutamina
GM1	Receptor gangliosídeo da membrana
GMPc	Guanina monofosfato cíclica
h	Hora
Kg	Quilograma
L	Litro
Ltda	Companhia limitada
mg/mL	Miligramma/mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzido
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
°C	Grau Celsius

OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Significância estatística
PBS estéril	Salina fosfatada tamponada estéril (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SRO	Solução de reidratação oral
TC	Toxina do <i>Vibrio cholerae</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TJ	Junções Firmes (Tight junction)
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
ZOT	Toxina de zonula occludens
κDa	Kilodalton
μg	Micrograma
μg/mL	Micrograma/ mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
μmol/L	Micromol/L

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Glutamina.....	18
1.2	Diabetes.....	23
1.2.1	<i>Barreira morfofuncional intestinal.....</i>	25
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivos gerais.....	34
3.2	Objetivos primários.....	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Animais.....	35
4.2	Desenho experimental.....	35
4.3	Indução de Diabetes Mellitus tipo 1.....	37
4.4	Análise bioquímica.....	38
4.4.1	<i>Quantificação de eletrólitos e albumina.....</i>	38
4.4.2	<i>Quantificação de aminoácidos no soro.....</i>	38
4.4.3	<i>Balanço nitrogenado.....</i>	39
4.5	Bioimpedância elétrica.....	39
4.6	Morfometria intestinal.....	40
4.7	Permeabilidade intestinal.....	41
4.8	Procedimento cirúrgico e perfusão intestinal.....	42
4.9	Cálculo da variação hidroeletrólítica dos perfusatos intestinais.....	44
4.9.1	<i>Protocolo do teste de fenolsulfonaftaleína (PSP).....</i>	44
4.9.2	<i>Cálculo da variação da osmolaridade.....</i>	44
4.9.3	<i>Cálculo da variação de sódio, potássio e cloreto.....</i>	45
4.10	Avaliação do estresse oxidativo em amostras de intestino delgado.....	46
4.10.1	<i>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....</i>	46
4.10.2	<i>Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA).....</i>	47
4.10.3	<i>Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).....</i>	47
4.11	Avaliação da transcrição gênica.....	48
4.11.1	<i>Extração do RNA total.....</i>	48
4.11.2	<i>Síntese de DNA.....</i>	48
4.11.3	<i>Reação em cadeia da polimerase quantitativo.....</i>	49
4.12	Indução da diarreia secretória e perfusão com soluções de reidratação.....	50
5.0	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
6.0	RESULTADOS.....	56
6.1	Avaliação do modelo de diabetes tipo1 por parâmetros laboratoriais.....	56
6.1.1	<i>Eletrólitos e albumina plasmáticos de CTRL X DMI.....</i>	56
6.1.2	<i>Aminoácidos plasmáticos de CTRL X DMI.....</i>	57
6.1.3	<i>Balanço nitrogenado.....</i>	59
6.2	Avaliação clínica da indução diabética.....	59
6.2.1	<i>Parâmetros clínicos após indução de diabetes com STZ.....</i>	59
6.2.2	<i>Avaliação da composição corporal de CTRL e DMI.....</i>	61

6.3	Avaliação da lesão da barreira morfofuncional intestinal em modelo animal de DM1.....	63
6.3.1	<i>Avaliação morfométrica do intestino delgado entre animais CTRL e DM.....</i>	63
6.3.2	<i>Medida da permeabilidade intestinal.....</i>	65
6.3.3	<i>Alteração da dinâmica absorptiva hidroeletrolítica.....</i>	68
6.3.4	<i>Efeito da hiperglicemia no estresse oxidativo de segmento de intestino delgado.....</i>	70
6.4	Efeito da hiperglicemia sobre a transcrição gênica.....	74
6.4.1	<i>Avaliação da transcrição gênica de proteínas de junções firmes de CTRL X DM1.....</i>	74
6.4.2	<i>Avaliação da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos entre CTRL X DM1.....</i>	75
6.5	Avaliação da eficácia de uma solução a base de dipeptídeo na diarreia do diabetes.....	77
6.6	Indução de diarreia pela toxina do cólera e avaliação da eficácia da SRO a base de ALGN.....	78
6.6.1	<i>Efeito da indução de diarreia osmótica pela toxina do cólera em modelo de diabetes tipo I.....</i>	78
6.6.2	<i>Avaliação da eficácia de solução de reidratação a base de dipeptídeo frente à diarreia secretória induzida pela toxina do cólera em modelo de diabetes.....</i>	80
7.0	DISCUSSÃO.....	83
7.1	Caracterização da lesão da barreira intestinal desencadeada pela hiperglicemia.....	83
7.2	Avaliação da solução de reidratação oral a base de Alanil-Glutamina.....	93
8.0	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE I.....	116
	APÊNDICE II.....	118
	APÊNDICE III.....	120
	APÊNDICE IV.....	128
	ANEXO.....	131

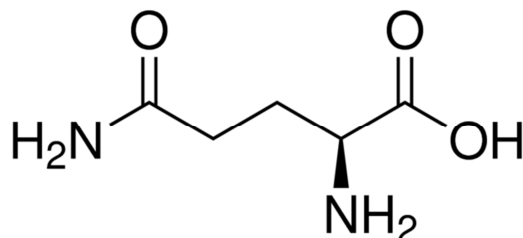
1. INTRODUÇÃO

1.1. Glutamina

Nos mamíferos, a glutamina (GLN) (figura 1) é um dos nutrientes mais abundantes para a viabilização de vias metabólicas responsáveis pela produção de energia, pela síntese de macromoléculas e manutenção de outras funções essenciais para a homeostase celular (CANTOR; SABATINI, 2012).

Este aminoácido (AA) é um L- α -aminoácido com aproximadamente 146 kDa e pode ser sintetizado em todos os tecidos do corpo. Tem em sua composição: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%) e possui característica mais hidrofílica, podendo ser facilmente hidrolisado por ácidos ou bases (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003), mas considerado como o principal veículo de transferência de nitrogênio entre os tecidos.

Figura – 1. Estrutura molecular da Glutamina



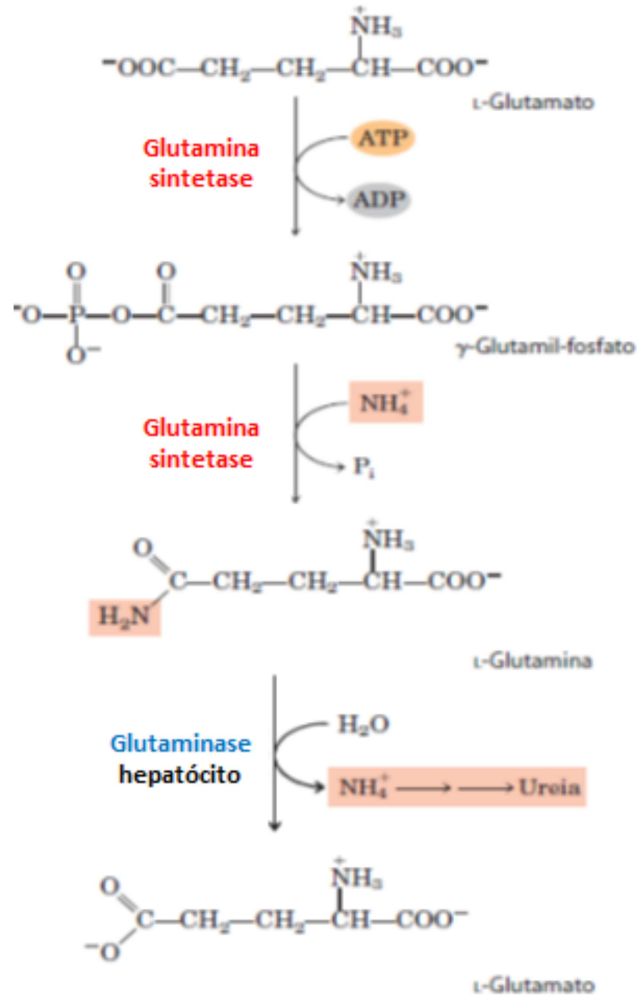
Fonte: Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g3126>.

Em condições de homeostase normal, a GLN é o aminoácido mais abundante na corrente sanguínea, sendo classificado como condicionalmente essencial, pois pode passar a ser requerido em diversas condições de estresse metabólico (FURST; POGAN; STEHLE, 1997). É sintetizado pela enzima glutamina sintetase e degradado pela glutaminase (ROWBOTTOM, 1996).

A GLN é um aminoácido funcional, envolvido em diversas reações bioquímicas fundamentais para a manutenção da vida, principalmente em biossíntese de outros aminoácidos, carregamento de radical amina na corrente sanguínea (pois a amônia é tóxica) e sendo convertida em glutamato, este se converte em α -cetoglutarato que pode ser utilizado no

ciclo do ácido tricarboxílico (TCA- sigla em inglês) para a produção de energia (NELSON; COX, 2016).

Figura – 2. Via de conversão da glutamina



Via metabólica de conversão de glutamato em glutamina pela enzima glutamina sintetase e a ativação da enzima glutaminase no fígado convertendo a glutamina em glutamato e liberando o grupamento amônio para que seja convertido em ureia. (FONTE: NELSON; COX, 2016)

No ciclo metabólico do ácido tricarboxílico, a glicose é a fonte de carbono mais importante para as vias geradoras de energia, metabolizada em piruvato que fornece Acetil-CoA para o metabolismo oxidativo nas mitocôndrias. Como tipicamente processado, o caminho começa com a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato para produzir citrato. A oxidação do citrato gera equivalentes redutores para impulsionar a produção de ATP via fosforilação oxidativa. Dois carbonos são liberados como CO_2 por ciclo, regenerando oxaloacetato (YANG *et al.*, 2014).

A GLN é convertida em glutamato através da glutaminase (MATÉS *et al.*, 2013). O glutamato é metabolizado em α -cetoglutarato através de desaminação ou pela atividade de transaminases. O α -cetoglutarato, dentro do ciclo de TCA forma oxalacetato, caracterizando uma via anaplerótica, permitindo que este ciclo funcione como uma via biosintética além de ser uma via puramente bioenergética (OWEN *et al.*, 2002). Ademais, GLN também pode produzir acetil-CoA por meio de carboxilação redutora, na qual o α -cetoglutarato é carboxilado para produzir isocitrato / citrato, que é então clivado para gerar oxalacetato e acetil-CoA (figura 3). Assim, a capacidade da glutamina de produzir acetil-CoA e oxalacetato permite que ela suporte a atividade do ciclo de TCA como uma fonte de carbono, aumentando a dependência celular ao metabolismo da glutamina quando o suprimento de piruvato é prejudicado (YANG *et al.*, 2014).

Figura – 3. Metabolismo energético pelo ciclo do ácido tricarboxílico

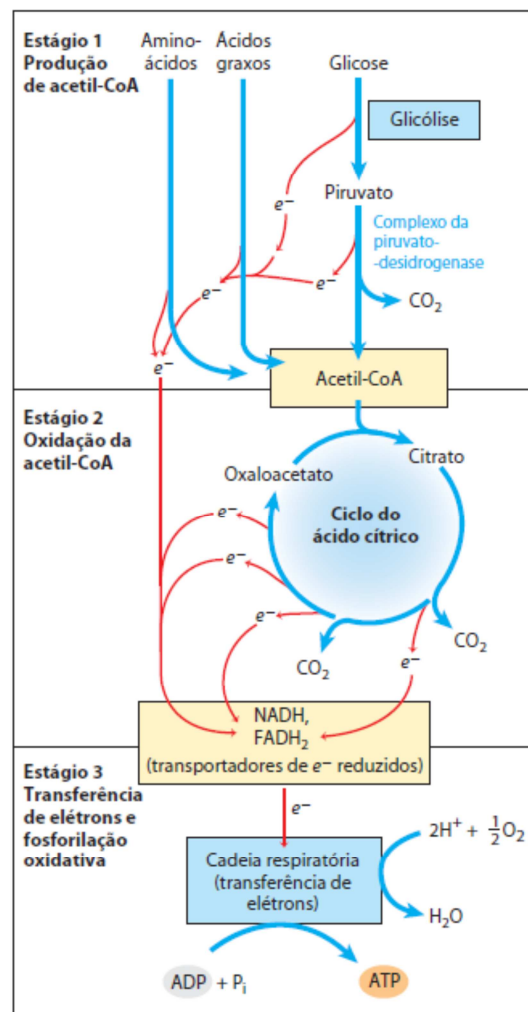
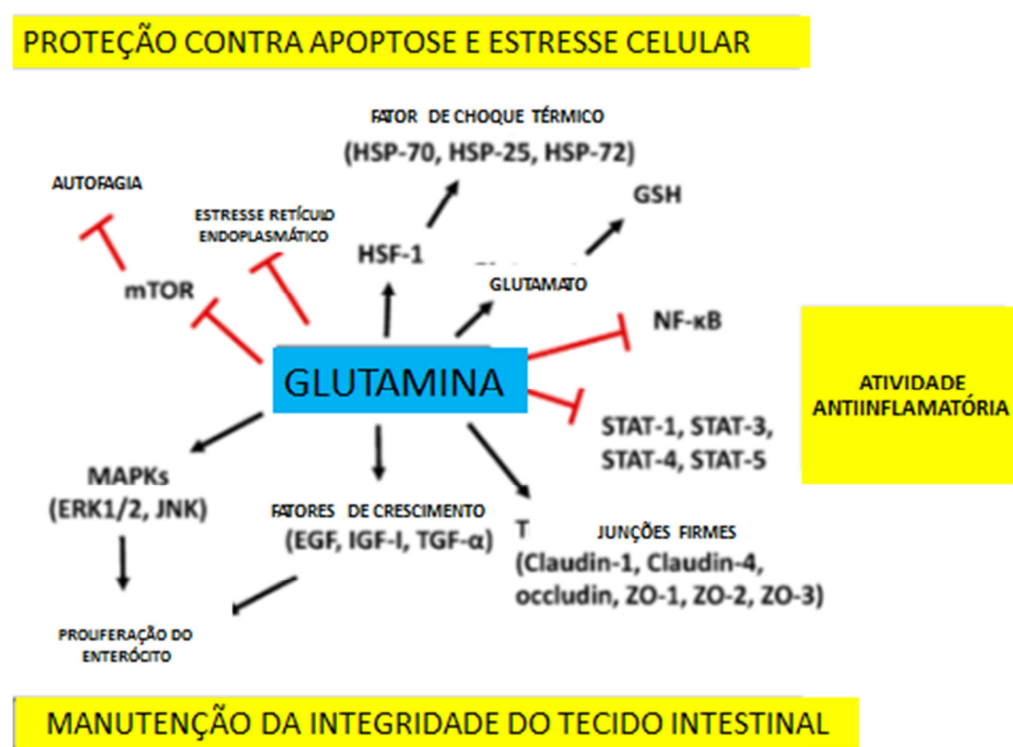


Figura evidenciando os estágios bioquímicos na produção de energia em forma de ATP. Estágio 1: a oxidação de ácidos graxos, glicose e alguns aminoácidos gera acetil-CoA. Estágio 2: a oxidação dos grupos acetil no ciclo do ácido cítrico (ÁCIDO TRICARBOXÍLICO) inclui quatro etapas nas quais os elétrons são removidos. Estágio 3:

os elétrons carregados por NADH e FADH₂ convergem para uma cadeia de transportadores de elétrons mitocondrial (ou, em bactérias, ligados à membrana plasmática) – a cadeia respiratória – reduzindo, no final, O₂ a H₂O. Este fluxo de elétrons impulsiona a produção de ATP. (FONTE: NELSON; COX, 2016)

Na última década, muitas evidências científicas têm demonstrado os benefícios da glutamina para o intestino e na saúde tanto de humanos quanto de animais (WU *et al.*, 2013). Dentre as atividades metabólicas da glutamina, pode-se destacar metabolismo celular, mecanismos anabólicos, recuperação e proliferação celular, síntese e degradação de proteínas, formação de proteínas Fator de Choque Térmico - Heat Shock Proteins (HSP), atividade antioxidante e antiapoptótica, modulação do sistema imune e modulação da secreção e ação da insulina (figura 4) (KIM; KIM, 2017).

Figura – 4. Atividade endógena da glutamina



Mecanismos de ação propostos da glutamina nas células intestinais. A glutamina mantém a integridade do tecido intestinal através da promoção da proliferação de enterócitos, ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (ERK1 / 2, JNK1 / 2), otimizando as ações de fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento insulina like-1 (IGF -1), fator de crescimento transformador (TGF - α) e induzindo a expressão de proteínas de junção firme (claudin-1, claudin-4, ocludina, zona ocludina (ZO) -1, ZO-2 e ZO-3). As vias de sinalização pró-inflamatórias, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), os transdutores de sinal e os ativadores das vias de transcrição (STAT) são inibidas pela glutamina. A glutamina suprime a apoptose extensiva ao participar da síntese de glutatona (GSH) e ao regular a expressão mediada por fator de choque térmico (HSF) -1 de proteínas de choque térmico (HSPs). A glutamina melhora o estresse do retículo endoplasmático (RE) e inibe a autofagia bloqueando a via do (mTOR), protegendo assim as células intestinais de condições estressantes. As barras **T** significam a inibição enquanto as setas representam a estimulação. (Adaptado de: KIM; KIM, 2017)

É notificado que a GLN atua no incremento da síntese proteica no enterócito através de uma das vias mTOR (XI *et al.*, 2012), promove o desenvolvimento intestinal, modula a expressão de proteínas das junções firmes e do sistema imune intestinal, além de inibir a apoptose induzida pelo estresse oxidativo ou por outros estímulos (WU *et al.*, 2013).

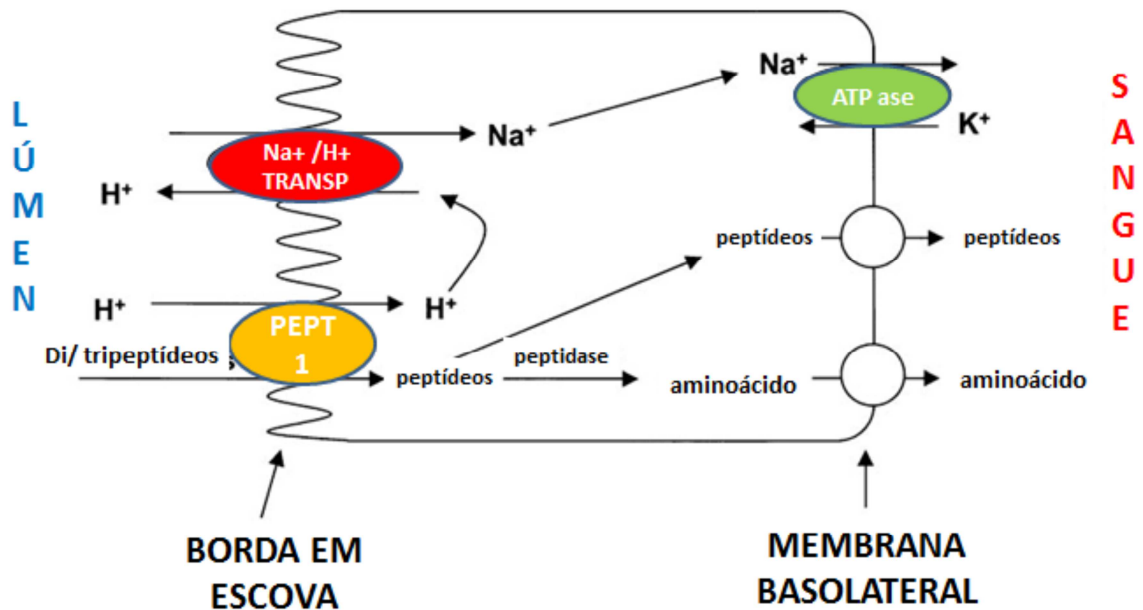
A glutamina é fortemente ligada a fatores de proteção do trato gastrointestinal (NEU; DEMARCO; LI, 2002). Em diferentes modelos experimentais, a glutamina se mostrou ser uma estratégia farmacológica favorável para a recuperação da barreira intestinal (ANDRADE *et al.*, 2015). Estudo *in vitro* evidenciou que a suplementação de glutamina modula o metabolismo do aminoácido de bactérias intestinais, sugerindo benefício na manutenção da integridade da barreira e na redução da translocação bacteriana (DAI *et al.*, 2013). Estudo em ratos demonstrou que a utilização de glutamina preveniu tanto o decaimento na concentração de glutatona, quanto modulou a expressão de junções firmes como a ocludina, Zona ocludina - 1 e Claudina 1 (BEUTHEU *et al.*, 2013).

Sabe-se que tanto o jejum quanto algumas patologias, dentre elas o diabetes descompensado podem cursar com redução na concentração sérica de GLN (RAO; SAMAK, 2012). Sugere-se que a privação deste aminoácido pode estar relacionada com a hiper-regulação da via fosfatidilinositol 3- kinase (PI3- K/Akt) acarretando alteração de junções firmes (TJ- tight junctions), sugerido por WANG *et al.* (2015). Outro autor anteriormente já havia apontado uma redução da expressão de Claudina-1 e Ocludina em modelo experimental animal com baixa concentração de GLN (LI *et al.*, 2004). Estudos do nosso grupo de pesquisa correlacionou-se a baixa concentração sérica de glutamina em crianças com alteração da barreira intestinal, com o aumento do processo inflamatório e com o incremento de doenças diarreicas (GUERRANT *et al.*, 2008).

Observações como essas tem estimulado o uso farmacológico de glutamina em forma de suplementação. Entretanto, o uso da glutamina em suplementação oral e parenteral pode ser limitado devido a sua baixa solubilidade de 35 g/L a 200⁰C (KHAN; ELIA, 1991). A utilização de dipeptídeos de glutamina, por exemplo, alanil-glutamina (ALA-GLN) por via oral, representa uma alternativa não invasiva para melhorar a solubilidade da glutamina e a disponibilidade às células (ROGERO *et al.*, 2006).

O transporte para o espaço intracelular de ALA-GLN ocorre através de um co - transporte intestinal de di/tripeptídeos (PEPET -1) e H⁺. O PEPT-1 é acoplado ao transportador 3 permutador de hidrogênio-sódio (NHE3), impulsionando, assim, a absorção de sódio e a reidratação (figura 5) (GUERRANT *et al.*, 2008).

Figura – 5. Atividade do transportador de di/tripeptídeo (PEPT-1)



PEPT-1 é o principal co-transportador de di/tripeptídeo e H^+ . A absorção de sódio é promovida pelo trocador Na^+/H^+ . Esta dinâmica favorece a absorção de água por difusão facilitada após o aumento da concentração de sódio na porção endógena. (Adaptado de: ADIBI, 2003).

Sugere-se que algumas condições patológicas estão envolvidas na alteração da expressão deste transportador na borda em escova, tais como a desnutrição, síndrome do intestino curto, síndrome inflamatória intestinal e infecção por *Cryptosporidium parvum* e diabetes que podem aumentar a expressão do PEPT-1, podendo melhorar a absorção de dipeptídeos (ADIBI, 2003).

A administração de glutamina por solução de reidratação oral (SRO) é uma das vias de administração deste AA. A suplementação dietética de glutamina favoreceu a absorção enteral de nutrientes e eletrólitos em modelos animais de diarreia (XUE *et al.*, 2008), podendo corresponder a um eficaz método de terapia de recuperação eletrolítica frente a eventos diarreicos tanto relacionados a doenças crônicas, tais como no diabetes, quanto a doenças infecciosas, como a infecção pelo cólera.

1.2.Diabetes

Esta doença é uma desordem heterogênea, complexa que envolve aspectos genéticos, nutricionais, comportamentais, ambientais e sociais (POLONSKY, 2012). A síndrome metabólica, uma ampla apresentação fenotípica, que inclui resistência insulínica, obesidade, hipertensão, hipertrigliceridemia e baixos índices de colesterol na lipoproteína de

alta densidade identificam pessoas com alto risco de desenvolver intolerância à glicose e, conseqüentemente, diabetes (REAVEN, 2005). Esta última consiste em um grupo de distúrbios envolvendo diferentes mecanismos patogênicos, cujo denominador comum é a hiperglicemia (SINGH, 2013). A diabetes tipo 1 está associada à deficiência de insulina, que pode ser total, parcial ou relativa (PORTO, 2014).

Dados de pesquisa epidemiológica mais recente, evidenciada pelo Vigitel 2016, mostra que o crescimento do diagnóstico de diabetes na população brasileira foi de 61,8%, passando de 5,5%, em 2006, para 8,9% em 2016. As mulheres são mais afetadas pela afecção, segundo estes dados. A capital mais prevalente passou a ser o Rio de Janeiro. Além disso, o indicador de diabetes na população é três vezes maior entre aqueles com menor índice de escolaridade (VIGITEL, 2016).

Para a Sociedade Brasileira de Diabetes, uma das formas de diagnóstico da diabetes é: Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal de peso acrescido de glicemia casual $\geq 200\text{mg/dl}$. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições. Segundo a última diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes, a classificação etiológica da DM: tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos de DM (SBD 2017).

Em ambos os tipos 1 e 2 de diabetes, vários fatores genéticos e ambientais podem resultar na perda progressiva de massa e / ou função de células β pancreáticas que se manifesta clinicamente como hiperglicemia. Uma vez que a hiperglicemia ocorre, os pacientes com todas as formas de diabetes estão em risco de desenvolver as mesmas complicações crônicas, embora as taxas de progressão possam diferir (ADA, 2018).

O diabético tipo 1 é mais propenso às complicações agudas do que o diabético tipo 2 porque no primeiro as alterações glicêmicas acontecem mais abruptamente pela ausência total do hormônio insulina (ADA, 2018). O efeito fisiopatológico da hiperglicemia resulta do aumento da produção de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons localizado nas mitocôndrias. Este processo culmina no aumento de espécies reativas de oxigênio e, por conseguinte, aumento do estresse oxidativo levando a dano tecidual (KATSAROU *et al.*, 2017).

Além das repercussões cardiovasculares, são observadas, como consequência do descontrole glicêmico, alterações intestinais que podem ir desde a diarreia a constipação (SAID, 2007). Os sintomas gastrintestinais (GI) representam uma importante e muitas vezes não reconhecida causa de morbidade no diabetes, embora a significância dessa sobrecarga em

todo o espectro de pacientes e a fisiopatologia que envolve a barreira intestinal, incluindo a relação dos sintomas com o controle glicêmico, permaneçam mal definidos (DU *et al.*, 2018).

1.2.1. Barreira Morfofuncional Intestinal

A barreira intestinal (figura 6) é a entidade funcional que promove a separação do lúmen intestinal do componente interno do corpo humano, e consiste de elementos mecânicos (tais como as tight junctions - junções firmes), elementos humorais, elementos da imunidade celular, elementos musculares e nervosos (BISCHOFF *et al.*, 2014).

Figura – 6. Componentes da barreira morfofuncional intestinal

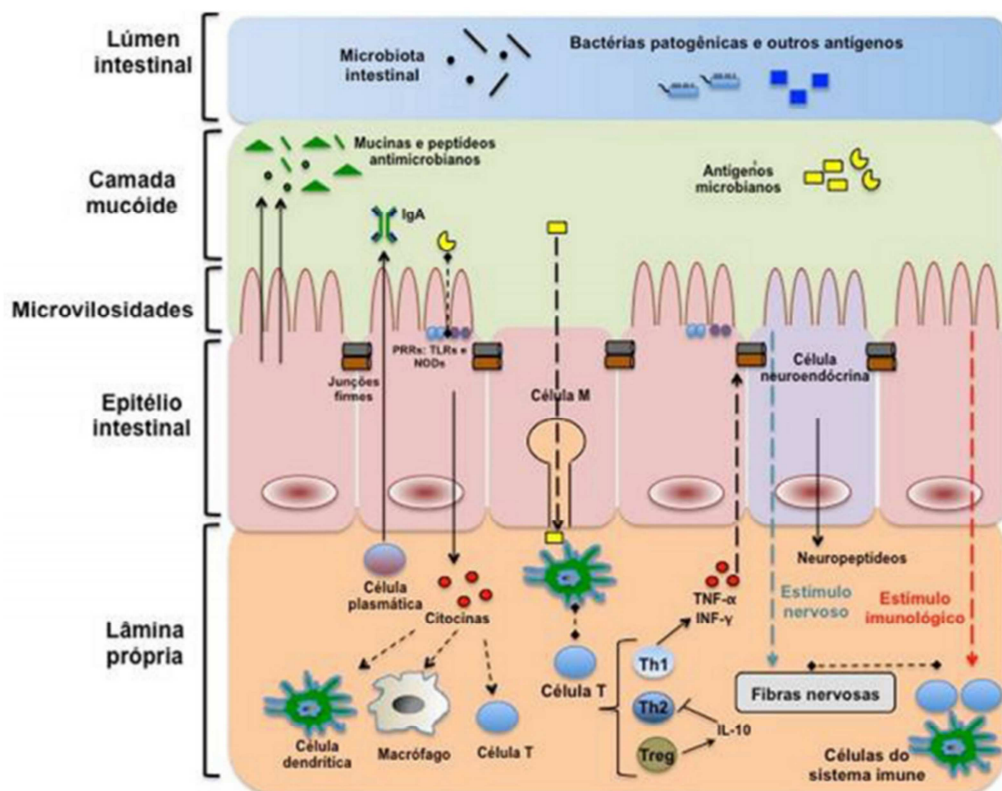
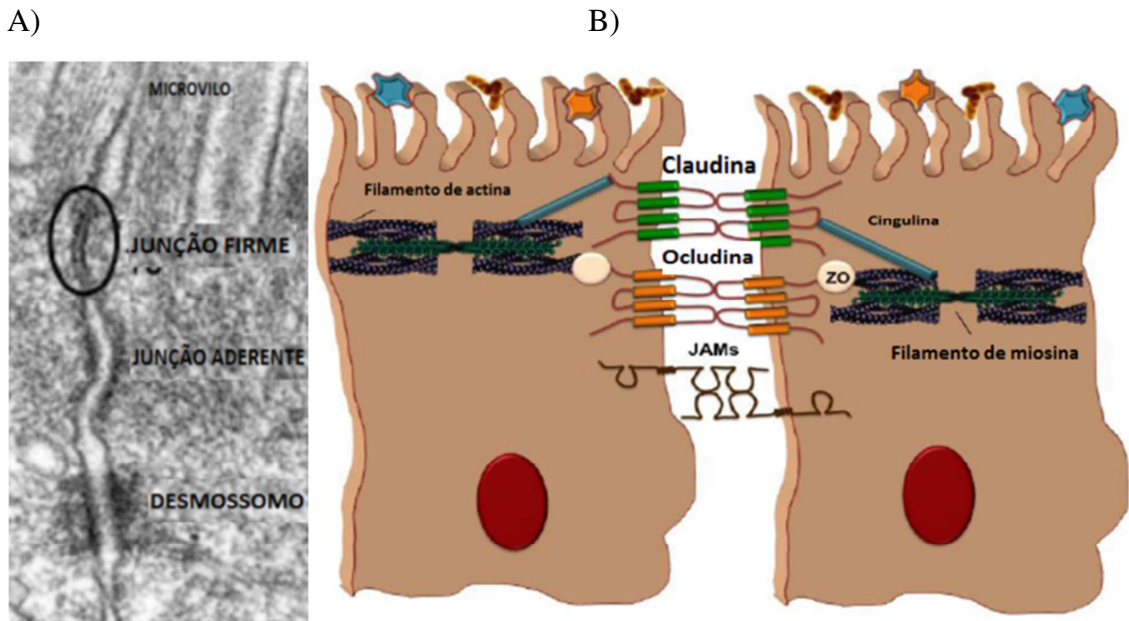


Figura evidenciando os componentes proteicos e celulares que compõem a barreira intestinal. Percebem-se elementos da imunidade celular e inata, além da relação do sistema nervoso autônomo e da microbiota com a dinâmica da regulação das junções firmes. (Adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2016)

As “tight junctions” (TJ) são estruturas moleculares entre as células que as mantêm próximas, porém regulam o transporte paracelular de íons, macromoléculas e até mesmo células (CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017). As TJ apresentam um componente macromolecular extracelular que inclui as claudinas, ocludinas, junções de adesão (JAM) e as

tricelulinas; associado com o componente intracelular que inclui ZO-1, ZO-2, ZO3, Afadin – 6 (AF -6), antígeno 7H6 e cingulina (DE SANTIS, 2015).

Figura – 7. Componentes proteicos da barreira morfofuncional intestinal



A) Figura de microscopia eletrônica evidenciando junção firme, junção aderente e desmossomos. (Adaptado de: TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001)

B) Esquema ilustrativo das proteínas de junção firmes na membrana intercelular e a interação com as proteínas intracelulares. (Adaptado de: DE SANTIS *et al.*, 2015)

As claudinas, também componentes das junções firmes, são proteínas epiteliais transmembranas de maior importância na função de barreira intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014). A distribuição das claudinas ao longo do trato gastrointestinal (TGI) varia de acordo com a porção intestinal e difere a depender da espécie avaliada (GARCIA-HERNANDEZ; QUIROS; NUSRAT, 2017). Os mRNAs de Claudin-2, -3, -7 e -15 são os mais expressivos no intestino delgado (HOLMES, 2006; FUJITA, 2006; RAHNER, 2001). Na figura 8 observa-se a distribuição das claudinas ao longo do TGI.

Figura – 8. Distribuição das claudinas no trato gastrointestinal

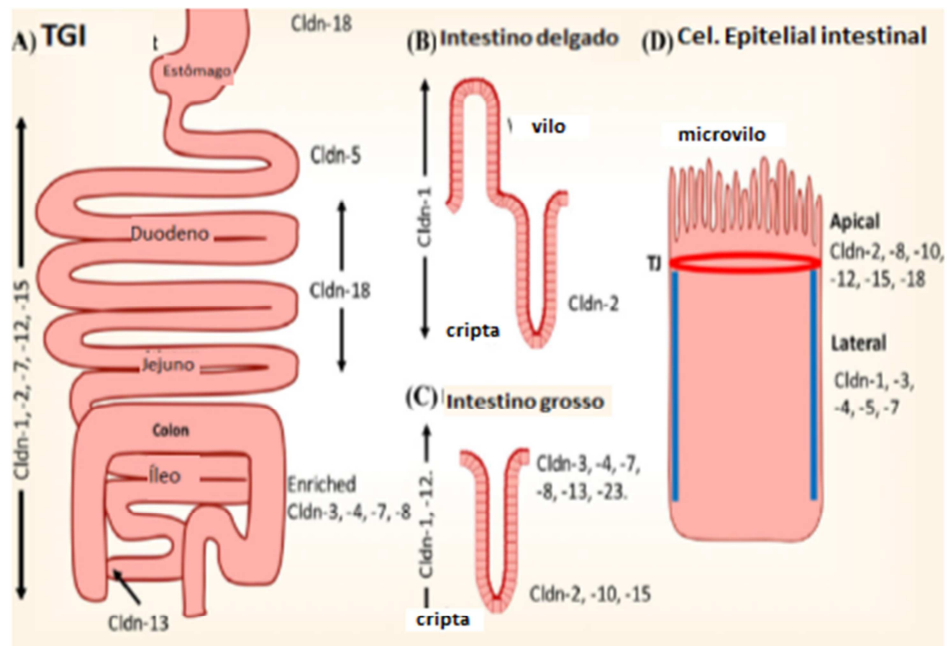
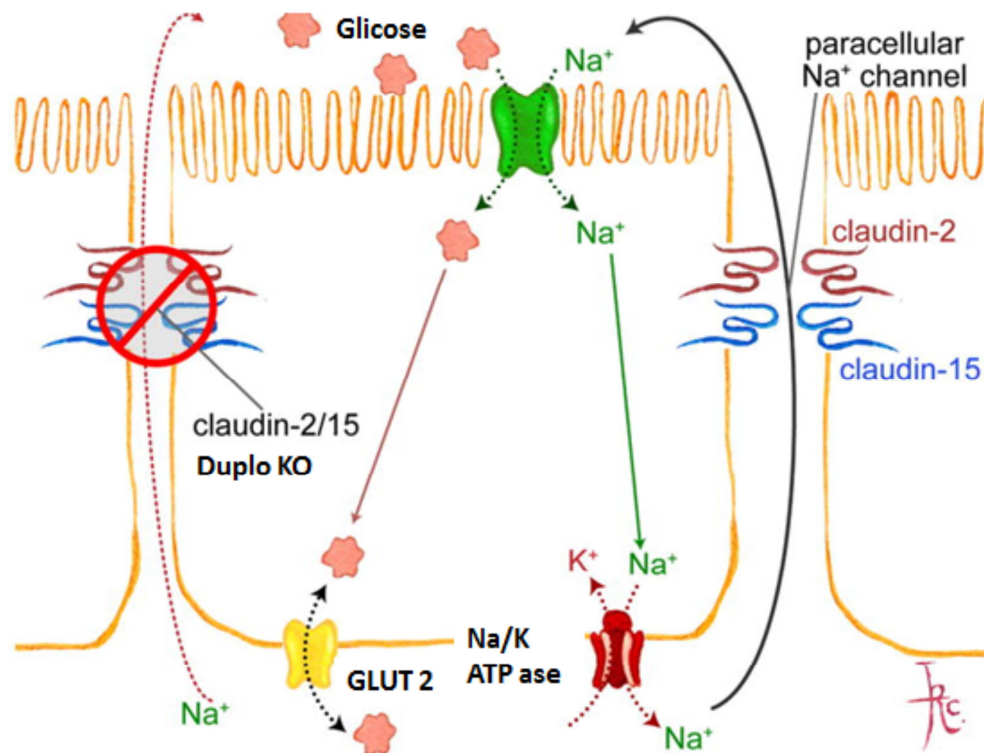


Figura representando a distribuição das diversas proteínas claudinas ao longo do TGI e sua distribuição nas porções do enterócito. (Adaptado de: GARCIA-HERNANDEZ; QUIROS; NUSRAT, 2017)

Trabalho publicado recentemente concatenou algumas das funções das claudinas nos mais diversos órgãos e sistemas, dentre elas as Claudinas 2 e 15 (figura 9) que são de fundamental importância no transporte de água e eletrólitos e na composição da barreira paracelular intestinal (TAMURA; TSUKITA, 2014).

Claudin-2 regula o movimento paracelular de Na^+ , Ca^{2+} e água no intestino (AMASHEH *et al.*, 2002). A exclusão do gene claudin-2 em camundongos diminui a condutância transepitelial e a permeabilidade paracelular para Na^+ (MUTO *et al.*, 2010). Os camundongos com deficiência total da expressão do gene Claudin-15 exibem megaintestino, que está associada a defeitos nutricionais como resultado da permeabilidade paracelular de Na^+ e K^+ prejudicada e diminuição da absorção de glicose (TAMURA *et al.*, 2011). Além disso, os camundongos knock-out de duplo gene claudin-2 e -15 têm desnutrição grave como resultado de defeitos na absorção epitelial intestinal de glicose, aminoácidos e lipídios, levando à morte após o nascimento (WADA *et al.*, 2013).

Figura – 9. Relação entre claudinas 2 e 15 com a dinâmica da absorção de glicose



A absorção de glicose e sódio pelo transportador SGLT-1 promove o aumento da concentração de sódio na porção endógena após passagem deste eletrólito através da N/K ATPase. Este microelemento retorna ao lúmen intestinal através das claudinas 2/15 facilitando a absorção de mais micronutriente. Camundongo KO para estas claudinas morreram logo na fase infante de desnutrição. (Adaptado de: TURNER *et al.*, 2014)

Tem sido reportado na literatura que algumas patologias e produtos são promotores de desestabilização das junções firmes, desencadeando quebra da barreira intestinal, tais como: doença do intestino irritável, doença celíaca, uso de álcool e anti-inflamatórios não esteroidais, infecção por microorganismos como o *Vibrio cholerae* e diabetes mellitus (GROSCWITZ; HOGAN, 2009).

Como já citado anteriormente, a diabetes é uma doença caracterizada pelo estado de hiperglicemia. Em uma publicação recente, grupo de pesquisa utilizou camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) para investigar os efeitos da hiperglicemia na barreira intestinal. Foi evidenciado que houve alterações da microbiota intestinal sem efeito direto no desequilíbrio da barreira, porém foi mostrado alteração nas junções de aderência (THAISS *et al.*, 2018). Neste mesmo trabalho, agora utilizando um modelo de cultura de células, ficou demonstrado que a glicose induziu alterações de barreira de uma maneira dependente da dose e do tempo, manifestando-se visualmente como aumento da tortuosidade e alteração da aparência das junções célula-célula (THAISS *et al.*, 2018).

Autores têm corroborado com a hipótese de que o estado de hiperglicemia está relacionado com a quebra da barreira e com lesão do epitélio intestinal. Estudo tem evidenciado que a diabetes causa lesão do enterócito e estimula a apoptose de células intestinais (HOFFMANOVÁ, 2015). Outros trabalhos mostraram que a diabetes tipo 1 tem causado aumento na permeabilidade intestinal e alterações nas junções firmes (KUITUNEN *et al.*, 2002; SAPONE *et al.*, 2006; SECONDULFO, 2004). Além disso, observa-se que a hiperglicemia tem induzido processo inflamatório intestinal evidenciado por marcadores como ICAM – 1 e IL 4 (SAVILAHTI *et al.*, 1999; WESTERHOLM-ORMIO *et al.*, 2003). Também tem se aventado a possibilidade de lesão da barreira intestinal em modelos animais de diabetes através do aumento da concentração sérica de zonulina (GÜLDEN; WONG; WEN, 2015).

Foi sugerido que a reprogramação mediada pela hiperglicemia na função metabólica das células epiteliais leva a alterações transcricionais, disfunção da barreira intestinal e comprometimento da defesa do hospedeiro contra a infecção entérica (THAISS *et al.*, 2018). Demonstrou-se que a disfunção da barreira intestinal em modelo de diabetes está associada com aumento da translocação bacteriana, infecção por germes saprófitos da microbiota intestinal e maior susceptibilidade do hospedeiro à infecção intestinal por outros microorganismos patogênicos potenciais causadores de diarreia (RAY, 2018).

A desidratação e os distúrbios eletrolíticos são as mais importantes complicações relacionadas a diarreia secretória, podendo ser fatal se não corrigida a tempo. Com o tratamento adequado baseado na rápida administração de líquidos e eletrólitos, em quantidade equivalente às perdas gastrointestinais, todas as alterações físicas e bioquímicas recrudescem em curto prazo. Este fenômeno da desidratação pode ser explicado devido o fluído do lúmen intestinal ser pobre em proteína e rico em Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- , e sua perda maciça levar a rápida instabilidade clínica. Entretanto, a bomba de Na^+ é preservada, o que permite a reabsorção do sódio em presença de glicose, explicando a notável eficiência da reidratação oral no tratamento da doença (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2010), conforme ilustrado na figura 10.

Figura – 10. Princípio farmacológico da reidratação oral pelo transportador SGLT-1

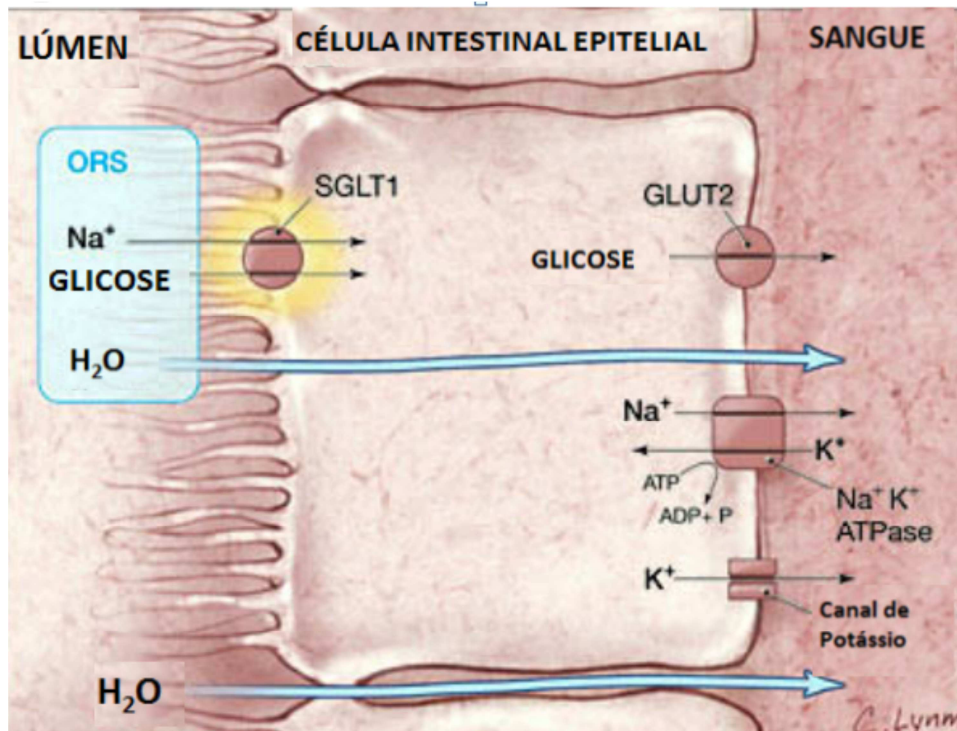


Figura representando o processo de reidratação através do transporte transcelular e paracelular de água, por meio de difusão, impulsionado pelo aumento da concentração sérica de sódio no espaço basocelular. Este processo de concentração catiônica é promovido pelo cotransporte de glicose/Na pelo transportador SGLT-1. (Adaptado de: DUGGAN *et al.*, 2004)

O uso de glicose como substrato para a absorção de sódio e o carreamento de água não é uma unanimidade. Outros compostos também foram aventados para o cumprimento deste papel. Além disso, estudo recente demonstrou que o uso de glicose em meio associado com o *V. cholerae* promove o aumento da expressão de gene de virulência podendo estar relacionado com a perpetuação da doença e uma maior concentração de bactéria disponibilizada no meio ambiente (KUHN *et al.*, 2014). O uso de moléculas de fosfolípidos também foi testado e se observou que reduziu o volume de fezes produzido, reduziu a perda de eletrólitos e promoveu um maior aporte de absorção de sódio e água em modelos animais de infecção por toxina do cólera (FARUQUI *et al.*, 2016).

Nosso grupo de trabalho tem estado ativamente envolvido no avanço da pesquisa científica neste campo. Ensaio experimental evidenciaram a eficácia de soluções de reidratação oral (SRO) acrescida com dipeptídeos em modelo de diarreia secretória induzida pelo *V. cholerae* (SILVA *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2002).

Embora o custo das SRO a base de dipeptídeo seja mais oneroso, estudos observaram que a adição de compostos de aminoácidos reduziu a osmolaridade da solução

empregada e o volume de fezes produzidas na infecção, reduzindo assim a desidratação subsequente (BUTLER, 2017).

O desenvolvimento de alternativas em terapia de reidratação oral parecer ainda ser um campo aberto para a ciência. Grupos populacionais, como os diabéticos, podem se beneficiar com SRO sem glicose, principalmente diante de infecções diarreicas que promovem perda de grande volume hidroeletrolítico.

2. JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus é uma das doenças que causam mais preocupações para a comunidade científica, dada a prevalência da doença em torno de 9% da população mundial acima de 18 anos (WHO, 2015). Em 2012, 1,5 milhões de mortes foram causadas diretamente pela diabetes no mundo; destas, mais de 80% se concentraram em países pobres ou em desenvolvimento (WHO, 2014). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, o gasto anual estimado com a população diabética americana de 20 a 79 anos é de pelo menos U\$ 673 milhões de dólares, podendo chegar a marca de U\$ 1.197 bilhões (IDF, 2015). Uma projeção para 2030 prevê que esta doença será a 7º causa de mortes no mundo (MATHERS; LONCAR, 2006).

Dentre as complicações relacionadas a hiperglicemia não controlada no DM, podemos destacar os distúrbios no trato gastrointestinal. Sabe-se que os sintomas relacionados aos transtornos intestinais afetam negativamente a qualidade de vida dos diabéticos (BYTZER *et al.*, 2001). Estes sintomas representam uma importante e muitas vezes não reconhecida causa de morbidade nos pacientes com DM, embora a significância dessa sobrecarga em todo o espectro de pacientes e a fisiopatologia subjacente, incluindo a relação dos sintomas com o controle glicêmico, permaneçam mal definidos (DU *et al.*, 2018).

O trânsito do intestino delgado frequentemente é anormal em pacientes com diabetes e pode ser lento ou rápido, determinando constipação ou diarreia respectivamente (PHILLIPS *et al.*, 2006). Entretanto, dados sobre o impacto do controle glicêmico crônico sobre os sintomas gastrointestinais são limitados e inconsistentes, bem como as alterações de motilidade não são o suficiente para justificar os eventos diarreicos, por exemplo (DU *et al.*, 2018).

Todavia, os mecanismos fisiopatológicos concernentes ao processo de lesão da barreira morfofuncional intestinal no diabetes, o efeito da hiperglicemia na permeabilidade intestinal e a disfunção na modulação das proteínas das junções firmes ainda estão mal definidos.

Assim, uma melhor caracterização do mecanismo fisiopatológico da lesão da barreira intestinal e da alteração da dinâmica das junções firmes decorrentes do estado de hiperglicemia não controlada pode contribuir para uma compreensão da diarreia que está associada ao diabetes e para uma melhor perspectiva na composição de novas terapias farmacológicas para esta afecção.

Outro agravante é que a hiperglicemia aumenta a predisposição a infecções entéricas, translocação bacteriana e diarreia (THAISS *et al.*, 2018). No que concerne a terapêutica, em uma eventual infecção intestinal em pacientes diabéticos, o mais empregado artifício farmacológico para a reposição de eletrólitos e fluidos é uma solução de reidratação oral a base de glicose, sendo observada sua efetividade graças ao cotransporte com o íon sódio (BINDER *et al.*, 2014). Contudo, o aporte de glicose é elevado nestas condições, podendo agravar a condição clínica de base.

Desta forma, lançar mão de metodologia experimental para o desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas que visem a recuperação hidroeletrólítica que não piore o perfil glicêmico certamente será de grande valia para pacientes que padeçam dos efeitos da hiperglicemia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a lesão da barreira intestinal desencadeada pela hiperglicemia não controlada em modelo animal de diabetes tipo 1 induzido pela estreptozotocina e avaliar a eficácia da reidratação com solução a base de alanil-glutamina na ocorrência de uma diarreia secretória aguda induzida pela toxina do cólera.

3.2. Objetivos Primários

- Caracterizar o modelo de diabetes mellitus tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ) através de parâmetros bioquímicos pela dosagem de eletrólitos, escórias nitrogenadas, aminoácidos e albumina no plasma;
- Caracterizar o modelo animal de diabetes também através de parâmetros que incluem avaliação por bioimpedância e estudo de medidas aferidas através de gaiolas metabólicas;
- Avaliar a barreira morfofuncional intestinal de ratos saudáveis e diabéticos utilizando dados de morfometria e avaliação funcional que inclui métodos de permeabilidade e perfusão intestinais;
- Estudar as modificações na concentração de glutatona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA), além de avaliar a atividade de mieloperoxidase (MPO) em amostras de íleo de animais controles e diabéticos;
- Avaliação do efeito da hiperglicemia na transcrição de proteínas de junções firmes: Ocludina, Zona-Ocludina (ZO-1), Claudina-2 e Claudina-15 bem como na transcrição de transportadores de membrana apical de enterócitos: PEPT-1, SGLT-1, NHE₃ e CFTR;
- Estudar a eficácia de solução de reidratação à base de dipeptídeo, Alanil – Glutamina (ALGN), na absorção de eletrólitos em grupos de animais controles e diabéticos;
- Comparar a eficácia da SRO a base de ALGN com a estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na recuperação hidroeletrólítica de animais diabéticos acometidos de diarreia secretória induzida pela toxina do cólera.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais e Comitê de Ética

Foram selecionados ratos *Wistar novergicus* de aproximadamente 15 semanas, pesando entre 200 e 310 gramas inicialmente. Os animais foram aclimatados no Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) antes do início da experimentação. Para o início dos protocolos experimentais, os animais foram deixados 3 dias nas gaiolas metabólicas para que se adaptassem a este novo ambiente.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) - Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Foram mantidos em ciclo claro-escuros de 12 horas, aproximadamente, com livre acesso à água e ração. Esta última (ração Nuvilab[®]) foi balanceada com macro e micronutrientes, sendo fornecida pelo biotério.

Nos experimentos de gaiola metabólica tanto a ração quanto a água foram ofertados livremente e quantificados diariamente. Para os experimentos de permeabilidade intestinal, foi utilizada uma ração com baixo teor de carboidratos (*Rhoster-SP*). Tal ração foi utilizada para evitar interferências na coluna de troca aniônica do equipamento cromatografia líquida de alta pressão (HPLC - *High Pressure Liquid Cromatography*).

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Lei nº 11.794 e as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – nº 55/16.

4.2. Desenho Experimental

O estudo objetiva avaliar os efeitos da hiperglicemia em um modelo animal de diabetes tipo 1 agudo por 14 dias. Assim, após a separação dos animais que serão incluídos na experimentação, os mesmos foram induzidos com solução de estreptozotocina (STZ), devidamente descrita na próxima sessão, para o grupo diabético (DM) e apenas com citrato de sódio para o grupo controle (CTRL).

A indução ocorre no dia zero (D0) após medidas de impedanciometria e a aplicação dos demais protocolos experimentais para a investigação dos objetivos são efetuados a partir do 14^o dia (D14). Neste interim, os animais foram deixados

individualizados em gaiolas metabólicas para a avaliação metabólica. O desenho do estudo pode ser resumido na figura a seguir:

Figura – 11. Linha de tempo experimental

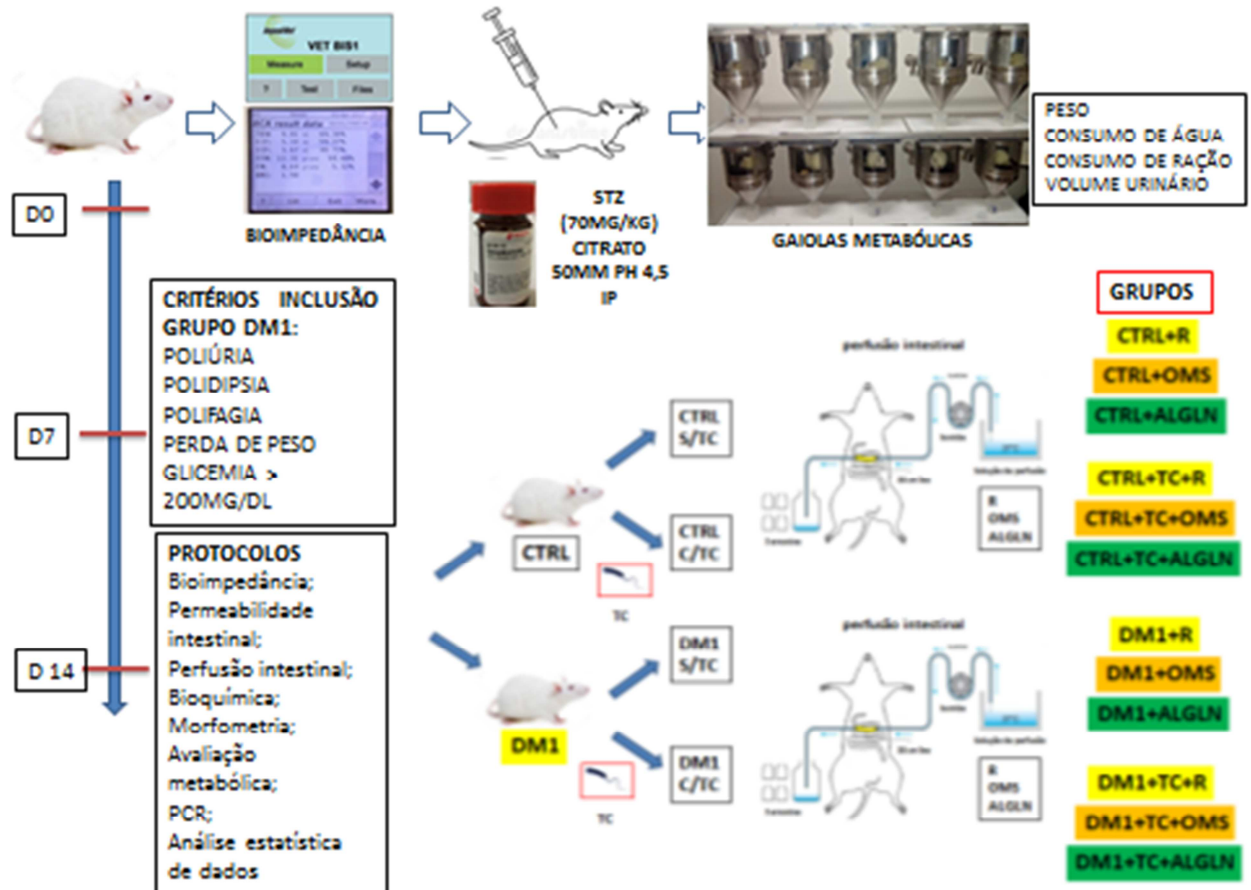


Figura evidenciando o desenho experimental desenvolvido em 14 dias, estando os animais acondicionados em gaiolas metabólicas neste período. D0 dia da indução. D7 dia de confirmação da diabetes e a partir do D14 a aplicação dos protocolos experimentais. DM1= grupo diabético; CTRL= grupo controle; TC= toxina do cólera; R= solução de ringer; OMS= solução de glicose preconizada pela Organização Mundial da Saúde; ALGLN= solução a base de Alanil-glutamina.

Após a aclimação dos animais nas gaiolas individuais, aferições diárias do consumo de água, consumo de ração, eliminação de urina e medidas de peso foram catalogadas para que se possa avaliar alterações clínicas que venham a ocorrer após a indução de diabetes. A partir do dia 7 (D7), os critérios clínicos de poliúria (aumento do volume de urina eliminado), polidipsia (aumento do consumo de água), polifagia (aumento do consumo de ração) e a perda de peso são acrescidas do valor de glicemia (que deve ser maior do que 200 mg/dL) para que os animais que foram induzidos quimicamente sejam alocados no grupo diabetes (DM).

4.3. Indução de diabetes mellitus tipo 1

Os animais foram aclimatados nas gaiolas metabólicas durante 3 dias antes da indução diabética. Após este período, foi prosseguido ao protocolo de bioimpedância dos dois grupos para que se obtivessem os parâmetros de composição corporal dos animais antes da indução e após os 14 dias da linha de tempo experimental.

O diabetes tipo 1 foi induzido quimicamente através de um aminoglicosídeo utilizado para este fim em roedores. Desde o relatório inicial de suas propriedades diabetogênicas em 1963, a estreptozotocina (STZ) tem sido usada isoladamente ou em combinação com outros produtos para indução de diabetes tipo 1 ou tipo 2 (WU; YANG, 2015).

Para a administração a STZ foi necessário que os animais permanecessem em jejum por 12h antes da indução. Foi colhida pequena alíquota de sangue em causa para a determinação da glicemia com o uso de glicosímetro ACCU-CHEK Roche Diagnostics GmbH D-68298 Mannheim, Alemanha. Foi utilizado o mesmo dispositivo e o mesmo calibrador de leitura para os dois grupos com o intuito de não haver viés na aferição.

O diabetes foi induzido por aplicação intraperitoneal (IP) de estreptozotocina (70mg/Kg) diluídos em uma solução de citrato de sódio (50mM) em 25ml de salina 0,9%. Esta solução é ajustada para um pH de 4,5. Os animais foram pesados e o referido montante a ser administrado de STZ foi individualizado em tubos de eppendorf específicos para cada animal. Este aminoglicosídeo foi diluído em 0,5 ml da solução de Citrato, sendo o volume final a ser administrado por via IP. O grupo controle recebeu apenas 0,5 ml da solução de citrato pela via IP sem STZ.

Após a indução, os animais foram recolocados nas gaiolas metabólicas, individualizados, com oferta de água (mL) e ração (g) aferidos diariamente. Tanto estas medidas quanto os dados de volume urinário e peso dos animais foram registrados diariamente até o D14 do experimento.

No dia 7 após a indução com STZ, foi coletado novamente uma amostra de sangue da cauda para a leitura da glicemia, seguindo o mesmo padrão de calibragem do aparelho citado para o D0. Os animais não foram deixados em jejum para esta medida, e caso a glicemia fosse acima de 200mg/dl e apresenta-se parâmetros de perda de peso, aumento do consumo de ração (polifagia), aumento do consumo de água (polidipsia), aumento do débito urinário (poliúria) e perda de peso; passariam a ser elegíveis para o grupo diabético (WU; YANG, 2015).

Além da alteração no valor da glicemia, para que os animais que haviam recebido a solução citratada de STZ fossem separados para o grupo DM, era necessário que os sinais clínicos estivessem presentes: poliúria (perda grande volume urinário), polidipsia (ingesta aumentada de líquidos), perda de peso e polifagia (ingesta aumentada de ração).

No D14, o protocolo de aferição da glicemia foi repetido para eliminar os animais que haviam tido a sua atividade pancreática recuperada. Ao término do D14, os animais foram separados para a aplicação dos demais protocolos experimentais.

4.4. Análise Bioquímica

4.4.1. Quantificação de Eletrólitos e Albumina

Ao término da linha de tempo experimental, os animais permaneceram cerca de 8h em jejum e em seguida foram anestesiados com cloridrato cetamina 10% (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg). Procedeu-se com uma excisão em linha mediana do abdome para a exposição da cavidade peritoneal. Amostras de tecido delgado foram coletadas para o protocolo de morfometria intestinal, que será descrito adiante.

Amostras de sangue, 2 mL, foram coletadas de grandes vasos abdominais e transferidas para tubos contendo heparina. Procedeu-se com centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos. O plasma sobrenadante foi transferido para outro tubo de eppendorf para a leitura em analisador bioquímico. A quantificação de ureia (Ur), creatinina (Cr), sódio (Na^+), potássio (K^+), Magnésio (Mg^+), Albumina (Ab) foram feitas através de analisador bioquímico WIENER lab, modelo: Wiener Lab CMD 800ix1 Henzen Midray Bio Medical electronics. Registro da Anvisa 10268590309.

4.4.2. Quantificação de Aminoácidos no Soro de animais CTRL e DM1

Ao término da linha de tempo experimental, após os animais serem submetidos à realização do teste de permeabilidade intestinal, os animais foram anestesiados com cloridrato cetamina 10% (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg). Procedeu-se com uma excisão em linha mediana do abdome para a exposição da cavidade peritoneal.

Amostras de sangue, 2 mL, foram coletadas de grandes vasos abdominais e transferidas para tubos sem heparina. Procedeu-se com centrifugação a 5000 rpm por 2 minutos. O soro sobrenadante foi transferido para outro tubo de eppendorf para a leitura em

cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*).

Em cada 500 uL de amostra de soro foram adicionados 450 ul de ácido tricloroacético 10% e 50 uL de padrão interno (Ácido Alfa Amino Butírico – AABA). Após processo de secagem a vácuo, foi adicionado 100 uL de Eluente A. Na sequência, uma amostra de 100 uL da solução total foi pipetada e colocada na coluna de leitura para a quantificação de aminoácidos: Ácido Glutâmico, Glutamina, Alanina, Citrulina e Arginina.

4.4.3. *Balanço Nitrogenado*

O cálculo do balanço nitrogenado tem sido empregado para aferição indireta da condição corporal no que concerne a massa proteica do indivíduo avaliado. É realizado para classificação da condição nutricional, evolução da resposta a dieta empregada e na avaliação da relação anabolismo/catabolismo (MAHAN; STUMP; RAYMOND, 2012). No presente trabalho foi calculado utilizando o peso da ração consumida no D14, observando a concentração de proteína por grama de ração especificado na embalagem. A uréia urinária foi quantificada em analisador bioquímico, que será descrito adiante, na urina de 24 produzida no D14.

Balanço Nitrogenado (BN) = Nitrogênio Ingerido (NI) – Nitrogênio Excretado (NE),

onde:

$$NI = \text{proteína ingerida (g)} / 6,25$$

$$NE = \text{uréia urinária 24h (g)} \times 0,47$$

4.5. **Bioimpedância Elétrica**

O ImpediVET® (Carlsbad, Califórnia, EUA) é um dispositivo de espectroscopia de bioimpedância tetra polar (BIS) de canal único que varre 256 frequências entre 4 kHz e 1000 kHz em menos de um segundo. O dispositivo utiliza uma plotagem de impedância complexa para determinar a água corporal total (do inglês, total body water - TBW), o fluido extracelular (do inglês, extracellular fluid - ECF) e o fluido intracelular (do inglês, intracellular fluid - ICF) a partir de dados de impedância. A massa livre de gordura (do inglês, Fat-free mass - FFM) e a massa gorda (do inglês, fat mass - FM) são calculadas através de um

software acoplado ao dispositivo, assim como o índice de massa corporal (IMC, do inglês body mass index).

O procedimento de avaliação corporal decorreu de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante. O animal anestesiado com cloridrato cetamina 10% (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg) foi colocado sobre uma superfície não condutora com membros posteriores e anteriores em perpendicular ao corpo e a cauda foi estendida distalmente. Quatro agulhas de (calibre 25 x 12) foram utilizadas como eletrodos, sendo inseridas na região subdérmica, ao longo da linha média dorsal. Os eletrodos centrais foram inseridos na região medial entre as orelhas e na base da cauda, interceptando a linha imaginária do músculo da coxa com a linha média do corpo. Enquanto que, os eletrodos periféricos foram inseridos entre os olhos, cerca de 2,0 cm do eletrodo entre as orelhas, e na cauda, cerca de dois centímetros do eletrodo da base da cauda. As agulhas foram então acopladas ao dispositivo. O comprimento entre os eletrodos centrais foi mensurado e adicionado ao equipamento, assim como o peso do animal. Em seguida, uma corrente elétrica foi acionada, os parâmetros de bioimpedância de resistência e reactância foram obtidos por um único espectro de 4 a 1 MHz numa série de 256 pontos. Valores predefinidos pelo fabricante para ratos são usados para calcular os parâmetros de composição corporal (CARLE, 2010).

Assim, foi realizada medida de impedanciometria no DO, antes da administração de estreptozotocina, e no D14, término do protocolo de gaiola metabólica. Os dados passaram pelo teste de normalidade para que fosse determinado o teste estatístico mais apropriado para grupos não pareados. Foi determinada a variação em percentual, considerando-se que 100% os valores aferidos no primeiro dia de bioimpedância.

4.6. Morfometria Intestinal

Após o término da linha de tempo do experimento, foram retiradas amostras de intestino delgado, nas suas três porções, ao final da perfusão intestinal sem toxina do cólera, e utilizando a solução de Ringer Lactato como substrato. O intestino avaliado pelo método de morfometria visa determinar a influência da hiperglicemia sem o tratamento de insulina nos segmentos de vilos e criptas de duodeno, jejuno e íleo.

Foram colhidas amostras dos três segmentos do intestino delgado, seccionadas longitudinalmente, fixadas em formol a 10%, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina (HE). A seguir, foram feitas as medidas das dimensões dos vilos e das

criptas. A altura dos vilos e a profundidade de criptas foram medidas a partir de lâminas em um microscópio de luz (Leica DM1000), equipado com uma câmera digital de alta resolução (Leica DFC320), que foi ligado a um computador com um programa de captação de imagem.

A altura das vilosidades foi medida a partir da linha de base até a ponta da vilosidade. A profundidade das criptas foi medida a partir da linha de base até o fundo da cripta. Ao menos 20 seções longitudinais claras de vilosidades e criptas foram selecionadas e contadas para cada grupo avaliado. Todas as medidas morfométricas foram feitas com o software de análise NIH Imagem J 1,34 S (National Institutes of Saúde, Bethesda, MD) (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

4.7. Permeabilidade Intestinal

A avaliação da permeabilidade através de análise de sacarídeos por cromatografia líquida é o padrão ouro para estudos da barreira morfofuncional intestinal. Este método tem sido amplamente utilizado em pesquisas do nosso grupo desde estudo pré-clínicos a estudos clínicos (LIMA, 1998).

Os animais foram acondicionados por 14 dias em gaiolas metabólicas após a indução de diabetes com STZ, de acordo com o descrito anteriormente. Entre o D12 e o D14, os animais receberam uma dieta pobre em carboidrato (*Rhoster-SP*). No último dia, os animais ficaram em jejum por 8 horas e receberam por meio de gavagem 2 ml da solução teste, contendo 5,0 g de Lactulose (Duphar Laboratories, Southampton, Reino Unido) e 1,0 g de Manitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA, São Paulo, Brasil), dissolvidos em 20 mL de água. A urina, preservada com clorexidina (0,236 mg/mL de urina, Sigma Chemical, St Louis, MO), foi recolhida 24 horas após a administração da solução de teste. Os volumes urinários foram mensurados, registrados, centrifugados a 10.000 rpm por 3 min e armazenados a -80°C até o dia de análise.

Duas soluções padrão de carboidratos foram usadas para calibrar o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High performance liquid chromatography). Cada padrão continha 60 μM dos seguintes açúcares: glucosamina, manitol, melibiose e lactulose (grupo I); e inositol, sorbitol, glucose e lactose (grupo II). As soluções padrão foram utilizadas para calibrar o sistema de HPLC no início das medições e entre os grupos, para corrigir a perda de sensibilidade devido ao acúmulo de materiais nos eletrodos. Para a determinação da variação intra-experimento, empregou-se os grupos I e II na concentração de 0,1 mM. Para o estudo, misturamos 50 μl de urina mais 50 μl de uma solução

contendo melibiose (3,6 mM) diluída em 2,9 ml de água destilada e desionizada duas vezes. Após centrifugação, empregou-se 50 µl para determinação de açúcar por cromatografia líquida de alta pressão, HPLC-PAD. As concentrações de lactulose e manitol foram medidas para todos os grupos experimentais por meio de cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsada, conforme descrito anteriormente (BARBOZA *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2007).

4.8. Procedimento Cirúrgico e Perfusão Intestinal

A partir do 14^o dia de experimentação nas gaiolas metabólicas, os animais foram preparados para dar prosseguimento ao protocolo de perfusão intestinal para que se possa avaliar a dinâmica do processo de absorção hidroeletrólítica tanto dos animais CTRL quanto dos DM.

Os animais foram mantidos em jejum durante 12 horas, com livre acesso à água antes de cada experimento. A anestesia foi realizada com cetamina (90mg/kg) (Clortamina®, 50mg/ml, BioChimico, Hameln-Alemanha/RJ) e xilazina (10mg/kg) (Xilazin 2%®, Syntec do Brasil, Cotia-SP), injetadas via intramuscular na pata traseira e reaplicada 1/3 da dose inicial, quando necessário, ao longo do experimento (MOLS *et al.*, 2009).

Após adequado plano anestésico, foi realizada uma laparotomia mediana (5 - 7cm) para visualização e exposição do intestino delgado. O segmento a ser perfundido foi exposto para excluir alguma lesão vascular acidental pela manipulação.

Após identificação do ceco do animal, foi realizada a canulação distal 1cm à montante. A partir deste ponto, mediu-se um segmento de cerca de 30 cm em direção proximal, onde foi realizada a canulação (cânulas em polivil flexíveis com diâmetro interno de 0,09 cm e externo de 0,26 cm; ColePalmer, Niles, IL, EUA). O segmento foi lavado suavemente com solução de PBS para eliminar resíduos de fezes que pudessem ocluir as cânulas. A seguir, o intestino canulado foi recolocado dentro do abdome, e a cavidade abdominal foi fechada para evitar a perda de umidade pelo intestino exposto.

Após a sutura para fechar a cavidade abdominal, iniciou-se a perfusão de uma solução de Ringer Modificada, caracterizadas na TABELA 1, pela cânula proximal. A solução foi acrescida de fenolsultaleína (PSP 50mg/ml) como marcador não absorvível, o pH ajustado para 7,4, aquecida à 37°C em banho maria e infundida com um fluxo de aproximadamente 0,4ml/min com o auxílio de uma bomba perfusora (Masterflex C/L, Modelo 77120-52, Thermo Fisher Scientific, Barrington, IL, EUA).

O soluto coletado na cânula distal foi armazenado a -20°C para a leitura em espectrofotometria de acordo com o protocolo descrito a seguir. Os dados foram obtidos e analisado pelo programa estatístico Graph pad Prisma.

Figura – 12. Desenho esquemático da perfusão intestinal

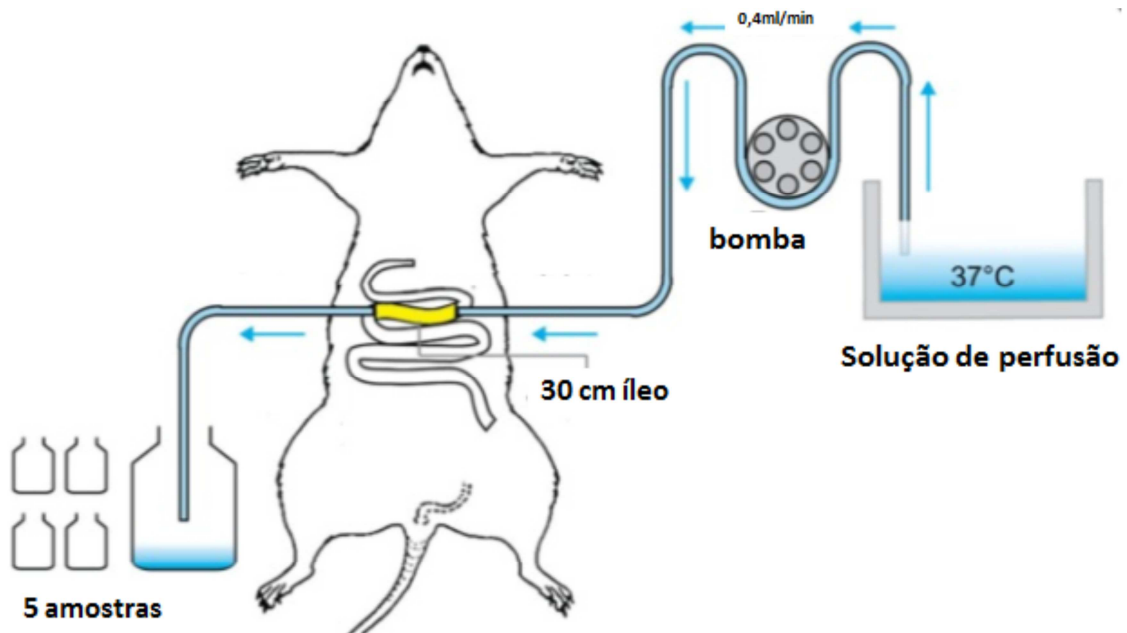


Figura evidenciando o esquema do procedimento do protocolo de perfusão intestinal. A solução (com um pH 7,4) empregada é aquecida em banho maria por até um temperatura de 37°C . Esta é bombeada através da cânula proximal a uma velocidade de 0,4 ml/min durante 100min. A cada 20 min é coletado uma amostra que será lida em espectrofotometria. (Adaptado de: ZHANG, 2012)

A perfusão intestinal foi realizada durante 100 min, com coleta de perfusato a cada 20 min, totalizando 5 amostras neste período. Os animais foram mantidos aquecidos (38°C) por lâmpada incandescente durante toda a perfusão, para evitar hipotermia.

Ao final do experimento, foi retirado o segmento intestinal perfundido para pesagem e obtenção do seu peso úmido completo. Posteriormente foi secado em estufa ($90^{\circ}\text{C}/72\text{h}$). Após a retirada dos segmentos intestinais, os animais foram sacrificados seguindo um aprofundamento anestésico e exsanguinação. Quando concluída a secagem dos segmentos intestinais perfundidos, o peso seco do segmento perfundido, que ficou incompleto após as retiradas das amostras, foi corrigido conforme fórmula abaixo, para posterior uso nos cálculos dos fluxos de água e eletrólitos.

$$\text{Peso seco do intestino perfundido} = \frac{\text{Peso úmido do intestino perfundido} \times \text{peso seco do intestino incompleto}}{\text{peso úmido do intestino incompleto}}$$

4.9.Cálculo da Variação Hidroeletrólítica dos Perfusatos Intestinais

4.9.1. Protocolo do Teste de Fenolsulfonaftaleína (Psp)

O PSP é um ácido orgânico fraco que varia da cor amarela para vermelha com a variação do pH (6,8-8,4). O movimento de água no lúmen intestinal pode ser determinado observando as mudanças na concentração de um marcador não absorvível, como o PSP. Conhecendo a concentração dessa substância nas soluções perfundidas no lúmen intestinal (50mg/ml), podem-se deduzir variações na concentração de eletrólitos e alterações na osmolaridade e no transporte de água no lúmen intestinal (MOURAD, 2004).

O PSP (Phenol Red, Sigma chemical company, St Louis, MO, USA), foi medido em espectrofotômetro (modelo AJX-1600, Micronal S.A., Aparelhos de Precisão, São Paulo, SP, Brasil). O cálculo da densidade da amostra de perfusato foi realizado baseado no protocolo de ALLEN, 1950, utilizando a fórmula abaixo:

$$CDXx = ODx - \frac{(ODa + ODb)}{2}$$

Onde:

ODx= densidade observada do comprimento de onda, na absorbância máxima. ODa e ODb= densidade observada nos comprimentos de onda a (520nm) e b (600nm) devem estar equidistantes da densidade x.

CDXx= a densidade calculada verdadeira da substância C tendo uma absorção máxima no comprimento de onda x (560nm).

4.9.2. Cálculo da variação da osmolaridade

A variação na osmolaridade foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Net Osm } T_x = \left[\frac{(\text{FB}/\text{PI}) \times \text{OsmS}}{\text{PSP } T_x} - \frac{(\text{FB}/\text{PI}) \times \text{PSPT}_{x-1}}{\text{PSP } T_x} \right] \times \left[\frac{(\text{Osm}T_{x-1} + \text{Osm}T_x)}{2} \right]$$

Onde:

Net OsmTx = variação da osmolaridade no segmento intestinal perfundido no tempo *x*; *FB* = Fluxo da bomba inicial, em ml/min;

PI = Peso seco do intestino perfundido em g;

OsmS = Osmolaridade medida na solução perfundida, em $\mu\text{Osm/ml}$;

PSPT_{x-1} = Absorbância a 560nm de PSP da amostra coletada no tempo imediatamente anterior ao tempo *x*;

PSPT_x = Absorbância a 560nm de PSP da amostra coletada no tempo *x*;

OsmTx-1 = Osmolaridade medida na amostra coletada no tempo imediatamente anterior ao tempo *x*, em $\mu\text{Osm/ml}$;

OsmTx = Osmolaridade medida na amostra coletada no tempo *x*, em $\mu\text{Osm/ml}$;

Os valores obtidos para variação da osmolaridade foram expressos em (média \pm EPM) $\mu\text{Osm/ml}$ /grama de intestino seco perfundido. Valores positivos indicam redução da osmolaridade do lúmen, valores negativos indicam aumento da osmolaridade no lúmen.

4.9.3. Cálculo da variação de sódio, potássio e cloreto

A variação no transporte intestinal eletrólitos (sódio, potássio ou cloreto) foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Net Eletr } T_x = \left[\frac{(\text{FB}/\text{PI}) \times \text{EletrS}}{\text{PSP } T_x} - \frac{(\text{FB}/\text{PI}) \times \text{PSPT}_{x-1}}{\text{PSP } T_x} \right] \times \left[\frac{(\text{Eletr}T_{x-1} + \text{Eletr}T_x)}{2} \right]$$

Onde:

Net EletrTx = variação do transporte intestinal de eletrólitos (sódio, potássio ou cloreto) no segmento intestinal perfundido no tempo *x*;

FB= Fluxo da bomba inicial, em ml/min;

PI = Peso seco do intestino perfundido em g;

EletrS= Concentração do eletrólito medida na solução perfundida, em $\mu\text{Eq/ml}$;

PSPTx-1 = Absorbância a 560nm de PSP da amostra coletada no tempo imediatamente anterior ao tempo x;

PSPTx = Absorbância a 560nm de PSP da amostra coletada no tempo x;

EletrTx-1= Concentração do eletrólito medida na amostra coletada no tempo imediatamente anterior ao tempo x, em $\mu\text{Eq/ml}$;

EletrTx = Concentração do eletrólito medida na amostra coletada no tempo x, em $\mu\text{Osm/ml}$.

Os valores obtidos para variação do transporte de eletrólitos foram expressos em (média \pm EPM) $\mu\text{Eq/ml}$ /grama de intestino seco perfundido. Valores positivos indicam aumento da concentração do eletrólito no lúmen, valores negativos indicam redução da osmolaridade no lúmen.

As concentrações de sódio, cloreto e potássio foram determinadas em fotômetro de chama (modelo 443, Instrumentation Laboratory, Lexington, EUA). A osmolaridade foi mensurada em osmômetro de pressão a vapor (modelo 5100 Wescor, Logan, Utah, EUA).

4.10. Avaliação da inflamação e do estresse oxidativo em amostras de intestino delgado

Ao término da linha de tempo, e após o procedimento cirúrgico para a retirada de amostras de intestino delgado, foi selecionado o seguimento do íleo para a realização da análise de estresse oxidativo, inflamação e concentração de antioxidante, devido ter sido o segmento averiguado na dinâmica do transporte hidroeletrolítico pela perfusão intestinal. Estes seguimentos ileais foram acondicionados a -80°C para a realização dos protocolos de atividade da mieloperoxidase, níveis de malondialdeído e níveis de glutathiona reduzida.

4.10.1. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO foi avaliada como um marcador bioquímico da infiltração de granulócitos, ela é uma enzima presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos e outras células da origem mielóide, evidenciando a atividade inflamatória local. Amostras de intestino foram homogeneizadas com brometo de hexadecitrimetilamônio a 0,5% (HTAB; pH 6,0) em tampão de fosfato de potássio para preparar um homogenato a 10%. O homogeneizado foi

centrifugado a 5000 rpm por 7 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. A atividade da MPO foi aferida utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1% como substrato para essa enzima. Durante o ensaio, à medida que o H₂O₂ for degradado, ocorre a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom (BRADLEY *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos em unidades por miligramas (U/mg) de tecido.

4.10.2. Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

Para confirmar o dano oxidativo direto no tecido, o grau de lipoperoxidação foi mesurado por meio da determinação dos níveis de MDA através das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de OHKAWA *et al.* (1979). Foi realizado homogenato do tecido a 10% (100mg/1ml) em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Em seguida retirou-se 250 µL do homogenato e adicionaram-se 1,5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% + 500 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6% e levado ao banho fervente (95-100 °C) por 45 minutos. A mistura foi resfriada em banho de gelo e em seguida adicionou-se 2 mL de n-butanol. O tubo foi agitado no vórtex por 1 min. e centrifugado a 1200rpm/15min. Após a centrifugação retirou-se a fase orgânica para realização da leitura em espectrofotômetro (535 nm). Os resultados foram expressos em nMols de malondialdeído (MDA) por mg de proteína. A concentração de proteínas será medida utilizando o método adaptado de Bradford (1976).

4.10.3. Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

O princípio do teste consiste na utilização do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)), que é bem usado para analisar a atividade da GSH em amostra de tecidos. O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB) de cor amarela que pode ser detectado por espectrofotometria (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

Para avaliação das alterações no conteúdo tecidual de glutathiona reduzida foi feito homogenato a 10% em solução gelada de EDTA 0,02 M. 40 µL de cada amostra (homogenato a 10% em tampão fosfato), adicionou-se 160 µL de água destilada e 40 µL de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi centrifugado a 3000 g por 15 min e retirado 200 µL do sobrenadante, e adicionaram-se 400 µL de tampão TRIS 0,4M (pH=8,9) e 10 µL de DTNB 0,01M. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão

(1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg). Todo o ensaio foi avaliado na absorbância de 412 nm e os resultados serão expressos em µg/mg de proteína

4.11. Avaliação da Transcrição Gênica

4.11.1. Extração do RNA total

Segmentos de íleo armazenados a -80 °C foram descongelados e pesados. Cada tecido foi posto em contato com uma esfera de metal e congelada no -80 °C por 15 minutos. A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

O tecido congelado com a esfera de metal e 1000 µl de triazol foram adicionados, em seguida foi submetido à alta rotação pelo equipamento TissueLyse® (Qiagen, Hilden, Alemanha) por até 5 minutos. Deixou-se o tubo com o homogenato por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após este período, foram adicionados 200µL de BCP (1 -bromo-3-cloropropano, FLUKA 16720) em cada amostra, misturadas vigorosamente e deixadas em temperatura ambiente por 2 a 3 min. Em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de 2,0 mL e foi adicionado 1 volume de etanol 70%. As amostras foram novamente misturadas vigorosamente e 700 µl foi transferido para coluna mini spin, que retém o RNA. Centrifugou-se por 15 segundos a 12.000 rpm à temperatura ambiente e descartou-se o volume do tubo coletor. À coluna foi adicionado o tampão RW1 e, então, novamente submetido à centrifugação (10.000 rpm). O volume do tubo coletor foi descartado. Em seguida, adicionou-se 500µL do tampão RPE e centrifugou-se (10.000 rpm) 15 segundos. Este último procedimento foi repetido com centrifugação por 2 minutos. O frasco coletor foi então trocado e repetiu-se a centrifugação por 1 minuto. O RNA retido na coluna foi eluído em 30 µL de água RNase-free e coletado após centrifugação a 10 000 rpm por 1 min.

A quantidade e qualidade do RNA isolados foram analisadas através de leituras da absorbância a 260 nm e razão 260/280nm pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), respectivamente. O RNA extraído foi armazenado a -80 °C.

4.11.2. Síntese de cDNA

O RNA total isolado armazenado a -80 °C seguiu para a síntese de cDNA através do iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Califórnia, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu 1,0 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão 5x iScriptReaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), 200 ng/µL de RNA extraído das amostras e completou-se o volume total até 20µL com água livre de nuclease. O protocolo padrão no termociclador iCycler® (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos) foi 25°C por 5 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20 °C até a amplificação pela Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR).

4.11.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativo

A transcrição relativa dos genes SGLT-1, PepT-1, CFTR, claudina-15, claudina-2, ocludina, ZO-1e NHE₃ foi realizada através do equipamento CFX96 Touch® (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Como mostra a Tabela 3, a sequência dos iniciadores de DNA (primers) dos genes investigados foi obtida no sítio eletrônico National Center for Biotechnology Information (NCBI), no qual o gene de referência utilizado foi o GAPDH.

Para a reação foram utilizados 10 µL de YBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Inglaterra), 2,0 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1,0 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nuclease até um volume final de 20µL. As condições de anelamento para cada gene investigado estão descritos na TABELA 1, todos os ciclos começaram com a etapa de desnaturação (20 segundos a 95°C) e finalizaram com etapa de extensão (45 segundos por 1 minuto a 72°C). Os dados foram obtidos com o software do sistema CFX96 (BioRad, Califórnia, EUA) e foram baseados nos valores do ciclo de limiar, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de qPCR. Todas as amplificações foram avaliadas quanto à curva de melting, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (Cq/Ct) dos genes foram exportados para o Microsoft Excel® (Microsoft, EUA) e os níveis relativos de RNA foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gene alvo} - \text{Média do Ct gene de referência GAPDH})$, conforme descrito por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1 - Iniciadores de genes e condições e temperatura de anelamento

<i>Genes</i>	<i>Sequência dos iniciadores</i>	<i>Temperatura de Anelamento</i>
Ocludina	S- AAC AGC CCC CTA ATG TGG AAG AS – GAG TAG GCC ATT GGA ACT GTCG	60 ⁰ C
ZO-1	S – CTC GCA CGT ATC ACA AGC TGA AS – CCT CAG GAT ATG GCT CCT TCC	60 ⁰ C
Claudina 2	S – AGG ACT TCC TGC TGA CAT CCA AS – TCC ACC CAC TAC AGC CAC TCT	60 ⁰ C
Claudina 15	S – GAC CTC TCC AGA AAG GCC AAG AS – AGA TAG CAA CCA ATG CCA CAGG	58 ⁰ C
NHE₃	S – CTC TGG GGC AGG AAT TGA TA AS – AGA TAG CAA CCA TGC CAC AAG	58 ⁰ C
CFTR	S – GCA ATG GGC TGT GAA CTC AA AS – ACC TCC AGA GGG CCA GGT AT	60 ⁰ C
SGLT-1	S – GCT GGA GTC TAC GTA ACA GCA CA AS – GGG CTT CTG CAT CTA TTT CAA TG	60 ⁰ C
PEPT-1	S – AGC AGA GAT CGA GGC ACA GT AS – TTC CCT ACG CCC TTT TTC TT	60 ⁰ C
GAPDH	S – GTT ACC AGG GC TGCC TTC TCT AS – AAC TTG CCG TGG GTA GAG TCA	60 ⁰ C

Nota: S – iniciador senso (5'-3') e AS – iniciador anti-senso (3'-5'). Gene de referência: GAPDH.

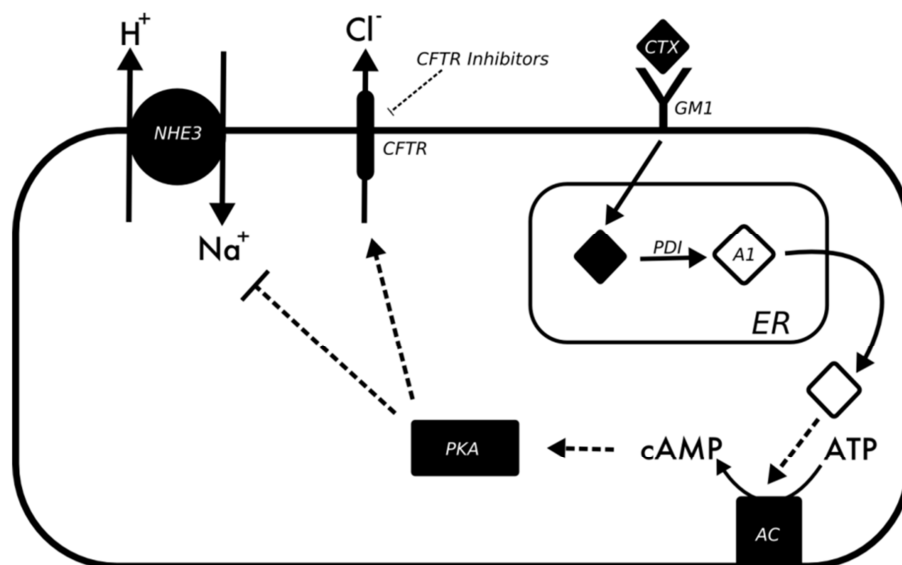
4.12. Indução da diarreia secretória e perfusão com soluções de reidratação

A diarreia secretória foi induzida pela toxina do cólera. A toxina do cólera (TC) é composta de seis subunidades: uma A e cinco B. As subunidades B se ligam a um receptor gangliosídico específico (GM1) a partir dos vilos de intestino delgado. O número de subunidades B correlaciona-se com a toxicidade, presumivelmente facilitando a captação através do agrupamento de múltiplos GM1s. Esta ligação subunidade B- GM1 promove a formação de um poro transmembrana que introduz a subunidade A para dentro do citoplasma da célula intestinal (SPANGLER, 1992).

Após endocitose, TC é transportada via endossomos para a rede do complexo de Golgi dependente de actina. Dentro do retículo endoplasmático (RE- sigla em inglês), a TC é

desdobrada pela proteína dissulfeto isomerase (PDI) à cadeia A1 ativa do ponto de vista enzimático, sendo assim liberada para o citosol. Uma vez no citosol, A1 começa a exercer seus efeitos tóxicos. A cadeia A1 eleva concentrações intracelulares de AMPc, ativando a subunidade alfa de uma proteína G (G s) que por sua vez aumenta a atividade de adenilato ciclase (AC). Este aumento do AMPc promove a ativação da proteína quinase A (PKA) e esta fosforila diversas serinas chave do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), secretando ativamente íons Cl^- e HCO_3^- , para dentro do lúmen intestinal a partir das criptas. Associado a isso, este AMPc também age no segmento dos vilos intestinais inibindo a absorção de íons Na^+ e Cl^- , através da inibição do transportado transmembrânico NHE3 (KOPIC; GEIBEL, 2010). Entretanto, a alteração no transporte hidroeletrolítico desencadeado pela influência da toxina do cólera não afeta a fisiologia da bomba de Na/glicose ou da bomba Na/di-tripeptídeo, o que favorece a utilização de soluções de reidratação oral no tratamento da diarreia osmótica por esta toxina (BINDER *et al.*, 2014).

Figura – 13. Mecanismo de ação da toxina do cólera



Mecanismo de ação da TC. O aumento do AMP cíclico promove uma redução da absorção de sódio no vilos e um aumento da secreção de cloreto pela cripta intestinal. A toxina do cólera (CTX) se liga ao receptor GM1 e a subunidade A é transportada para o retículo endoplasmático (ER- sigla em inglês). Após ser reduzida a subunidade A1, esta ativa a adenilato ciclase (AC) que eleva a concentração de AMPc que ativa a proteína quinase A (PKA). Esta por sua vez promove a inibição do trocador H/Na (NHE₃) e estimula uma maior liberação de cloreto para o lúmen intestinal. (Adaptado de: KOPIC; GEIBEL, 2010)

No grupo tratado com toxina do cólera (TC), aproximadamente 10ml de solução de PBS, contendo 1µg/ml de TC (Cholera Toxin, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) foi perfundida durante 30 min antes da perfusão com as soluções teste. As soluções utilizadas na perfusão foram: RINGER modificado – como solução controle; Solução preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2003 apresentando uma osmolaridade de 311 mOsm/L (MURUGAIAH *et al.*, 2016); Solução a base de Alanil-Glutamina (ALGLN) que apresenta a mesma osmolaridade de 311 mOsm/L. A composição química é demonstrado na TABELA 2.

O plano anestésico, o procedimento cirúrgico e a canulação das alças de íleo dos animais seguem a descrição do item 4.9. A seguir iniciou-se a perfusão das soluções teste, caracterizadas na TABELA 2, pela cânula proximal. Todas as soluções foram acrescidas de fenolsulfitaléina (PSP 50mg/ml) como marcador não absorvível, tiveram o pH ajustado para 7,4, aquecidas à 37°C em banho maria e infundidas com um fluxo de aproximadamente 0,4ml/min com o auxílio de uma bomba perfusora (Masterflex C/L, Modelo 77120-52, Thermo Fisher Scientific, Barrington, IL, EUA). O protocolo de leitura em espectrofotometria dos perfusatos coletados pelas cânulas distais segue o descrito no item 4.10.

Tabela – 2. Composição das soluções empregadas na perfusão intestinal

<i>Ringer modificado</i>	<i>Solução da OMS</i>	<i>Solução de ALGLN</i>
NaCl - 111 mMol KCl - 1,8 mMol CaCl₂ - 1,08 mMol NaHCO₃ - 2,38 mMol NaH₂PO₄ - 0,8 mMol 0,050g/L de Phenol Red	NaCl - 59,9 mMol Glicose - 111 mMol Citrato Na⁺ -11,23 mMol KCl - 20, 12 mMol 0,050g/L de Phenol Red	NaCl - 59,9 mMol ALGLN - 111 mMol Citrato Na⁺ -11,23 mMol KCl - 20, 12 mMol 0,050g/L de Phenol Red

Tabela apresentando as soluções empregadas no estudo e os componentes químicos. A solução de ringer modificado foi utilizada como controle. A solução da OMS utiliza como substrato para a reidratação a glicose. A solução de reidratação a base de Alanil – Glutamina (ALGLN) apresenta a mesma osmolaridade da solução da OMS, substituindo a glicose pelo dipeptídeo ALGLN.

Figura –14. Representação esquemática de grupos experimentais para perfusão intestinal

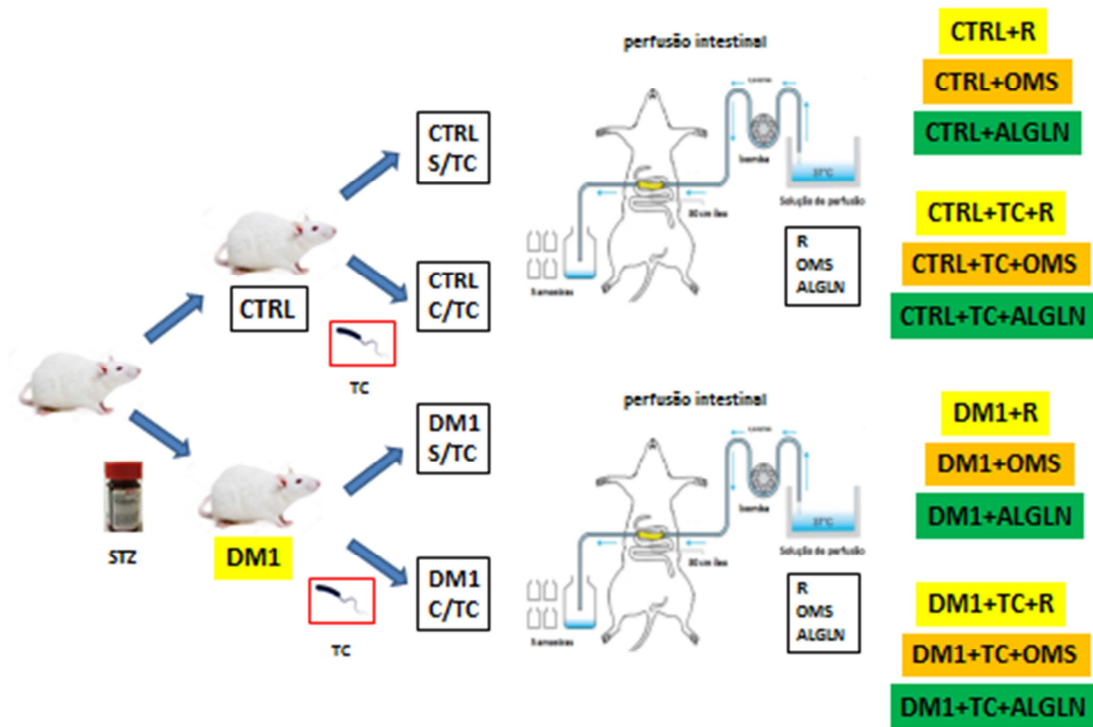


Figura representando a distribuição dos grupos experimentais que foram perfundido com solução de Ringer modificado (R), solução de reidratação a base de glicose indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e solução de reidratação a base do dipeptídeo Alanil-glutamina (ALGLN). Após a indução da diabetes mellitus por solução de estreptozotocina (STZ), os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico e canulação de 30 cm terminais de íleo intestinal. Foi perfundido uma solução de PBS com 1µg/ml de toxina do cólera (C/TC) ou solução de PBS sem toxina (S/TC). Tanto animais controles (CTRL) quanto diabéticos (DM1) receberam em grupos individualizados a soluções testes já caracterizadas, perfazendo 9 grupos experimentais. DM1= grupo diabético; CTRL= grupo controle; TC= toxina do cólera; R= solução de ringer; OMS= solução de glicose preconizada pela Organização Mundial da Saúde; ALGLN= solução a base de Alanil-glutamina

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados numéricos obtidos após a aplicação dos diversos protocolos experimentais foram plotados em planilhas de Excel 2010 (Microsoft Corporation). Posteriormente, estes dados foram transferidos para o software Graph Pad Prima versão 5.00 para Windows (San Diego, CA).

A análise de normalidade foi realizada através dos testes de Komogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, selecionados de acordo com o número de amostras. Considerando um valor de $P > 0.1$, as amostras são classificadas em normais para a curva de Gauss. Assim, utilizaram-se testes paramétricos entre variáveis normais e não paramétricos para variáveis onde $P < 0.1$.

Para a comparação entre duas variáveis numéricas normais e grupos não pareados foi aplicado o Teste t de Student; enquanto que para duas variáveis que foram alocadas fora da curva gaussiana, foi aplicado teste não paramétrico de Mann Whitney. O teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Bonferroni foi aplicado para comparação entre três ou mais variáveis numéricas e paramétricas. Para avaliação de três ou mais variáveis não paramétricas, lançou-se mão do teste de Kruskal – Wallis e o post hoc aplicado nestes casos foi o teste de Dunn. O nível de significância estatística foi fixada em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

O software SPSS, versão 22.0, foi utilizado para realização de testes de correlação entre variáveis numéricas. A princípio, os dados são classificados em paramétricos ou não paramétricos. A seguir, para classificar se houve ou não correlação significativa, foram aplicados os testes de Pearson entre variáveis paramétricas e o teste de ρ de Spearman entre variáveis não paramétricas. O grau da correlação é determinado como leve, moderado ou forte, podendo ter uma correlação positiva ou negativa, sendo significativo para um $p < 0,05$. O método de análise estatística é representado por fluxograma conforme a figura 15.

Figura –15. Fluxograma da análise estatística dos dados

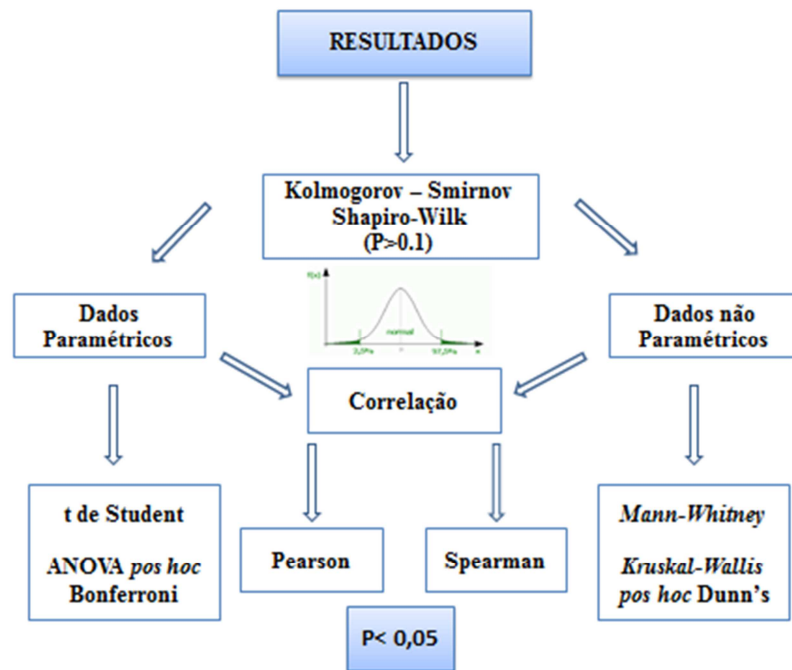


Figura representando o fluxo esquemático da avaliação estatística dos dados. Após os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, os dados foram separados em paramétrico (seguem a normalidade) ou não paramétrico (que não seguem a normalidade). Para comparação de variáveis numéricas e não pareadas foram utilizados testes de T Student e Mann Whitney. Quando realizado em mais de dois grupos, utilizou-se testes de ANOVA e kruskal- Wallis. Para correlação de dados numéricos, lançou-se mão de testes de Pearson e Spearman. Significância considerada quando $p < 0,05$

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do modelo de diabetes tipo1 por parâmetros laboratoriais

6.1.1. Eletrólitos e albumina plasmáticos de CTRL x DM1

Os resultados da quantificação de eletrólitos e albumina plasmática revelaram que após 14 dias de indução de diabetes, houve redução dos valores de sódio e albumina séricos dos animais diabéticos em relação aos controles saudáveis. Em contrapartida, os animais DM apresentaram elevação na concentração sérica de potássio, magnésio e de escórias nitrogenadas como expresso na TABELA 3 e FIGURA 15.

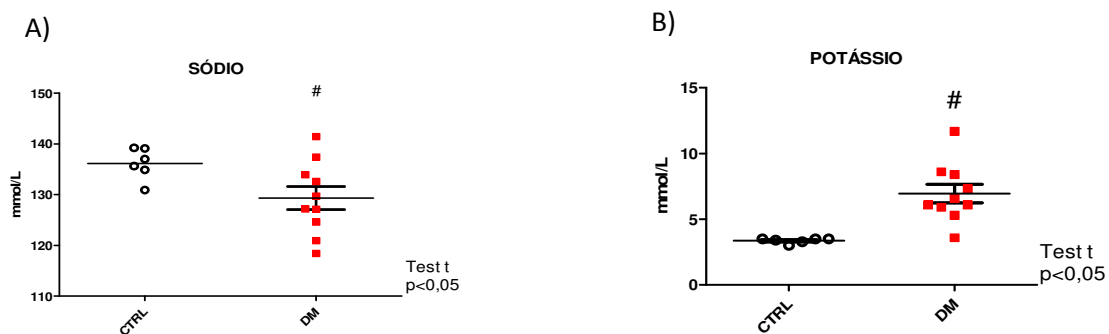
Os dados de creatinina plasmática foram analisados por teste de Mann Whitney. Os demais, utilizando teste T de Student.

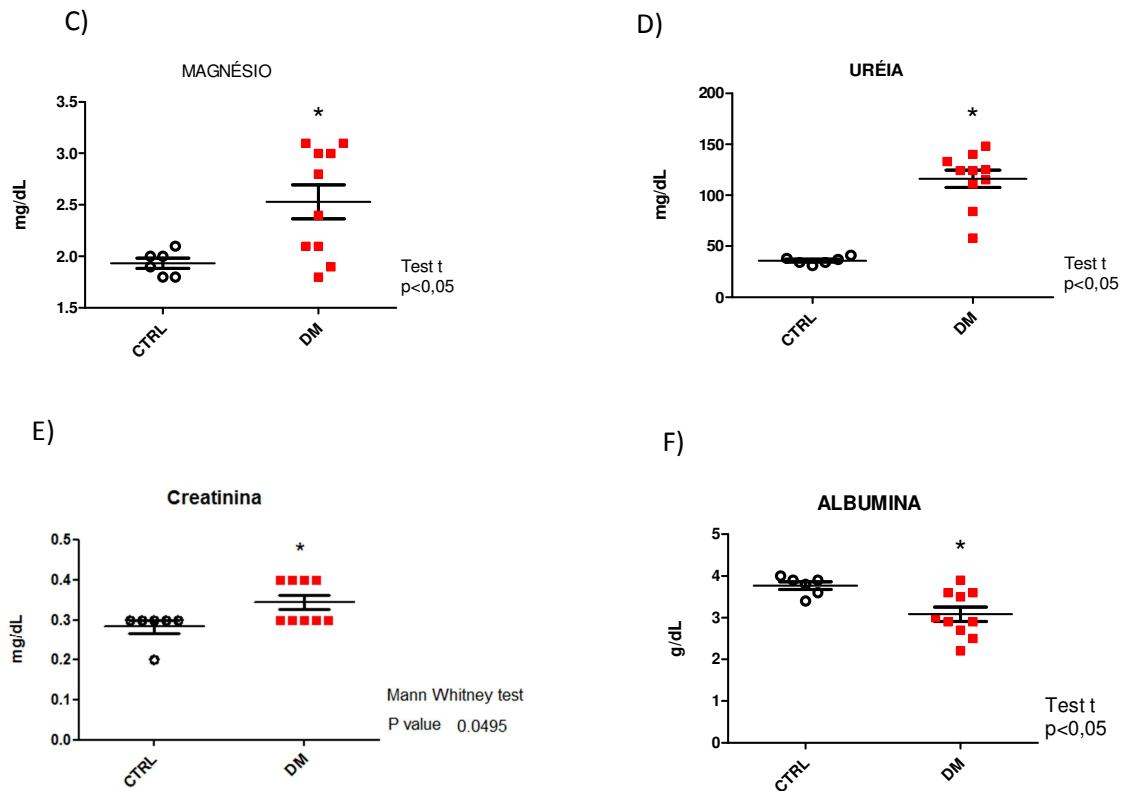
Tabela - 3. Bioquímica plasmática de animais controles e diabéticos

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
Na sérico mmol/L	136.1 ± 1.267 N=6	↓ 129.3 ± 2.273 N=10	0,0473
K sérico mmol/L	3.367 ± 0.08028 N=6	↑ 6.960 ± 0.7002 N=10	0,0016
Mg sérico mg/DL	1.933 ± 0.04944 N=6	↑ 2.530 ± 0.1660 N=10	0,0171
Ur sérica mg/DL	35.83 ± 1.447 N=6	↑ 116.2 ± 8.506 N=10	<0.0001
Cr sérica mg/DL	0,2833 ± 0,01667 N=6	↑ 0,3444 ± 0,01757 N=9	0,0495
Albumina sérica g/ dl	3.767 ± 0.09189 N=6	↑ 3.080 ± 0.1737 =10	0,0119

Tabela evidenciando os valores brutos de parâmetros bioquímicos coletados de amostras de sangue colhidos no D14 após o sacrifício dos animais. Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺), Magnésio (Mg⁺), Ureia (Ur), Creatinina (Cr) e Albumina com suas respectivas unidades de medida. Grupo controle composto de 6 animais. Grupo diabético composto por 10 animais. P value representando a significância após a aplicação de testes estatísticos. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM, aplicado test t; exceto creatinina plasmática, Mann Whitney test.

Figura – 16. Bioquímica plasmática CTRL X DM1





Gráficos esquemáticos representando as comparações entre grupos controle (CTRL) e diabético (DM) no dia 14, após sacrifício dos animais. A) Concentração plasmática de sódio em mmol. B) Concentração plasmática de potássio em mmol; C) Concentração plasmática de magnésio em mg/dL; D) Concentração plasmática de ureia em mg/dL E) Concentração plasmática de creatinina em mg/dL F) Concentração plasmática de albumina em g/dL; Os valores são apresentados como média \pm EPM, n=6 (controles), n= 10 (diabéticos); * P<0,05; dados não pareados, test t de Student para dados paramétrico e Test Mann Whitney para dados não paramétricos

6.1.2. Aminoácidos plasmáticos de CTRL x DM1

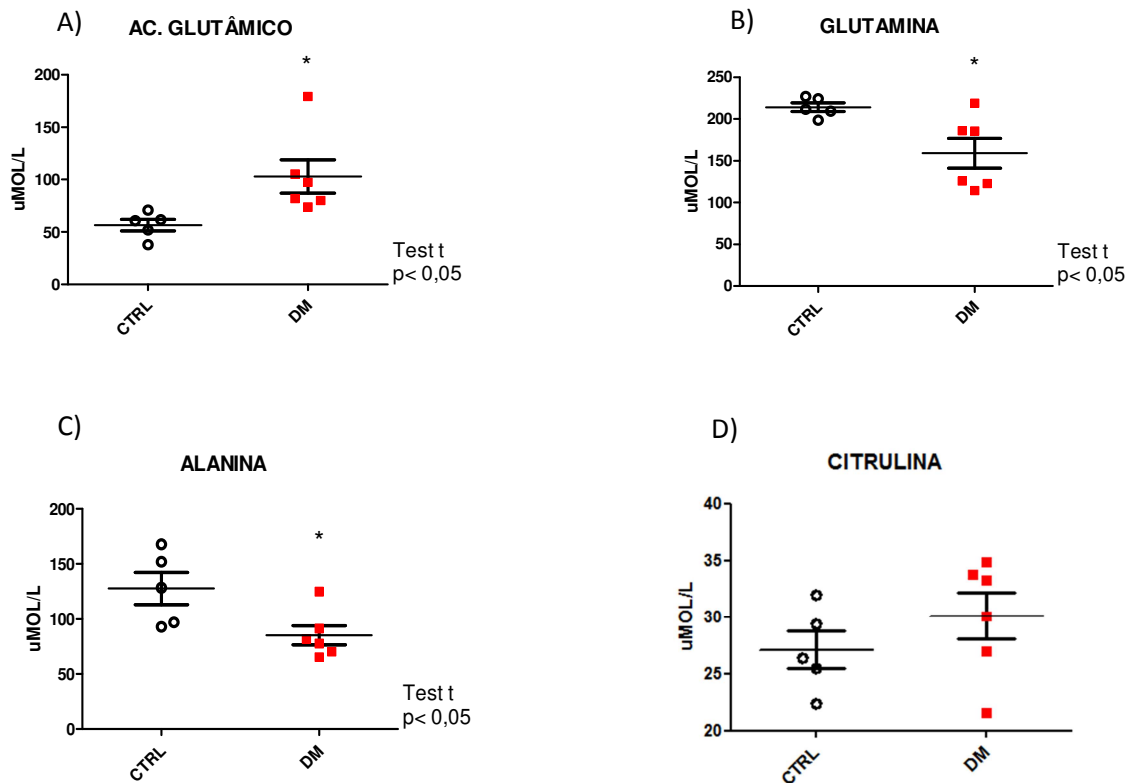
Após o término do procedimento de perfusão intestinal nos grupos CTRL e DM, a partir do D14, utilizando solução de Ringer lactato sem a indução de diarreia osmótica pelo cólera, prosseguiu-se com a retirada de amostras de sangue de grandes vasos para que se separasse o plasma. Este foi submetido ao protocolo de contabilização da concentração de um pool de aminoácidos por método de HPLC.

Observou-se que nos animais diabéticos ocorreu uma diminuição da concentração de glutamina e alanina. Entretanto, não houve diferença na medida de citrulina e ocorreu um aumento na concentração de ácido glutâmico. Não foi possível a quantificação no plasma sanguíneo de arginina, tendo apresentado concentração zero, nos animais diabéticos pelo método utilizado, conforme TABELA 4 e FIGURA 16.

Tabela – 4. Aminoácidos quantificados em soro de animais CTRL e DM1 no D14

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
Citrulina uMOL/L	27.10 ± 1.646 N=5	30.10 ± 2.081 N=6	0,3019
Arginina uMOL/L	54,13±15,18 N=5	↓ 000	
Ác. Glutâmico uMOL/L	56.59 ± 5.570 N=5	↑ 103.0 ± 16.01 N=6	0,0327
Glutamina uMOL/L	214.1 ± 5.198 N=5	↓ 159.0 ± 17.76 N=6	0,0232
Alanina uMOL/L	127.6 ± 14.74 N=5	↓ 85.13 ± 8.740 N=6	0,0296

Tabela apresentando os valores em $\mu\text{mol/L}$ de aminoácidos plasmáticos (quantificados por HPLC) e do balanço nitrogenado negativo de animais controles e diabéticos, quantificados no D14 após o sacrifício dos animais e coleta de amostras de sangue. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM; CTRL N=5; DM N=6; P value evidenciando a significância após teste estatístico; dados não pareados, test t de Student.

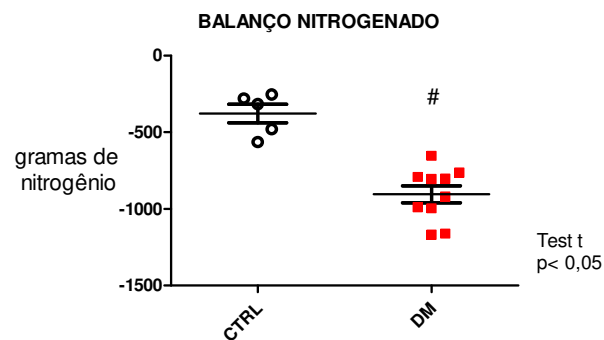
Figura – 17. Aminoácidos quantificados em soro de animais CTRL e DM1 no D14

Comparação de valores plasmáticos de aminoácidos quantificados por método de cromatografia líquida de alta performance (sigla em inglês HPLC) entre grupos controle e diabético. Valores de Ácido Glutâmico, Glutamina e Alanina medidos em micro mol/L ($\mu\text{mol/L}$). CTRL N=5; DM N=6; Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$; dados não pareados, test t de Student.

6.1.3. Balanço Nitrogenado

Ao final da linha de tempo experimental, os valores obtidos do consumo médio de ração ao longo de 14 dias de experimentação, pode-se notar que os animais diabéticos apresentaram um balanço nitrogenado mais negativo do que os controles, corroborando com o aumento na concentração de ureia nos animais com hiperglicemia, evidenciando um estado hipercatabólico. CTRL: - 377.9 ± 60.66 gramas N=5; DM:1 - 904.4 ± 54.48 gramas, N=10, $p < 0.0001$.

Figura - 18. Medida de Balanço Nitrogenado ente CTRL x DM1



Comparação dos valores de balanço nitrogenado entre grupo de animais controles e diabéticos. BN= NI-NE. NI= nitrogênio ingerido (g de proteína / 6,25); NE= nitrogênio excretado (g de ureia de 24h x 0,47). Todos Os valores são apresentados como média ± EPM.* $P < 0,05$; dados não pareados, teste t de Student.

6.2. Avaliação clínica da indução diabética

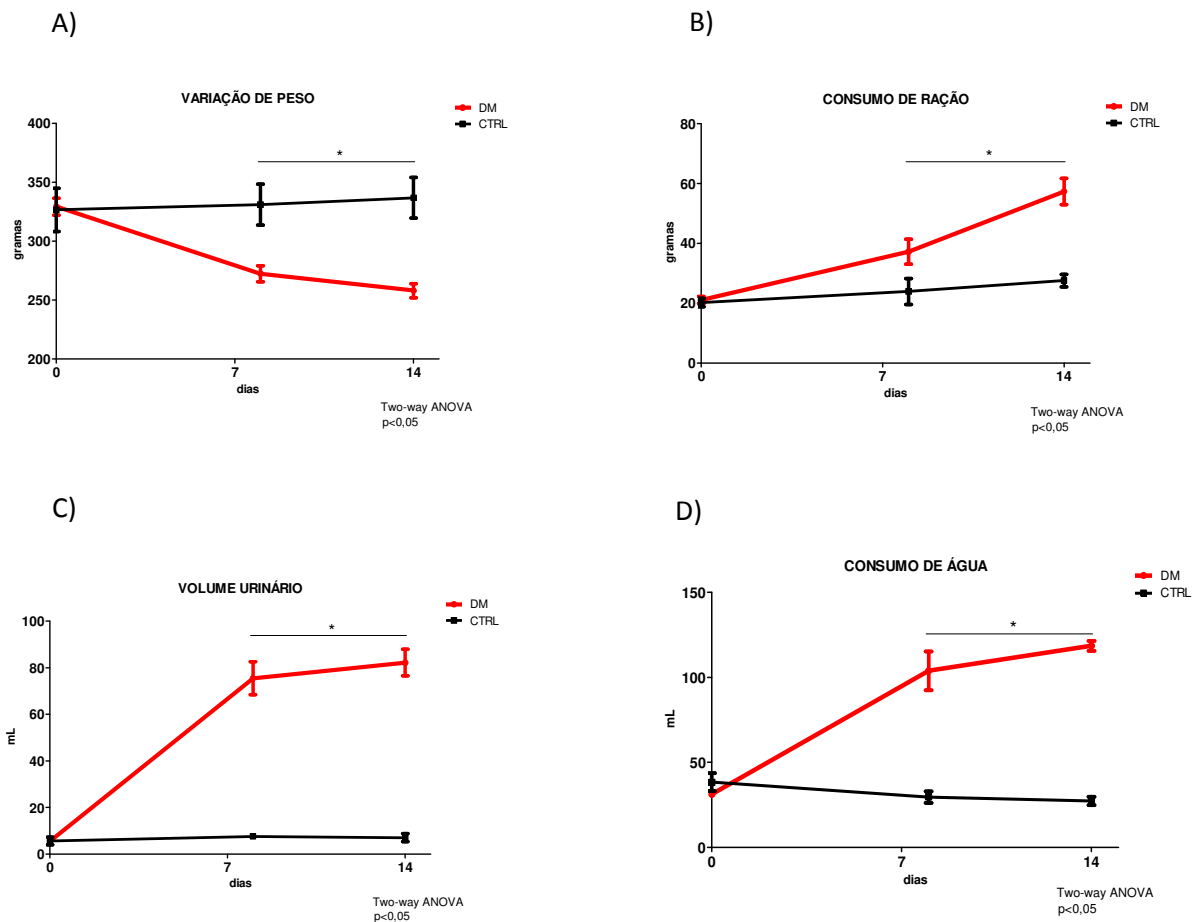
6.2.1. Parâmetros clínicos após indução de diabetes com STZ

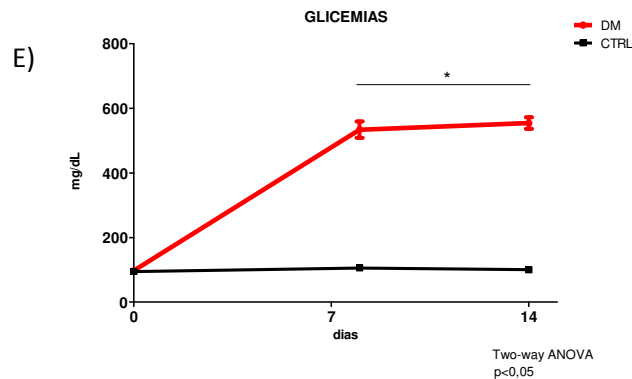
Os dados obtidos com aferições diárias de peso, consumo de água, consumo de ração e eliminações urinárias, quantificados enquanto os animais eram mantidos nas gaiolas metabólicas evidenciaram que, a partir do sétimo dia da indução de diabetes por estreptozotocina (STZ), os animais diabéticos apresentaram poliúria, polifagia, polidipsia perda de peso significativamente alterados em relação aos controle, conforme evidenciando na TABELA 5 e FIGURA 18.

Tabela – 5. Quantificação das alterações clínica e laboratorial após indução por STZ

PARÂMETRO	CONTROLE			DIABÉTICO		
	D0	D8	D14	D0	D8	D14
Média ± desv. pad						
PESO (g)	326,45± 40,96	330,89± 38,80	336,8± 38,75	329,29± 22,79	272,35± 21,51	258,01± 18,76
CONSUMO DE RAÇÃO (g)	20,25±3,05	23,90±9,63	26,72±5,19	21,08±3,66	37,20±13,11	57,37±13,87
VOLUME URINÁRIO (mL)	5,6±3,69	7,6±2,60	7±3,87	5,5±2,44	75,5±22,53	82,2±18,04
CONSUMO DE ÁGUA (mL)	38,4±11,61	29,6±7,66	26,8±6,41	31,2±2,14	103,9±36,05	118,6±9,24
GLICEMIAS (g/dL)	95±7,96	105,6±19,67	100±6,67	97,2±6,69	533,8±79,81	554,1±56,37

A tabela evidencia os parâmetros de peso, consumo de ração, volume urinário, consumo de água e de glicemias, com as respectivas unidades de medida em média ± desvio padrão. Foram calculados no D0 (dia da indução), D8 e D14.

Figura – 19. Alteração de parâmetros fisiológicos após 14 dias de indução diabética



Gráficos esquemáticos representando as comparações entre grupos controle (CTRL) e diabético (DM) nos dias 0, 7 e 14. A) Variação dos valores de peso aferidos em g; B) Variação dos valores de consumo de ração aferidos em g (gramas); C) Variação dos valores de consumo de água aferidos em mL (mililitro); D) Variação dos valores de consumo de água aferidos em mL (mililitro) Variação dos valores de volume urinário aferidos em mL; E) Variação dos valores de glicemia aferidos em g/dL. Os valores são apresentados como média \pm EPM, n=6 (controles), n= 10 (diabéticos); * P<0,05; 2 way ANOVA Bonferroni.

6.2.2. Avaliação da composição corporal de CTRL e DM

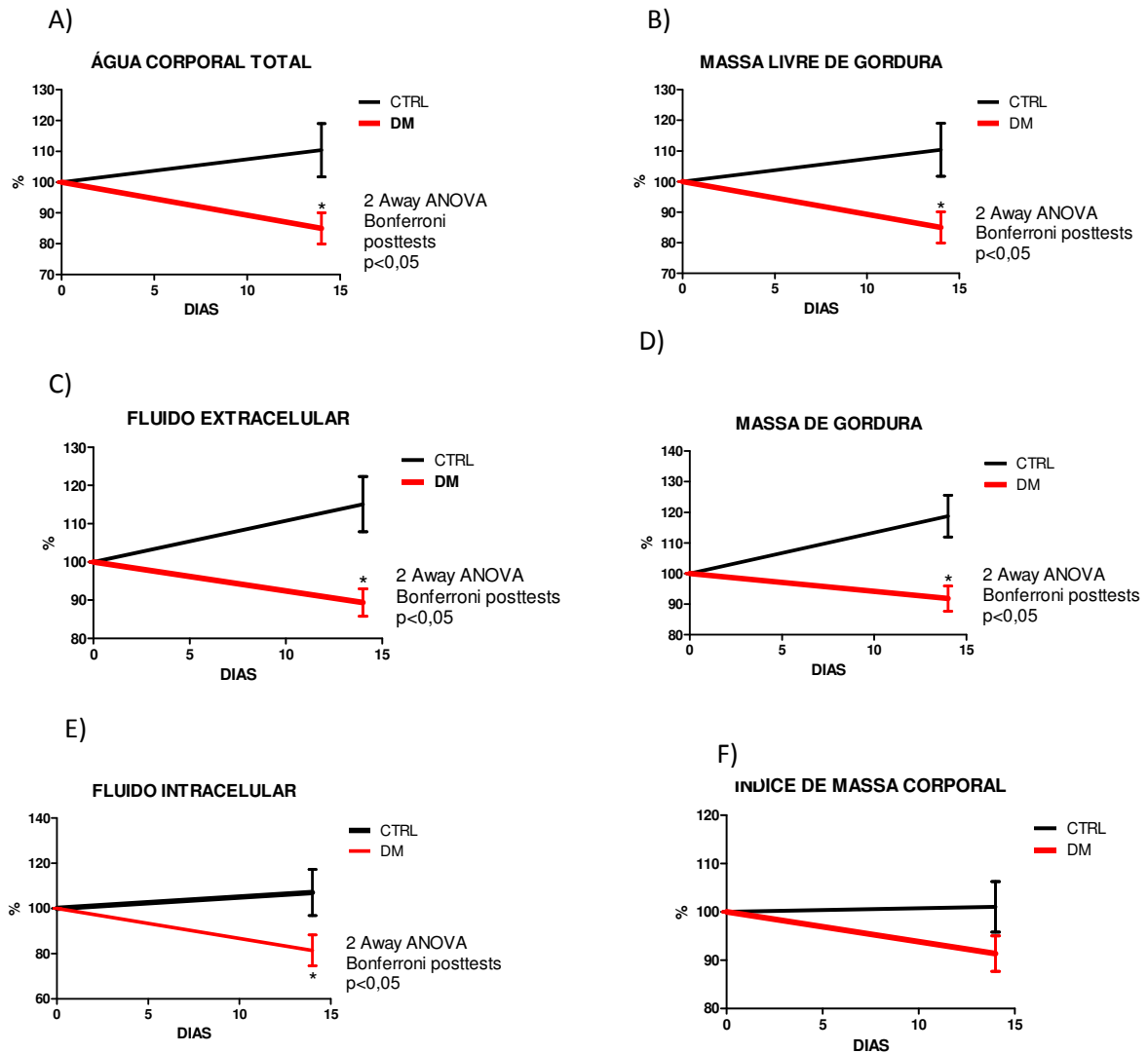
Os dados de impedanciometria foram realizados logo antes da indução diabética (D0) e no D14. Fica evidente uma maior perda de água corporal dos animais diabéticos, corroborado com a polidipsia apresentada. Um estado de hipercatabolismo é sugerido devido uma maior perda de massa magra livre de gordura e de massa de gordura dos animais diabéticos em relação aos controles, conforme fica evidenciado na TABELA 6 e FIGURA 20.

Tabela – 6. Comparação entre valores brutos de bioimpedanciometria em animais controles e diabéticos no D14

PARÂMETROS	CONTROLE	DIABÉTICO	P VALUE
Água corporal total (ml)	133,57 \pm 10,68	↓ 102,68 \pm 21,56	0,0137
Fluido Extracelular (ml)	60,17 \pm 4,98	↓ 48,14 \pm 6,9	0,0023
Fluido Intracelular (ml)	73,4 \pm 6,0	↓ 54,52 \pm 14,99	0,0419
Massa Livre de Gordura (g)	182,47 \pm 14,59	↓ 140,27 \pm 29,45	0,0137
Massa de Gordura (g)	97,32 \pm 11,88	↓ 77,86 \pm 7,93	0,0018
Índice de Massa Corporal	10,25 \pm 0,4	8,75 \pm 0,94	P > 0.05

Tabela evidenciando a comparação dos valores brutos de bioimpedanciometria entre animais controles e diabéticos. Água corporal total valor em ml; Fluido extracelular valor em ml; fluido intracelular valor em ml; Massa livre de gordura –valor em g; Massa de gordura - valor em g; Índice de massa corporal . P value representando a significância após a aplicação de teste estatístico 2 way ANOVA Bonferroni.

Figura – 20. Análise da composição corporal de ratos controles e diabéticos nos dias D0 e D14



Gráficos representando as comparações entre grupos controle (CTRL) e diabético (DM) nos dias 0 e 14. A) Água Corporal Total . Percentual de alteração de água corporal total do dia 0 (100%) para o dia 14; ;B) Massa Livre de Gordura. Percentual de alteração da massa livre de gordura do dia 0 (100%) para o dia 14; C) Fluido Extracelular. Percentual de alteração do fluido extracelular total do dia 0 (100%) para o dia 14; D) Massa de gordura. Percentual de alteração da massa de gordura do dia 0 (100%) para o dia 14; E) Fluido Intracelular. Percentual de alteração do fluido intracelular total do dia 0 (100%) para o dia 14; F) Índice de Massa Corporal. Percentual de alteração da massa de gordura do dia 0 (100%) para o dia 14 Os valores são apresentados como média \pm EPM da percentagem, n=6 (controles), n= 10 (diabéticos);* P<0,001; 2 way ANOVA Bonferroni.

6.3. Avaliação da lesão da barreira morfofuncional intestinal em modelo animal de DM1

6.3.1. Avaliação morfológica do intestino delgado entre animais CTRL e DM

As medidas de comprimento de vilos e criptas quantificados, evidenciou que o grupo DM apresentou hipertrofia de vilos e criptas dos três segmentos conforme apresentado na TABELA 7 e na figura 21, 22 e 23.

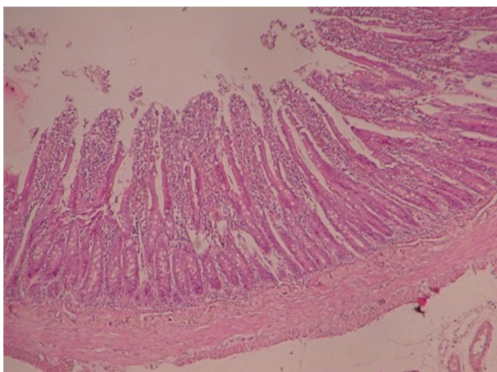
Tabela – 7. Morfometria de vilos e criptas de segmentos do intestino delgado medida no dia 14 após indução diabética

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
Duodeno vilos 10^{-3} μm	3,631 \pm 0,08093 N=54	↑ 5,632 \pm 0,09911 N=60	<0.0001
Jejuno vilos 10^{-3} μm	3,474 \pm 0,06280 N=60	↑ 6,904 \pm 0,2141 N=60	<0.0001
Íleo vilos 10^{-3} μm	2,592 \pm 0,06089 N=60	↑ 4,668 \pm 0,08222 N=60	<0.0001
Duodeno cripta 10^{-3} μm	2,114 \pm 0,05691 N=60	↑ 2,607 \pm 0,07001 N=57	<0.0001
Jejuno cripta 10^{-3} μm	1,702 \pm 0,04022 N=60	↑ 2,425 \pm 0,07108 N=57	<0.0001
Íleo cripta 10^{-3} μm	1,502 \pm 0,03288 N=60	↑ 2,351 \pm 0,04708 N=60	<0.0001

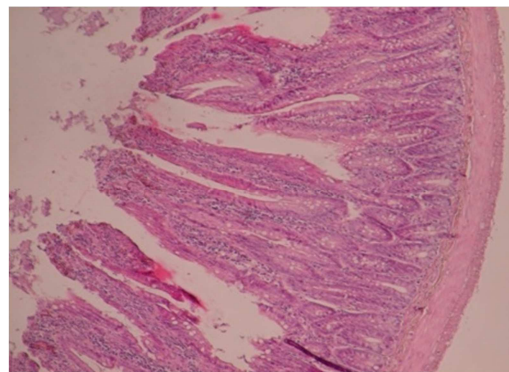
Tabela apresentando os 3 segmentos do intestino delgado: duodeno, jejuno e íleo e as medidas de vilos e criptas de animais controles e diabéticos. Escala de 10^{-3} μm ; N= número de medidas dos seguimentos; Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM. P value apresentando os valores de significância após aplicação de teste estatístico Mann Whitney, exceto para as medidas de cripta do duodeno que foi Test t.

Figura –21. Morfometria de vilos e criptas do duodeno de animais CTRL x DM1

A) Duodeno – CTRL



B) Duodeno – DM1



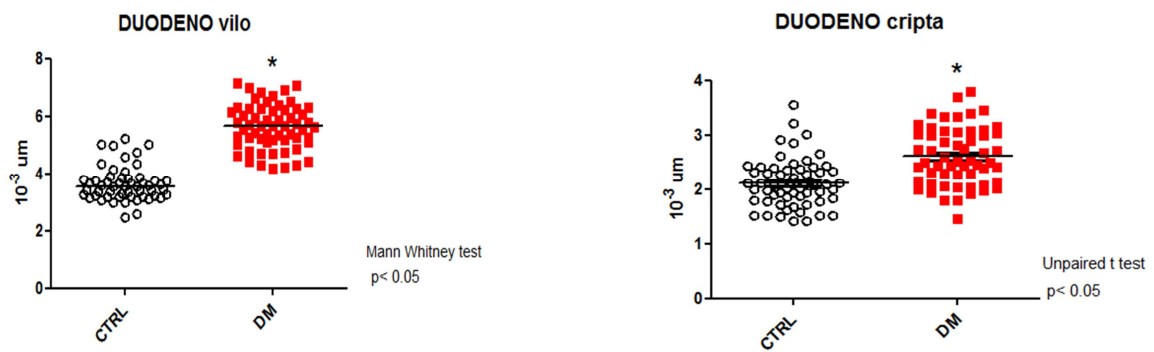


Figura evidenciando foto de lâmina de morfometria, corada pelo método de Hematoxilina e eosina, e fotografada para apresentar um corte histológico apresentando os vilos e criptas do segmento do duodeno. Logo abaixo, apresentando respectivamente os gráficos comparativos do comprimento de vilos e criptas de animais controles e diabéticos. Apresentado as medianas para dados não paramétricos e EPM para os dados paramétricos; e escala de $10^{-3} \mu\text{m}$. Aplicado teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos e Test T Student para os dados paramétricos os valores de medianas e médias respectivamente. .* $P < 0,05$; dados não pareados

Figura –22. Morfometria de vilos e criptas do jejuno de animais CTRL x DM1

A) Jejuno – CTRL

B) Jejuno – DM1

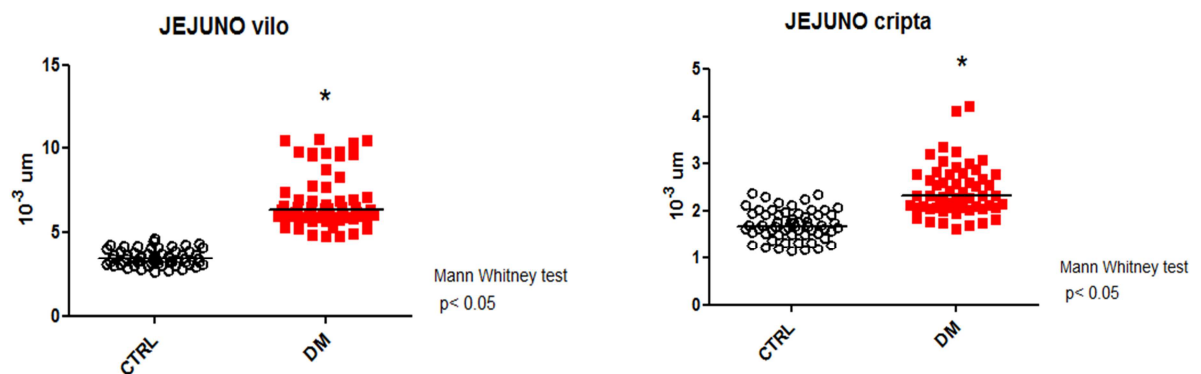
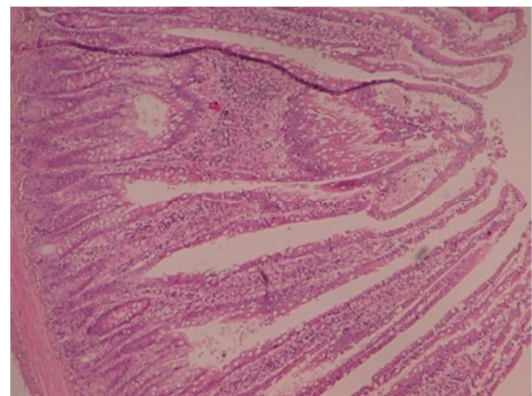
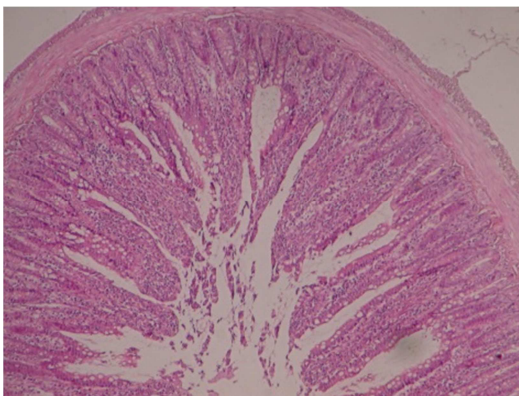


Figura evidenciando foto de lâmina de morfometria, corada pelo método de Hematoxilina e eosina, e fotografada para apresentar um corte histológico apresentando os vilos e criptas do segmento do jejuno. Logo abaixo, apresentando respectivamente os gráficos comparativos do comprimento de vilos e criptas de animais controles e diabéticos. Apresentado as medianas e escala de $10^{-3} \mu\text{m}$. aplicado teste de Mann

Whitney para os dados não paramétricos e comparando os valores de medianas. .* P<0,05; dados não pareado

Figura –23. Morfometria de vilos e criptas do íleo de animais CTRL x DM1

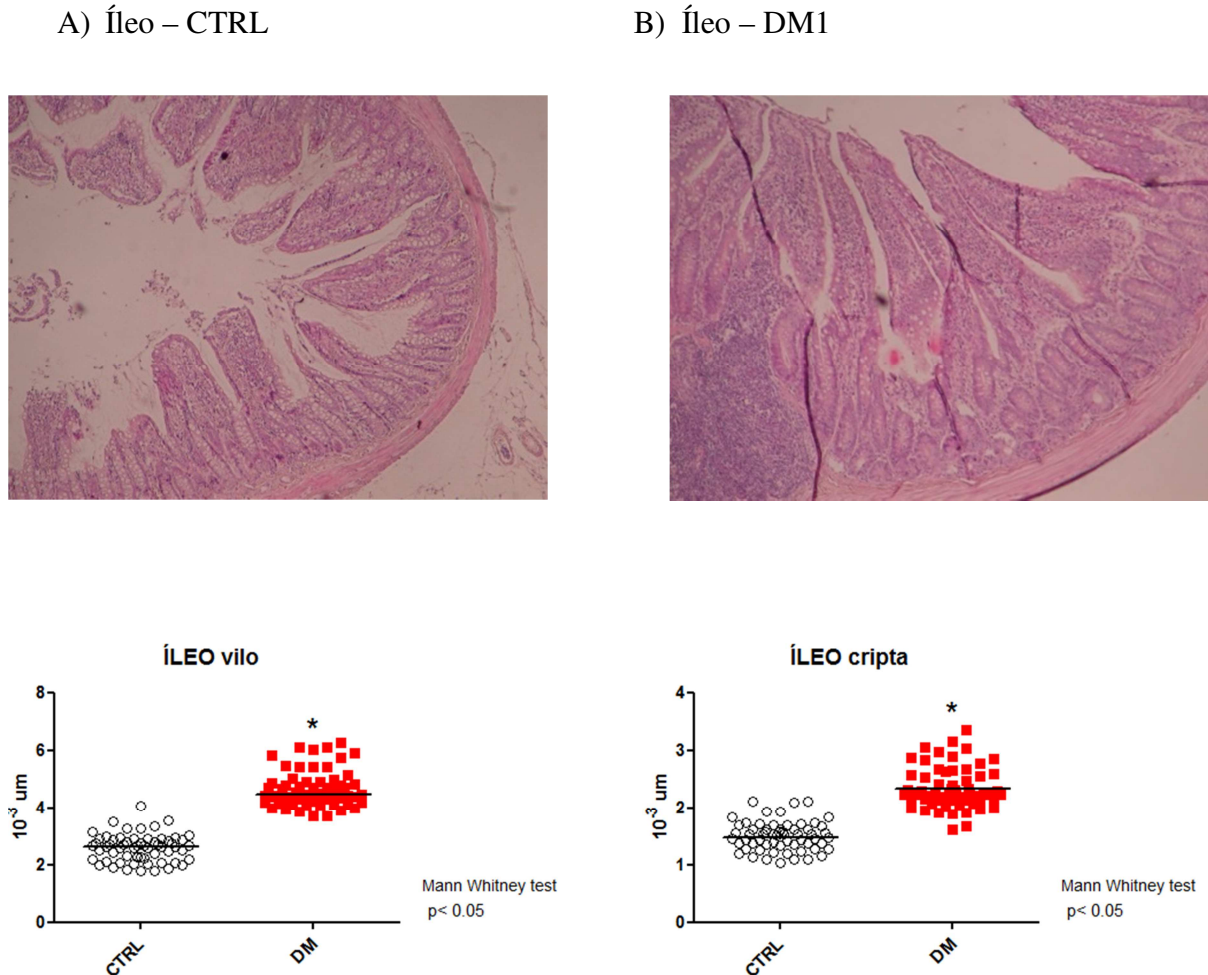


Figura evidenciando foto de lâmina de morfometria, corada pelo método de Hematoxilina e eosina, e fotografada para apresentar um corte histológico apresentando os vilos e criptas do segmento do jejuno. Logo abaixo, apresentando respectivamente os gráficos comparativos do comprimento de vilos e criptas de animais controles e diabéticos. Apresentado as medianas e escala de 10-3 μm. aplicado teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos e comparando os valores de medianas. .* P<0,05; dados não pareados.

6.3.2. Medida da permeabilidade intestinal de CTRL x DM1

A partir do dia 12 (D12), os animais foram deixados nas gaiolas metabólicas com uma dieta pobre em carboidratos até o dia 14. Logo, receberam, por via gavagem, uma solução de lactulose/manitol na concentração de 250/50 mg/ml. Em um período de jejum alimentar de 12h foi coletado neste interim amostra de urina de cada animal. Retirado 50μL desta amostra e analisado por método de cromatografia líquida, no HPLC. Assim, este método

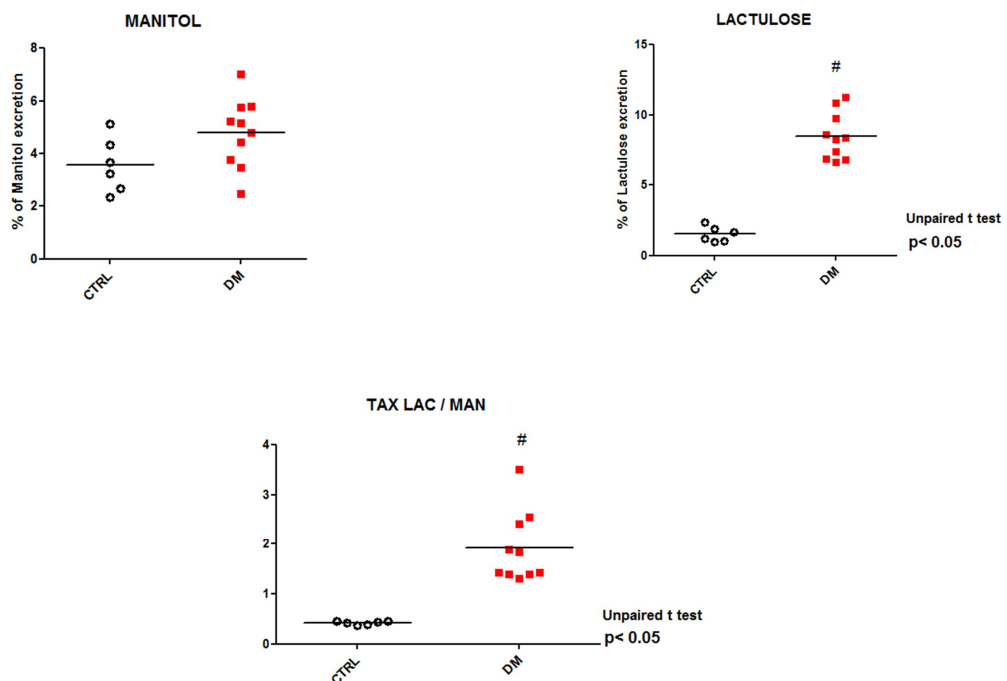
evidenciou uma maior taxa de excreção de lactulose pelos diabéticos e uma maior relação da excreção de lactulose/manitol neste grupo em relação aos controles, de acordo com o exposto na TABELA 8 e FIGURA 24.

Tabela 8 - Quantificação do percentual de excreção de sacarídeos de ratos controles e diabéticos no D14

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
LACTULOSE %	1,510 ± 0,2218 N=6	↑ 8,502 ± 0,5271 N=10	<0.0001
MANITOL %	3,559 ± 0,4250 N=6	4,784 ± 0,4169 N=10	0,0735
TAX. LAC/MAN	0,4183 ± 0,01474 N=6	↑ 1,916 ± 0,2258 N=10	0,0002

Tabela apresentando os percentuais de excreção de sacarídeos utilizados para a avaliação da permeabilidade intestinal. Dissacarídeo: Lactulose; Monossacarídeo: Manitol; valores expressos em percentual. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM. P value apresentando os valores de significância após aplicação de teste estatístico: test t de Student.

Figura – 24. Alteração da permeabilidade intestinal em animais controle e diabéticos a partir do D14 da indução diabética



Gráficos esquemáticos representando as comparações entre grupos controle (CTRL) e diabético (DM) no dia 14. A) percentual de excreção de lactulose; B) percentual de excreção de manitol; C) Taxa de excreção de lactulose em relação ao manitol. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM.* P<0,05; dados não pareados, test t de Student

A utilização de método estatístico evidencia uma correlação de moderada a forte entre os valores de glicemia já no D7 e as alterações de permeabilidade intestinal encontradas ao final da linha de tempo experimental, de acordo com os QUADROS DE ANÁLISES 1 e 2.

Quadro de Análise – 1. Correlação entre os valores de glicemia no D7 e a relação Lactulose / manitol excretado no D14

Correlações

			Taxa L/M (% Exc)	GLIC D7
rô de Spearman	Taxa L/M (% Exc)	Coefficiente de Correlação	1,000	,567*
		Sig. (2 extremidades)	.	,022
		N	16	16
	GLIC D7	Coefficiente de Correlação	,567*	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,022	.
		N	16	16

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de glicemia aferidos no D7, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com os valores de relação de percentual de excreção de Lactulose / manitol no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação positiva, moderada com o valor de 567 e um p= 0,022.

Quadro de Análise – 2 Correlação entre os valores de glicemia no D7 e a excreção de lactulose no D14

Correlações

			GLIC D7	Lac % Exc
rô de Spearman	GLIC D7	Coefficiente de Correlação	1,000	,667**
		Sig. (2 extremidades)	.	,005
		N	16	16
	Lac % Exc	Coefficiente de Correlação	,667**	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,005	.
		N	16	16

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de glicemia aferidos no D7, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com os valores de percentual de excreção de Lactulose no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação positiva, moderada com o valor de 667 e um p= 0,005.

Fica também evidenciado, através do QUADRO DE ANÁLISE 3, que há uma correlação positiva, moderada a forte, entre a taxa de excreção de Lactulose e o balanço nitrogenado, sugerindo que uma maior taxa de excreção de Lactulose, maior será a perda nitrogenada, maior será a permeabilidade paracelular.

Quadro de Análise – 3. Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e a excreção de lactulose no D14

			BN2	Lac % Exc
rô de Spearman	BN2	Coefficiente de Correlação	1,000	-,879**
		Sig. (2 extremidades)	.	,000
		N	16	16
	Lac % Exc	Coefficiente de Correlação	-,879**	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,000	.
		N	16	16

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores balanço nitrogenado no D14, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com os valores de percentual de excreção de Lactulose no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação negativa, FORTE com o valor de 879 e um p= 0,005.

6.3.3. Alteração da dinâmica de absorção hidroeletrólítica intestinal

A partir do D14, os animais foram deixados em jejum e com água ad libitum. Após a indução do plano anestésico, deu-se início ao procedimento cirúrgico para a canulação de 30 cm de íleo e perfusão com solução de ringer lactato com 100 min e coleta de amostras do perfusato a cada 20min. Os parâmetros aferidos de excreção intestinal de sódio, cloro, potássio e osmolaridade do perfusato foram contabilizados por espectrofotometria.

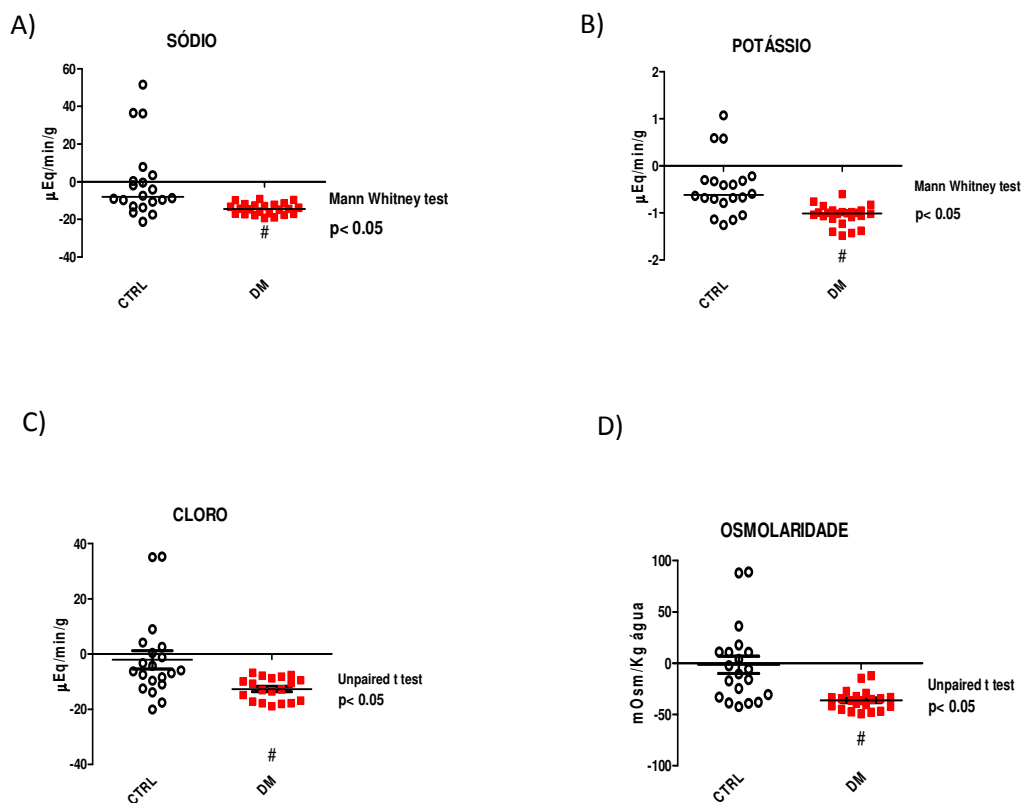
Foi evidenciando que nos animais diabéticos houve uma maior excreção intestinal de eletrólitos e uma diminuição da osmolaridade do perfusato, caracterizando uma maior perda de água, reduzindo assim a concentração da solução final, conforme TABELA 9 e FIGURA 25.

Tabela – 9. Avaliação do transporte hidroeletrólítica entre controle e diabético por perfusão intestinal

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
Na ⁺ mEq/min/g	-0,3564 ± 4,383 N=6	↓ -14,42 ± 0,6168 N=6	0,0003
K ⁺ mEq/min/g	-0,4553 ± 0,1351 N=6	↓ -1,052 ± 0,04292 N=6	0,0002
CL ⁻ mEq/min/g	-2,129 ± 3,264 N=6	↓ -12,73 ± 0,9536 N=6	0,0042
OSM mOsm/Kg água	-1,526 ± 8,454 N=6	↓ -36,07 ± 2,138 N=6	0,0002

Tabela comparando valores representativos das variações hidroeletrólíticas entre controles e diabéticos. N= 6 animais por grupo. Eletrólitos N⁺, K⁺, Cl⁻ medidos em mEq/min/g e Osmolaridade em mOsm/Kg de água. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM. P Value apresentando as significâncias após avaliação estatística para grupos não pareados. N⁺ e K⁺ Mann Whitney; Cl⁻ e Osm, Test t.

Figura – 25. Quantificação do transporte hidroeletrólítico no íleo intestinal de ratos controles e diabéticos pelo método de perfusão intestinal no D14



Gráficos esquemáticos representando as comparações entre grupos controle (CTRL) e diabético (DM) no dia 14, após protocolo de perfusão intestinal com solução de Ringer. Apresentando gráficos representativos do transporte de eletrólitos: A) Sódio, B) Potássio e C) Cloro em mEq/min/g. D) Gráfico de alteração da osmolaridade em mOsm/Kg água. Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM, avaliação estatística para grupos não pareados # $p < 0,05$ A e B Mann Whitney; C e D Test t.

6.3.4. Efeito da hiperglicemia no estresse oxidativo de segmento de intestino delgado de ratos CTRL e DM1

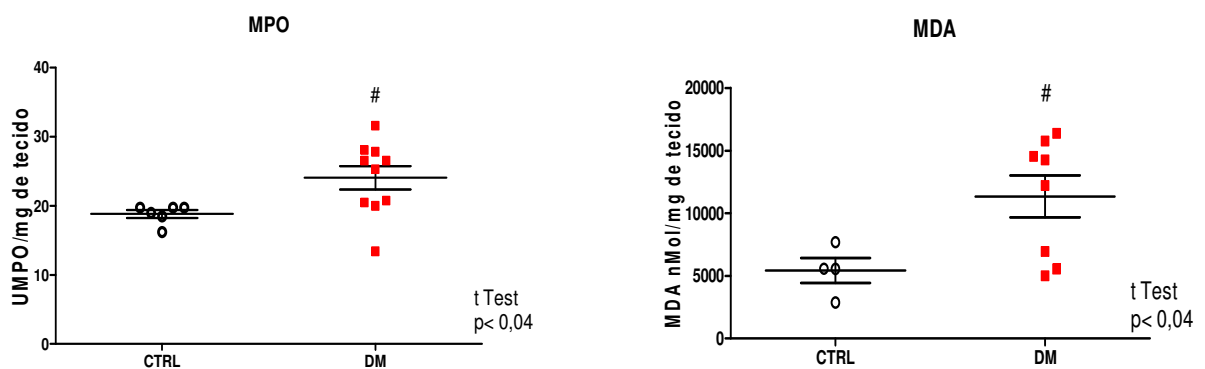
Após 14 dias de indução diabética, o segmento de íleo de animais controles e diabéticos foi selecionado para avaliação de estresse oxidativo. Os resultados evidenciam um aumento da atividade da mieloperoxidase e aumento na concentração de malandialdeído no intestino de animais diabéticos. A concentração de glutaciona reduzida foi menor significativamente nos diabéticos em relação aos animais controles, segundo o que é apresentado na TABELA 10 e na FIGURA 26.

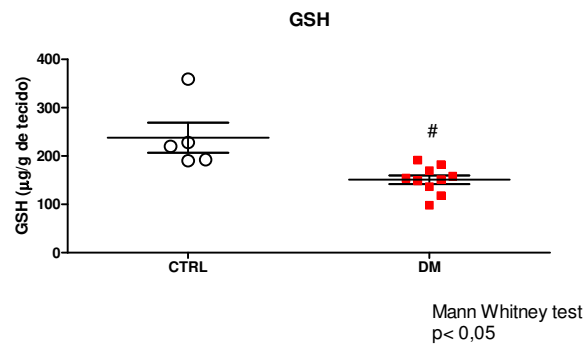
Tabela - 10. Comparativo na alteração do estresse oxidativo e da inflamação em segmento de intestino delgado de animais CTRL x DM1 no D14

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
UMPO/mg de tecido	18,79 ± 0,5641N=6	↑ 24,05 ± 1,684 N=10	<0.0001
MDA nMol/mg de tecido	5430 ± 987,2 N=6	↑ 11333 ± 1676 N=10	0,0410
GSH (mg/g de tecido)	238,0 ± 31,14N=5	↓ 151,0 ± 8,907N=10	0,0002

Tabela evidenciando os valores obtidos após as reações enzimáticas de expressão alteração em Unidade de Mieloperoxidase (UMPO)/mg de tecido; concentração de Malandialdeído (MDA) em mmol/mg de tecido; concentração de glutaciona reduzida (GSH) em mg/ g de tecido. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM, avaliação estatística para grupos não pareados # p<0,05 GSH avaliado pelo teste de Mann Whitney; MPO e MDA avaliados por Test t.

Figura - 26. Inflamação e estresse oxidativo em segmento de íleo de CTRL x DM1





Gráficos representando as comparações entre grupos controle (CTRL) e diabético (DM) no dia 14. A) Grau de atividade da Mieloperoxidase (MPO) em UMPO/mg de tecido; B) Medida de malondialdeído (MDA) em nMol/mg de tecido; C) concentração de glutathiona reduzida (GSH) em µg/g de tecido. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM.* P<0,05; dados não pareados, test t de Student. Dados não paramétricos avaliados pelo teste de Mann Whitney

Através de artifícios estatísticos pelo software SPSS, foi possível correlacionar parâmetros de estresse oxidativo com valores de glicemia, balanço nitrogenado e medidas de permeabilidade intestinal. Através dos quadros de análise seguintes, é possível inferir que quanto maiores os valores de glicemia aferidos no D7 após a indução diabética, maior a atividade da mieloperoxidase e menor a concentração de glutathiona reduzida no segmento de íleo (QUADROS DE ANÁLISES 4 e 5). Da mesma forma, que quanto maior o estado catabólico representado pelo balanço nitrogenado negativo, maior a atividade de MPO e menor a concentração de GSH (QUADROS DE ANÁLISES 6 e 7).

A correlação do processo inflamatório com a permeabilidade intestinal sugeriu uma correlação moderada, positiva, entre a taxa de excreção de lactulose e a atividade da MPO. Assim como, uma correlação negativa entra a excreção do dissacarídeo e a concentração de GSH, como fica evidente pelos QUADROS DE ANÁLISES 8 e 9.

Quadro de análise – 4. Correlação entre os valores de glicemia no D7 e MPO no D14

Correlações

			GLIC D7	MPO
rô de Spearman	GLIC D7	Coefficiente de Correlação	1,000	,824**
		Sig. (2 extremidades)	.	,000
		N	16	16
	MPO	Coefficiente de Correlação	,824**	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,000	.
		N	16	16

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de glicemia no D7, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com a atividade da mieloperoxidase (MPO) no D14. Foi adotado o método de rô

de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação positiva, FORTE com o valor de 829 e um $p < 0,001$.

Quadro de análise – 5. Correlação entre os valores de glicemia no D7 e GSH no D14

			GLIC D7	GSH
rô de Spearman	GLIC D7	Coefficiente de Correlação	1,000	-,754**
		Sig. (2 extremidades)	.	,001
		N	16	15
	GSH	Coefficiente de Correlação	-,754**	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,001	.
		N	15	15

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de glicemia no D7, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com a concentração de glutatona reduzida (GSH) no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação NEGATIVA, moderada com o valor de 754 e um $p = 0,001$.

Quadro de análise – 6. Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e atividade da mieloperoxidase no intestino delgado

			BN2	MPO
rô de Spearman	BN2	Coefficiente de Correlação	1,000	-,735**
		Sig. (2 extremidades)	.	,002
		N	16	15
	MPO	Coefficiente de Correlação	-,735**	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,002	.
		N	15	15

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de balanço nitrogenado no D14, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com a atividade da mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado, porção ileal no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação NEGATIVA, moderada com o valor de 735 e um $p = 0,002$.

Quadro de análise – 7. Correlação entre os valores de balanço nitrogenado e a concentração de glutatona reduzida no intestino delgado

			BN2	GSH
rô de Spearman	BN2	Coefficiente de Correlação	1,000	,530
		Sig. (2 extremidades)	.	,051
		N	16	14
	GSH	Coefficiente de Correlação	,530	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,051	.
		N	14	14

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de balanço nitrogenado no D14, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com a concentração de glutatona reduzida (GSH) na porção ileal tanto de animais controles quanto diabéticos no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Não houve diferença estatística, pois $p=0,51$.

Quadro de análise – 8. Correlação entre a atividade de mieloperoxidase e a excreção de lactulose no D14

			MPO	Lac % Exc
rô de Spearman	MPO	Coefficiente de Correlação	1,000	,691**
		Sig. (2 extremidades)	.	,004
		N	15	15
	Lac % Exc	Coefficiente de Correlação	,691**	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,004	.
		N	15	16

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores de excreção de lactulose no D14, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com a atividade da mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado, porção ileal no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação positiva, moderada com o valor de 691 e um $p=0,004$.

Os gráficos respectivos aos quadros de análises apresentado podem ser visualizados no APÊNDICE II.

Quadro de análise – 9. Correlação entre os valores da concentração de GSH e a excreção de lactulose no D14

			Lac % Exc	GSH
rô de Spearman	Lac % Exc	Coefficiente de Correlação	1,000	-,587*
		Sig. (2 extremidades)	.	,027
		N	16	14
	GSH	Coefficiente de Correlação	-,587*	1,000
		Sig. (2 extremidades)	,027	.
		N	14	14

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

Tabela apresentando os dados de correlação entre os valores da taxa de excreção de lactulose no D14, tanto de animais CTRL, quanto de animais DM e a sua relação com a concentração de glutatona reduzida (GSH) no intestino delgado, porção ileal no D14. Foi adotado o método de rô de Spearman após o teste de normalidade de Komogorov/Sminorff. Identificado uma correlação NEGATIVA, moderada com o valor de 587 e um $p=0,027$.

6.4. Efeito da hiperglicemia sobre a transcrição gênica

6.4.1. Avaliação da transcrição gênica de proteínas de junções firmes de CTRL x DM1

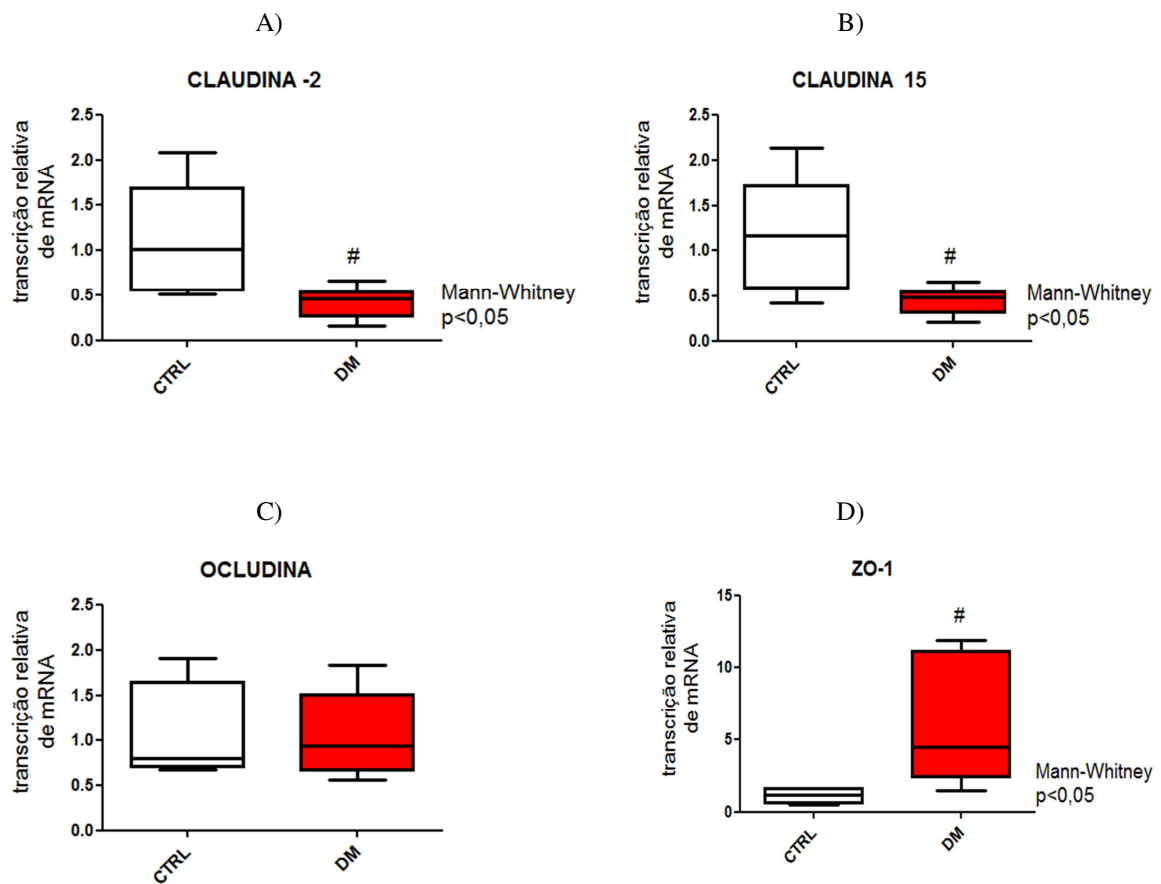
As proteínas de junção firme analisadas: ZO-1, Ocludina, Claudina 2 e Claudina 15 evidenciaram que as duas primeiras não diferiram significativamente entre os grupos CTRL x DM. Entretanto, houve uma expressão diminuída das duas últimas no grupo DM, conforme mostrado na figura 27 e resumindo na TABELA 11.

Tabela – 11. Avaliação comparativa da transcrição gênica de proteínas componentes das junções firmes em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
Claudina – 2	1,155 ± 0,2417	↓ 0,4027 ± 0,05541	0,0042
Claudina – 15	1,153 ± 0,2920	↓ 0,4373 ± 0,05847	0,0175
Ocludina	1,093 ± 0,2407	1,059 ± 0,1946	> 0,9999
ZO-1	1,114 ± 0,2719	↑ 5,958 ± 1,788	0,0381

Tabela evidenciando os valores brutos da transcrição de genes de proteínas de junções firmes: Claudina 2, Claudina 15, Ocludina e ZO-1. Os valores são apresentados como média ± EPM. P Value apresentando as significâncias após avaliação estatística para grupos não pareados. Mann-Whitney

Figura – 27. Quantificação da transcrição gênica de proteínas componentes das junções firmes em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14



Gráficos apresentando comparação da transcrição gênica de proteínas de junções firmes entre grupo CTRL x DM. A) Expressão de Claudina 2. CTRL ($1,155 \pm 0,2417$), DM ($0,4027 \pm 0,05541$). B) Expressão de Claudina 15. CTRL ($1,155 \pm 0,2417$), DM ($0,4027 \pm 0,05541$). C) Expressão de Ocludina. D) Expressão de Zona –Ocludina (ZO-1). Os valores são apresentados como média \pm EPM. P Value apresentando as significâncias após avaliação estatística para grupos não pareados. # $p < 0,05$. A e B; C e D Mann Whitney.

6.4.2. Avaliação da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos entre CTRL x DM

Novamente, o seguimento de íleo foi coletado após o término da linha de tempo e acondicionado em -80°C . As amostras de intestino foram submetidas ao protocolo de extração de DNA e ao processo de transcriptase reversa para quantificação da transcrição dos genes analisados.

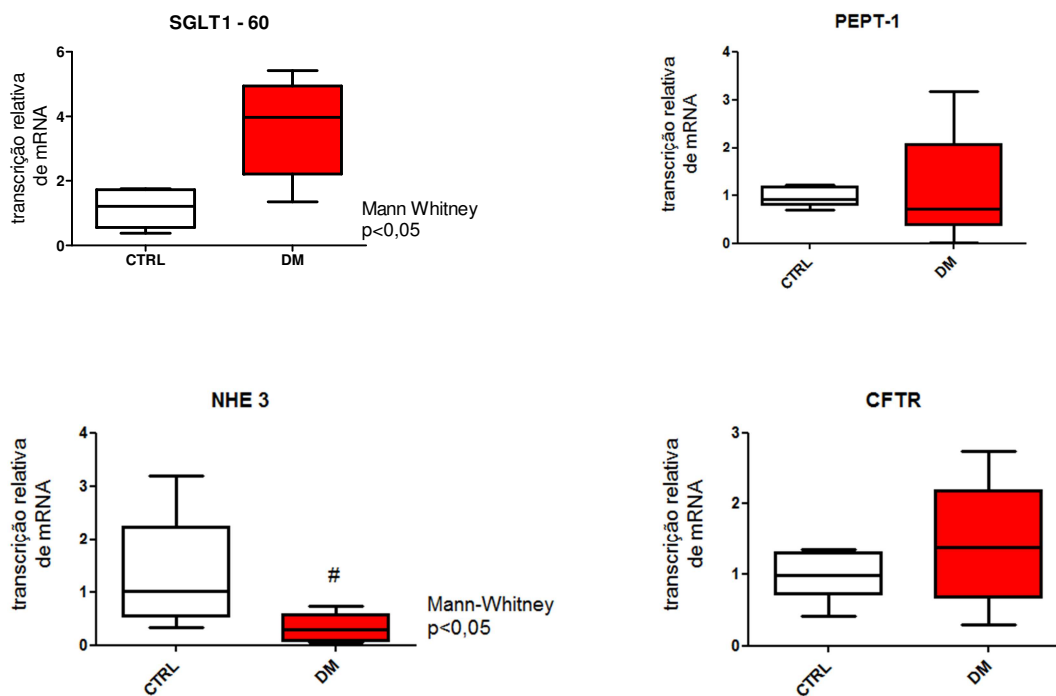
Os genes analisados SGLT-1 (transportador Na/glicose da borda em escova), PEPT-1 (transportador Na/dipeptídeo da borda em escova), NHE₃ (trocaador Na/H localizado na borda em escova nos vilos intestinais) e CFTR (transportador de cloreto localizado na cripta intestinal) tiveram a sua expressão gênica evidenciada na FIGURA 28 e na TABELA 12.

Tabela – 12. Avaliação comparativa da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14

PARÂMETROS	CONTROLES	DIABÉTICOS	P Value
SGLT-1	1,145± 0,2299	↑ 3,654± 0,6908	0,0173
PEPT-1	0,8461± 0,1896	1,935 ± 0,5880	0,4540
NHE3	1,277± 0,3781	↓ 0,4407± 0,1575	0,0451
CFTR	0,9739± 0,1416	1,417 ± 0,3981	0,2877

Tabela evidenciando os valores brutos da transcrição de genes de transportadores transmembrânicos: SGLT-1, PEPT-1, NHE₃ e CFTR. Os valores são apresentados como média ± EPM. P Value apresentando as significâncias após avaliação estatística para grupos não pareados. Mann-Whitney test.

Figura – 28. Quantificação da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos em amostras de íleo de animais CTRL e DM a partir do D14



Gráficos apresentando comparação da transcrição gênica de transportadores transmembrânicos entre grupo CTRL x DM. A) Expressão de SGLT-1). B) Expressão de PEPT-1. C) Expressão de NHE₃. D) Expressão de CFTR. Os valores são apresentados como média ± EPM. P Value apresentando as significâncias após avaliação estatística para grupos não pareados. # $p < 0,05$. A e D Test t; B e C Mann Whitney.

6.5. Avaliação da eficácia de uma solução a base de dipeptídeo na diarreia do diabetes

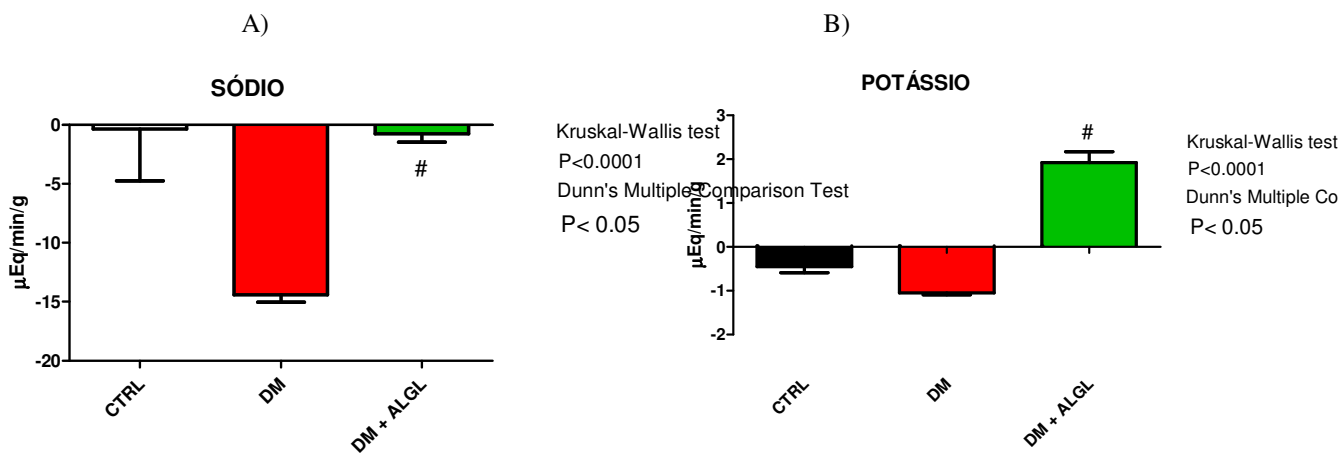
Diante do protocolo de perfusão intestinal instituído, foi utilizada a solução de ringer lactato como solução controle e comparado com uma solução de reidratação a base de alanil-glutamina. De acordo com os dados observados, foi constatado que a solução de ALGLN reduziu a perda hidroeletrolítica, tendo aumentado a absorção de potássio de acordo com a figura 29 e resumido pela tabela 13.

Tabela – 13. Comparação entre solução de Ringer e de Alanil-glutamina na recuperação hidroeletrolítica na diabetes

GRUPO	SÓDIO mEq/min/g	POTÁSSIO mEq/min/g	CLORO mEq/min/g	OSMOLARIDADE mOsm/Kg água
CONTROLE - RINGER N=6	-0,3564± 4,383	-0,4553 ± 0,1351	-2,129 ± 3,264	-1,526 ± 8,454
DIABÉTICO + RINGER N=6	-14,42 ± 0,6168	-1,052 ± 0,04292	-12,73 ± 0,9536	-36,07 ± 2,138
DM + ALGL N=6	-0,7758 ± 0,6841	1,920 ± 0,2509	-0,7096 ± 0,7632	-18,06 ± 1,413

Tabela comparando valores representativos das variações hidroeletrolíticas entre controles e diabéticos perfundidos com solução de Ringer, e grupo diabético perfundido com solução de Alanil Glutamina . N= 6 animais por grupo. Eletrólitos N^+ , K^+ , Cl^- medidos em mEq/min/g e Osmolaridade em mOsm/Kg de água Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM..

Figura – 29. Avaliação da eficácia da solução de Alanil-glutamina na recuperação da perda hidroeletrolítica de animais diabéticos



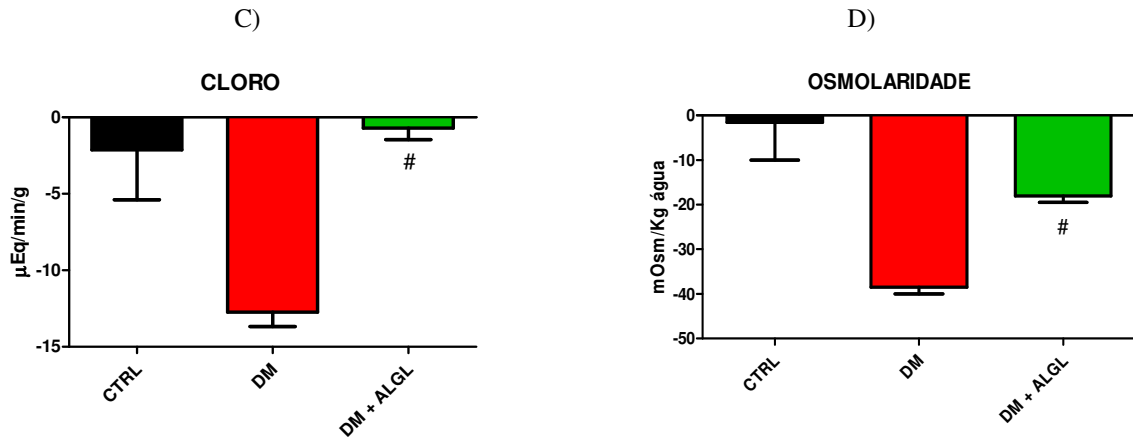


Figura apresentando comparação em grupos: Controle (CTRL) perfundido com solução de Ringer, diabético (DM) perfundido com solução de Ringer e diabético perfundido com solução de Alanil-glutamina (DM+ALGLN). Eletrólitos N^+ , K^+ , Cl^- medidos em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ e Osmolaridade em mOsm/Kg de água. Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados # $p < 0,05$ diferença estatística entre DM+ALGLN e os demais grupos. A e B: Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test; C e D: Bartlett’s test e teste de Bonferroni.

As tabelas das análises estatísticas comparativas entre os grupos com os respectivos valores de p encontram-se no apêndice 4.

6.6. Indução de diarreia pela toxina do cólera e avaliação da eficácia da SRO a base de ALGN

6.6.1. Efeito da indução de diarreia secretória pela toxina do cólera em modelo de diabetes tipo1

Como se pode constatar através da figura 30 e da tabela 14, a toxina do cólera causa uma diarreia secretória de maior intensidade em animais diabéticos, representando uma maior perda dos eletrólitos avaliados, sódio, potássio e cloro, além de um maior volume de perfusato final, tendo uma maior queda na osmolaridade do subproduto coletado.

Observou-se também que não houve diferença estatística entre o grupo CTRL com diarreia secretória induzida pelo cólera e o grupo DM1 sem a presença da toxina. Isso demonstra que a diarreia osmótica decorrente da disfunção intestinal provocada pela hiperglicemia foi tão intensa quanto aquela provocada pela toxina em animais sem diabetes mellitus. As tabelas com as análises estatísticas e os respectivos valores de p encontram-se no apêndice 4.

Tabela – 14. Avaliação da alteração hidroeletrólítica promovida pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos

GRUPO	SÓDIO mEq/min/g	POTÁSSIO mEq/min/g	CLORO mEq/min/g	OSMOLARIDADE mEq/min/g
CONTROLE + RINGER N=6	-0,3564± 4,383	-0,4553 ± 0,1351	-2,129 ± 3,264	-1,526 ± 8,454
CTRL + TOX + RINGER N=6	-16,26 ± 1,626	-1,082 ± 0,09400	-12,88± 1,531	-34,21 ± 3,739
DIABÉTICO + RINGER N=6	-14,42 ± 0,6168	-1,052 ± 0,04292	-12,73 ± 0,9536	-36,07 ± 2,138
DM + TOXINA + RINGER N=6	-43,80 ± 4,809	-2,508 ± 0,2069	-35,97 ± 4,275	-87,82 ± 10,73

Tabela comparando valores representativos das variações hidroeletrólíticas entre animais controle perfundidos com solução de Ringer, animais controles induzido com toxina do cólera e perfundidos com solução de Ringer; animais diabéticos perfundidos com solução de Ringer e animais diabéticos induzido com toxina do cólera e perfundidos com solução de Ringer). N= 6 animais por grupo. Eletrólitos N^+ , K^+ , Cl^- medidos em mEq/min/g e Osmolaridade em mOsm/Kg de água Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM.

Figura – 30. Alteração hidroeletrólítica em modelo de diarreia secretória induzida pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos

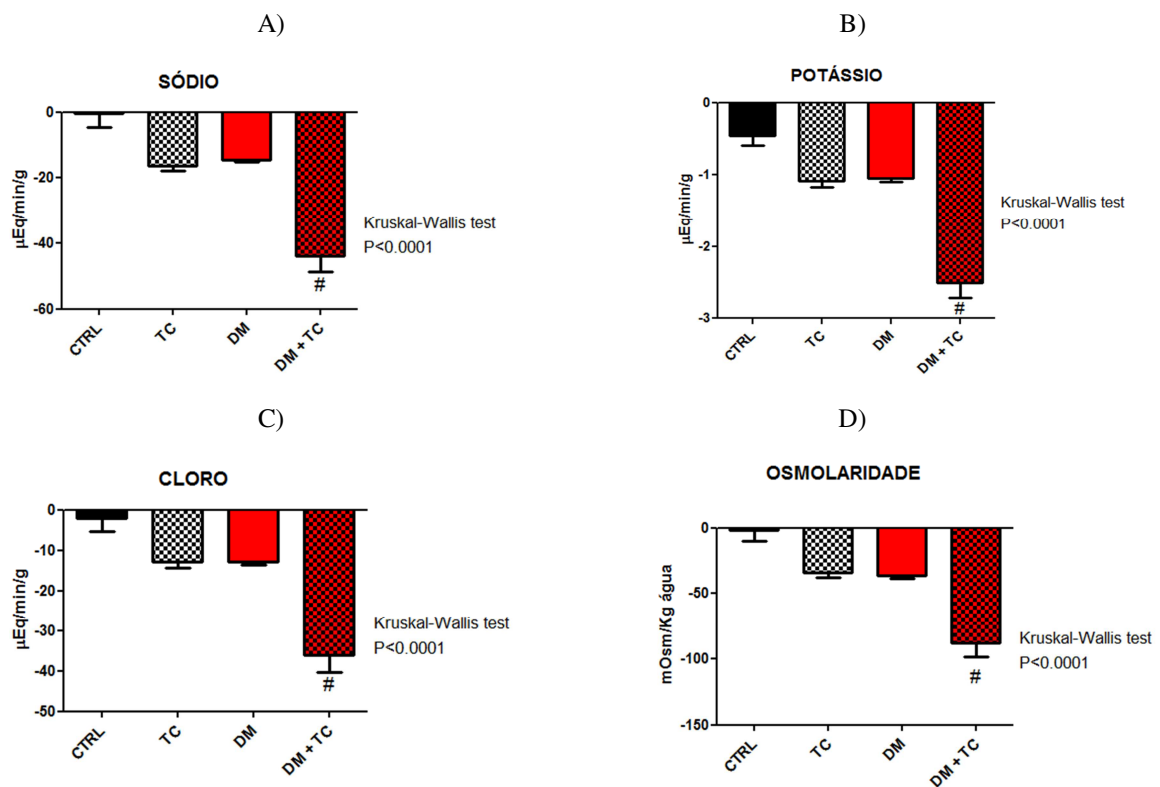


Figura apresentando a comparação entre os seguintes grupos: CTRL (controle perfundido com solução de Ringer); TC (controle induzido com toxina do cólera e perfundido com solução de Ringer); DM (diabético perfundido com solução de Ringer); DM+ TC (diabético induzido com toxina do cólera e perfundido com solução de Ringer). Eletrólitos N^+ , K^+ , Cl^- medidos em mEq/min/g e Osmolaridade em mOsm/Kg de água. Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados # $p < 0,05$ diferença estatística entre DM+TC e os demais grupos. Kruskal – Wallis test, Dunn´s multiple comparison test.

6.6.2. Avaliação da eficácia de solução de reidratação a base de dipeptídeo frente à diarreia secretória induzida pela toxina do cólera em modelo de diabetes

Os grupos de animais controles, que não foram induzidos com STZ, apresentaram recuperação da perda de eletrólitos e água em decorrência da diarreia secretória induzida pela toxina tanto com o uso de solução preconizada pela OMS quanto com à base de ALGLN (vide em APÊNDICE III).

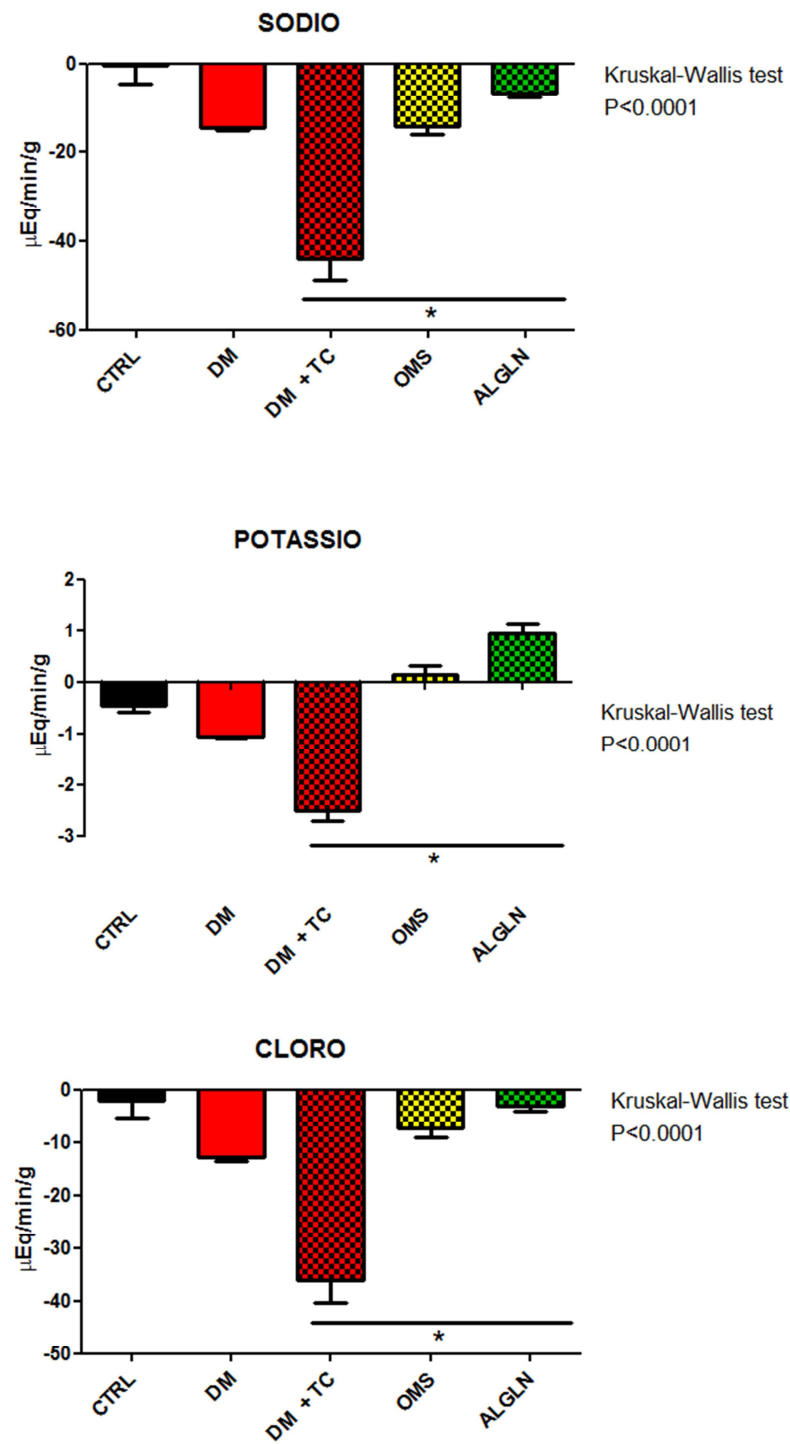
Esta modificação foi mais perceptiva no grupo DM devido este apresentar um quadro diarreico mais expressivo, havendo resposta na diminuição da perda de sódio, potássio e cloreto, além de uma maior osmolaridade da solução do perfusato final, conforme a figura 31 e resumido pela tabela 15.

Tabela – 15. Avaliação da eficácia na recuperação hidroeletrólítica de soluções após indução de diarreia osmótica pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos

GRUPO	SÓDIO mEq/min/g	POTÁSSIO mEq/min/g	CLORO mEq/min/g	OSMOLARIDADE mOsm/Kg água
CONTROLE + RINGER N=6	-0,3564 \pm 4,383	-0,4553 \pm 0,1351	-2,129 \pm 3,264	-1,526 \pm 8,454
DIABÉTICO + RINGER N=6	-14,42 \pm 0,6168	-1,052 \pm 0,04292	-12,73 \pm 0,9536	-36,07 \pm 2,138
DM + TOXINA + RINGER N=6	-43,80 \pm 4,809	-2,508 \pm 0,2069	-35,97 \pm 4,275	-87,82 \pm 10,73
DM+ TOX + OMS N=6	-14,11 \pm 2,003	0,1396 \pm 0,1852	-7,292 \pm 1,816	-31,54 \pm 5,154
DM+TOX+ALGLN N=6	-6,559 \pm 1,127	0,9492 \pm 0,2036	-3,013 \pm 1,020	-21,12 \pm 5,630

Tabela comparando valores representativos das variações hidroeletrólíticas entre animais controle perfundidos com solução de Ringer, diabéticos perfundidos com solução de Ringer, animais diabéticos induzido com toxina do cólera e perfundidos com solução de Ringer; animais diabéticos induzido com toxina do cólera e perfundidos com solução da OMS. animais diabéticos induzido com toxina do cólera e perfundidos com solução de ALGLN. N= 6 animais por grupo. Eletrólitos N^+ , K^+ , Cl^- medidos em mEq/min/g e Osmolaridade em mOsm/Kg de água Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM.

Figura – 31. Avaliação das soluções de reidratação na recuperação hidroeletrólítica após indução de diarreia secretória em animais controles e diabéticos



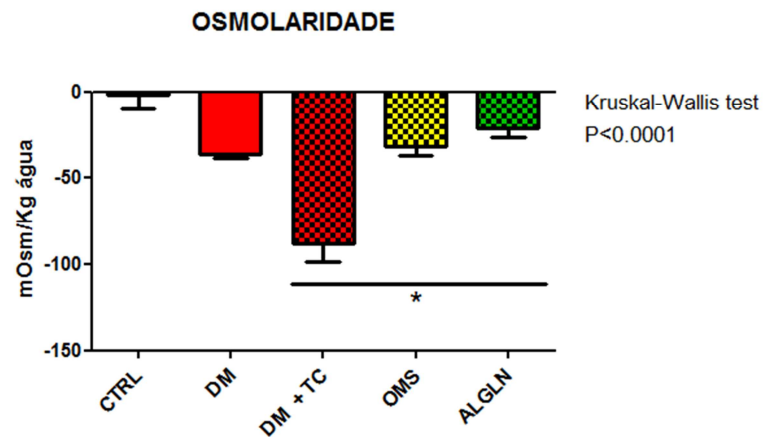


Figura apresentando a comparação entre os seguintes grupos: CTRL (controle perfundido com solução de Ringer); DM (diabético perfundido com solução de Ringer); DM+TC (diabético induzido com toxina do cólera e perfundido com solução de Ringer); OMS (diabético induzido com toxina do cólera e perfundido com solução preconizada pela OMS). ALGLN (diabético induzido com toxina do cólera e perfundido com solução de Alanil-glutamina). Apresentando gráficos representativos do transporte de eletrólitos: A) Sódio, B) Potássio e C) Cloro em mEq/min/g. D) Gráfico de alteração da osmolaridade em mOsm/Kg água. Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média ± EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test.

A solução de ALGLN foi mais efetiva em recuperar as perdas hidroeletrólíticas nos animais diabéticos, havendo uma menor perda de sódio, cloro e menor osmolaridade, além de uma maior absorção de potássio em relação à solução preconizada pela OMS (quadro de estatística apresentado no APÊNDICE III).

7. DISCUSSÃO

7.1. Caracterização da lesão da barreira intestinal desencadeada pela hiperglicemia

Modelos experimentais de diabetes, induzidos quimicamente, são amplamente utilizados em pesquisa científica. Dos mais utilizados, aqueles de maior efetividade são os induzidos por estreptozotocina e por aloxano (DELFINO *et al.*, 2002). A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico que induz diabetes quimicamente através da citotoxicidade em células beta da ilhota de Langerhans. Seu efeito é observado na alteração clínica e laboratorial dos animais induzidos (FURMAN, 2015). Assim, esse processo de lesão celular leva a não produção de insulina e diagnóstico de diabetes tipo 1.

A citotoxicidade decorrente da presença de STZ na corrente sanguínea poderia levar a lesões celulares além das células beta da ilhota pancreática. Contudo, após uma injeção peritoneal, este antibiótico é eliminado após 48 horas, mesmo que as células pancreáticas continuem a sofrer danos posteriormente (WU; YAN, 2015). Desta forma os danos celulares em modelos de diabetes tipo 1 induzidos por STZ estão relacionados ao estado de hiperglicemia (TESCH, ALLEN, 2007).

O modelo experimental deste estudo, que utilizou a STZ como método de indução da diabetes. Os resultados do estudo mostraram que as características clínicas análogas às apresentadas nos pacientes humanos diabéticos foram replicadas no modelo. O diagnóstico de DM1 ficou plenamente confirmado quando as características de poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso foram seguidos de glicemia >200mg/dl aferida sem jejum (SBD, 2017) A apresentação de alterações na glicemia, peso, volume urinário, ingesta alimentar e hídrica apresentados no estudo são dados corroborados pela literatura em modelos de diabetes induzida por estreptozotocina (ROSA *et al.*, 2015).

Diabetes mellitus é umas das patologias crônicas que mais cursam com alterações hidroeletrólíticas. Estas alterações podem ser multifatorial, decorrente de modificações na função renal, uso de múltiplas drogas, distúrbios gastrointestinais e desequilíbrio ácido-básico (ELISAF *et al.*, 1996). Estes distúrbios eletrólíticos, ainda que leves, podem estar associados com mau prognósticos dos pacientes diabéticos (LIAMIS *et al.*, 2013).

Em resumo do que foi achado nos resultados bioquímicos provenientes da coleta de plasma a partir do D14 da linha de tempo experimental, pode-se constatar que houve no grupo DM, em relação ao controle: hiponatremia, hipercalemia, hipermagnesemia, hipoalbuminemia e elevação da ureia.

Diante de um quadro de hiperglicemia descompensada, a hiponatremia pode ser um achado possível e de provável origem diluicional (LIAMIS *et al.*, 2014). Na prática clínica, em pacientes portadores de hiperglicemia que estão evoluindo com hiponatremia, deve-se aplicar uma fórmula matemática de correção do sódio que é calculado pela adição de $[Na^+]$ 1,6 mmol / L por cada incremento de 100 mg / dL (5,55 mmol / L) de glicose no soro acima normal; um fator de correção de 2,4 mmol / L é utilizado quando as concentrações séricas de glicose são superiores a 400 mg / dL (22,2 mmol / L) (LIAMIS; MILIONIS; ELISAF, 2011).

Além do fator diluicional que justifique a redução na concentração plasmática de sódio no diabetes, sabe-se que esta é uma doença crônica que pode cursar *per se* com a presença de hiponatremia (BEUKHOF *et al.*, 2013). Estudo clínico recente, que utilizou um n superior a 5000 pacientes portadores de diabetes, a hiponatremia estava associada a DM (Odds Ratio = 1,98; Intervalo de Confiança 95%: 1,47-2,68 (LIAMIS *et al.*, 2013).

A hipercalemia (aumento da concentração sérica de potássio) é um distúrbio eletrolítico significativo nos pacientes diabéticos. A incidência de hiperpotassemia é maior nos pacientes diabéticos do que na população geral (PALMER, 2004). No contexto da DM, o aumento da concentração sérica do potássio pode ser decorrente de acidose metabólica, lise celular (exemplo da lise de células musculares – proteólise muscular), hipoinsulinemia e o uso de fármacos (LIAMIS *et al.*, 2014). No entanto, o fator causal mais comum da hipercalemia crônica em diabéticos é a secreção tubular reduzida de K^+ devido à síndrome do hipoaldosteronismo hiporreninêmico (DE FRONZO, 1980).

O magnésio é essencial para que numerosas reações enzimáticas possam transcorrer adequadamente, incluindo o uso de ATP, membrana celular, canais iônicos e função mitocondrial, bem como a síntese proteica. Além disso, a insulina promove a transição de Mg^{2+} do espaço extracelular ao intracelular (LIAMIS *et al.*, 2014).

No presente estudo, os resultados evidenciaram a presença de uma hipermagnesemia (aumento da concentração de magnésio) em relação aos controles. A literatura mostra que na diabetes pode ser mais comum encontrar uma baixa concentração deste eletrólito (PHAM *et al.*, 2007). Esta hipomagnesemia pode ser decorrente de perdas gastrointestinais (LIAMIS *et al.*, 2014). Entretanto, a hipermagnesemia (aumento da concentração de magnésio sérico) pode estar relacionado com pacientes criticamente enfermos, aumentando a morbimortalidade (HAIDER *et al.*, 2015). A correlação com os dados encontrados pode estar referente ao momento da coleta da amostra de sangue que foi feito a aferição. Os animais tinham sido submetidos ao procedimento de perfusão com ringer,

logo antes do sacrifício a amostra sanguínea foi coletada de grandes vasos. Desta forma, o estresse relacionado ao procedimento cirúrgico pode ter sido um fator que tenha alterado momentaneamente a concentração do magnésio.

A investigação laboratorial, composta principalmente pelas proteínas plasmáticas (albumina, transferrina e pré-albumina), é ferramenta utilizada em diversas patologias para monitoração da resposta metabólica e nutricional (BERBEL *et al.*, 2011). A albumina, conhecido marcador clássico de desnutrição tem sido usada como preditor de mortalidade em paciente que sofrem de insuficiência renal, por exemplo (CHERTOW *et al.*, 1998). Os resultados do presente estudo mostraram que houve uma redução estatística da concentração da albumina sérica em relação aos controles. Embora não se conta com uma avaliação crônica, este resultado significativo evidencia o perfil nutricional, também corroborado com um balanço mais negativo no grupo diabético em relação ao controle.

O perfil nutricional dos grupos avaliados também pode ser inferido através do resultado da concentração sérica de ureia. O catabolismo proteico gera, além do dióxido de carbono e água, a produção de escórias nitrogenadas tais como ureia, creatinina ácido úrico e amônia (BANKIR; ROUSSEL; BOUBY, 2015). Assim, o estado hipoinsulinêmico é promotor do processo de proteólise, resultando em maior concentração desta escórias, como evidenciado nos resultados. A concentração de ureia elevada e persistente pode gerar citotoxicidade devido à formação de cianeto endogenamente (KALIM *et al.*, 2014). Além disso, esta alteração decorrente do aumento do catabolismo proteico pode alterar a dinâmica das junções firmes intestinais e contribuir para uma disruptura da barreira intestinal (VAZIRI; YUAN; NORRIS, 2013).

A correlação da glutamina sérica e a diabetes tem sido relatada na literatura. O nível de glutamina plasmática cai também durante o jejum e em pacientes com diabetes mellitus não tratado (RAO; SAMAK, 2012). No diabetes não tratado, quando o nível de insulina é insuficiente, os tecidos não podem captar a glicose do sangue de maneira eficiente, para combustível ou para conservação como gordura. Neste processo, ocorre o aumento na concentração de acetil-CoA. O acúmulo resultante de acetil-CoA acelera a formação de corpos cetônicos além da capacidade de oxidação dos tecidos extra-hepáticos. O aumento dos níveis sanguíneos de acetoacetato e D-b-hidroxitirato diminui o pH do sangue, causando a condição conhecida como acidose. Na acidose metabólica, há um aumento do processamento da glutamina pelos rins (NELSON; COX, 2016).

Trabalhos mostram que o aumento na concentração de glutamina sérica está associado com fortalecimento da barreira intestinal, redução da inflamação local e redução de

citocinas pró-inflamatória. Além disso, o incremento de Alanina está ligado ao aumento das defesas e da proteção intestinal (HE *et al.*, 2018). Baseado nos resultados de concentração plasmática de aminoácidos, a redução da concentração de glutamina e alanina podem estar relacionados com a quebra da barreira intestinal em animais diabéticos, aumento da permeabilidade e distúrbio do transporte hidroeletrolítico pelas células epiteliais da mucosa do íleo. A Alanina e a glicina provavelmente atuam como indicadores do estado geral dos aminoácidos na célula (NELSON; COX, 2016). Assim, pode-se aventar a possibilidade de que a redução da concentração plasmática destes aminoácidos pode estar relacionada com a queda da concentração dos mesmos no enterócito de animais diabéticos.

Um estado de hiperglicemia persistente, diferente de picos esporádicos relacionados ao fenômeno alimentar, gera uma sobrecarga metabólica no organismo (YAN, 2014). Por conseguinte, a hipoinsulinemia leva ao desenvolvimento das complicações clínicas observadas na diabetes (SINGH *et al.*, 2013). O excesso de glicose promove uma maior eliminação renal (glicosúria), que por outro lado, estimula a maior excreção de água por aumento da osmolaridade no túbulo renal (poliúria). Desta forma, o aumento da perda urinária associado com o incremento na osmolaridade plasmática pela hiperglicemia promove o estímulo do centro regulador da sede, causando aumento da ingestão de líquidos, caracterizando a polidipsia (ZANONI, 2011). A hiperfagia pode estar relacionada à queda da concentração de insulina e uma tentativa de aumentar o consumo alimentar com o objetivo de captar um maior aporte intestinal de glicose.

Dentro do panorama de alterações metabólicas, o estado de hiperglicemia descompensado por 14 dias está relacionado às modificações da composição corporal. Os resultados de impedanciometria evidenciaram uma maior quebra de gordura e de massa esquelética no grupo DM aferido no D14. A deficiência de insulina estimula mecanismos de proteólise e lipólise para a manutenção das funções vitais. Por sua vez, este desequilíbrio energético é promotor do aumento da ingestão de nutrientes, caracterizando a polifagia observada no estudo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Além disso, a perda de massa muscular esquelética vista através do método de bioimpedância no grupo DM é corroborado com dados da literatura que evidencia esta quebra proteica no corpo inteiro (HEBERT; NAIR, 2010).

No processo de catabolismo proteico ficou evidente a perda de massa magra constatada através da impedanciometria. A redução da concentração plasmática de insulina, confinamento nas gaiolas metabólicas resultando em menos exercícios físicos e uma possível

acidose metabólica nos animais diabéticos, podem contribuir para uma maior perda de proteína muscular (SOUZA *et al.*, 2015).

Outros mecanismos também são propostos para explicar a fisiopatologia da perda de massa muscular esquelética em condições de hiperglicemia. Dentre elas, a literatura destaca o papel da IL-6 que atua através de um mediador intracelular, o STAT-3, este por sua vez induz a ativação da miostatina que é um regulador negativo do músculo esquelético (ZHANG *et al.*, 2013). Em contrapartida, a glutamina é um aminoácido que entra na via de bloqueio do STAT 3, podendo contribuir para a redução da quebra muscular (KIM; KIM, 2017).

Outros autores defenderam que, em modelos animais de diabetes tipo 1, outros mecanismos de sinalização podem estar envolvidos neste processo de caquexia muscular. Mais especificamente, a presença de IGF-1 (fator de crescimento da insulina – 1) contribui para o aumento da massa muscular. No diabetes tipo 1, os níveis de IGF-1 estão reduzidos (MOYER – MILEUR *et al.*, 2008).

A insulina é um hormônio indutor do metabolismo e a sua presença pode inibir o sistema ubiquitina proteossômico. Assim, o estado fisiológico sem esta molécula pode promover a quebra da musculatura esquelética através do referido sistemas em modelos animais de diabetes (SALA; ZORZANO, 2015). Além disso, no diabetes induzido por estreptozotocina, observa-se um aumento no processo de autofagia, mecanismo que também pode estar envolvido no processo de perda de massa muscular esquelética (SALA *et al.*, 2014).

Outro fator relatado na literatura é a concentração de cortisol. No diabetes tipo 1, os níveis circulantes deste hormônio estão aumentados (CHAN *et al.*, 2003). O cortisol ativa o sistema ubiquitina - proteossoma e estimula a degradação de massa muscular esquelética em pacientes insulino-pênicos (WING; GOLDBERG, 1993).

Embora o uso de glutamina em solução de reidratação proposto por este estudo não tenha tido o objetivo de tratar a perda de massa muscular, pode-se notar que o uso deste aminoácido pode ter benefícios além da reposição do volume plasmático de água frente um quadro de desidratação em pacientes diabéticos.

A hiperglicemia promove um aumento na osmolaridade plasmática, resultando em um movimento de exteriorização da água intracelular para o meio extracelular (LIAMIS *et al.*, 2014). Assim, os resultados evidenciaram uma redução do fluido intracelular aferido pela bioimpedância. Seguindo um raciocínio fisiológico, a redução do fluido extracelular pode ser decorrente de uma maior excreção renal, corroborado pela poliúria (ZANONI, 2011).

Os pacientes diabéticos podem desenvolver alterações morfológicas e funcionais, além de complicações, em todo o trato gastrointestinal (SHAKIL; CHURCH; RAO, 2008). No presente estudo, na avaliação morfométrica do intestino delgado em suas três porções anatômicas, foi evidenciado um incremento no comprimento tanto de vilos quanto de criptas dos animais diabéticos. Este resultado é corroborado com relatos da literatura (ZHAO *et al.*, 2006).

Esta hiperplasia da mucosa pode ser uma resposta adaptativa do organismo que não é eficaz na utilização da glicose como principal substrato energético em decorrência da carência de insulina circulante para que promova a entrada do açúcar para o meio intracelular. O aumento da proliferação celular em criptas associado com uma redução na apoptose de células intestinais são fenômenos que foram observados em modelos animais de diabetes induzido por STZ (DORFMAN *et al.*, 2015).

Além disso, é sugerido que o aumento da atividade enzimática na borda em escova de hidrolases e dissacaridases podem estar envolvidos no incremento da absorção intestinal de carboidratos e da hiperplasia de mucosa em questão (ROSA *et al.*, 2015); (CASPARY; RHEIN; CREUTZFELDT, 1972); (LIU *et al.*, 2012). Por outro lado, a literatura mostra que a suplementação de L-glutamina evitou a hipertrofia do intestino delgado de animais diabéticos induzidos quimicamente (ROSA *et al.*, 2015).

A dinâmica da barreira intestinal e a ocorrência da alteração da permeabilidade tem sido foco de investigação científica por alguns grupos de pesquisa. O aumento da permeabilidade tem sido citado prévio ao surgimento da DM (GRAHAM *et al.*, 2004). Tem-se aventado que a quebra da barreira intestinal e o aumento da permeabilidade estão na gênese autoimune do desenvolvimento da hipoinsulinemia crônica (NEU *et al.*, 2005). Entretanto, a interação entre o aumento da permeabilidade intestinal e o início do DM ainda não é clara (SUZUKI, 2013).

O presente estudo evidencia através dos resultados de cromatografia líquida de alta performance que o aumento da concentração de lactulose em amostra urinária está relacionado com um incremento do transporte paracelular na mucosa intestinal, caracterizando uma quebra da barreira intestinal. Em contraponto, a dosagem de manitol, que tem passagem preferencial pela via transcelular, não apresentou diferença estatística. Desta forma, infere-se que as células epiteliais intestinais não sofreram alterações significativas da influência da hiperglicemia persistente.

Outros aspectos também podem ser ponderados sobre as alterações da permeabilidade. Semelhante à doença celíaca, o eixo gliadina-zonulina possivelmente

desempenha um papel nos defeitos de barreira intestinal em DM. Em um estudo que utilizou ratos propensos à diabetes, níveis elevados de Zonulina no soro e conteúdo intestinal coincidem com elevação da permeabilidade no intestino delgado (WATTS *et al.*, 2005). Todavia, no nosso trabalho não contamos com a mensuração desta proteína no plasma para que se pudesse correlacionar com o raciocínio fisiopatológico, embora o aumento da concentração de Zonulina esteja correlacionado com o aumento da glicemia e com o dano da barreira intestinal ser uma hipótese factível.

Poder-se-ia esperar também que a diminuição da concentração plasmática de glutamina nos animais diabéticos poderia alterar a permeabilidade ao manitol, segundo o que ficou evidente em alguns estudos da literatura (LI *et al.*, 2004). Entretanto, no nosso trabalho não ficou aparente esta tendência. Ao contrário, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados, e não havia destruição celular aparente na morfometria intestinal.

Alterações de proteínas de junção firme como consequência de hiperglicemia tem sido citada na literatura. Investigação sobre distúrbios vasculares avanta que o aumento da glicose plasmática persistente pode estar relacionado com glicosilação proteica, ativando citocinas e induzindo ao aumento de radicais livres e estresse oxidativo, levando a lesão vascular e fator de risco para os pacientes diabéticos (ARONSON, 2008). Assim, pode-se sugerir que esta dinâmica de lesão, ocasionada pela hiperglicemia, pode estar envolvida na quebra da permeabilidade e interferir nas proteínas de junções firmes.

Em estudo realizado em ratos DM induzido por STZ, a expressão da proteína claudina-2 estava diminuída em túbulos renais destes animais em decorrência do aumento do estresse oxidativo associado com o status hiperglicêmico do diabetes (JIJON *et al.*, 2014). Neste estudo, a causa da diminuição da expressão desta proteína foi a nitração deste componente. A diminuição da expressão desta claudina estava relacionada com o aumento da natriurese.

Podemos inferir que uma dinâmica semelhante possa estar ocorrendo no trato gastrointestinal dos animais diabéticos, já que os resultados do nosso estudo apresentam um aumento da permeabilidade associado com maior perda luminal de sódio, evidenciando pelo NET negativo do íon sódio no lúmen intestinal. Soma-se a isso, o fato de a expressão gênica da claudina – 2 também se encontrar diminuída de acordo com os nossos resultados apresentados.

Possibilita-se a teorização, o fato de o aumento do estresse oxidativo que ocorre no tecido intestinal estar na gênese da diminuição da transcrição gênica de Claudina 2 e

Claudina 15. Assim também com a quebra da barreira paracelular, aumentando a passagem de dissacarídeo aferido pelo teste de lactulose/manitol.

No mesmo trabalho de (JIJON *et al.*, 2014), a ocludina verificada no túbulo renal de ratos diabéticos apresentava uma expressão proteica reduzida em relação aos controles. Em contra partida, de acordo com este autor, a expressão da proteína ZO-1 nos animais com hiperglicemia estava mais expressa em comparação com os animais saudáveis. No nosso estudo não obtivemos os dados referentes à expressão das proteínas tanto de junções firmes, quanto das proteínas transmembrânicas. De outra forma, através do método de reação em cadeia da polimerase, foi observado que a expressão gênica da ocludina não foi diferente do ponto de vista estatístico entre controles e diabéticos. Todavia, foi constatado um aumento da expressão de ZO-1 no intestino dos ratos diabéticos em relação aos controles, corroborando com o autor supracitado.

Em resposta à inflamação, os perfis alterados das proteínas claudina 2 e claudina 15 nas junções firmes estão associados ao movimento paracelular alterado dos fluidos e dos solutos, o que se reflete na mudança geral na função da barreira epitelial. Distúrbios com claudinas formadoras de poros / canais, em última análise, influencia o movimento de íons e fluidos em todas as células, clinicamente refletida nos sintomas da doença, incluindo a diarreia. Esta modificação da dinâmica das claudinas formadoras de poros podem ser capitaneadas pela inflamação (HERNANDEZ; QUIROS; NUSRAT, 2017).

A ausência da expressão dupla de genes claudin-2 e -15 pode levar desnutrição grave como resultado de defeitos na absorção epitelial intestinal de glicose, aminoácidos e lipídios, levando à morte após o nascimento (WADA *et al.*, 2013). Como apresentado na figura 4 da introdução, a ausência destas duas claudinas formadoras de poros pode dificultar a absorção de glicose através da dinâmica dos transportadores transmembrânicos devido à necessidade de aumentar a concentração de sódio no lúmen e aumentar o aporte da transposição de glicose para o meio endógeno.

Os dados apresentados da perfusão intestinal mostraram que houve uma maior perda hidroeletrolítica dos animais diabéticos em relação aos controles. A redução da expressão gênica das claudinas aqui investigadas pode estar relacionada com uma disfunção na expressão destas proteínas e representar uma fragilidade da barreira intestinal levando a uma maior perda de sódio.

Além disso, os resultados dos transportadores transmembrânicos evidenciam uma redução da expressão gênica de NHE₃. Não foi possível a quantificação da expressão da proteína correspondente a este gene, mas podemos aferir que uma possível redução

quantitativa de NHE₃ pode dificultar a absorção de sódio nas células do vilão intestinal. O NHE (Na⁺ / H⁺ trocador) é um transportador que utiliza energia armazenada sob a forma de gradiente de concentração de Na⁺ eletroquímico desenvolvido em toda a membrana plasmática, sendo um mecanismo crítico para o movimento transepitelial de Na⁺ e HCO₃⁻ (GURNEY *et al.*, 2017). Sabe-se que patologias que levam a disbiose favorecem a processo inflamatório local e distúrbio da expressão e funcionamento destes transportadores, dentre elas a diabetes (SONNENBURG; BACKHED, 2016). Assim, podemos postular que a hiperglicemia pode levar a um processo de disbiose e alteração da funcionalidade e da expressão do NHE₃ mensurado. Além disso, a hipertrofia da mucosa do intestino delgado pode ser uma resposta fisiológica compensatória a ausência ou deficiência de NHE₃ (JOHNSON *et al.*, 2012). Entretanto, este mesmo autor relata que em modelos animais diabéticos, ratos, induzidos por estreptozotocina, foi observado um aumento na expressão gênica de NH₃ em duas vezes, sendo diferente dos resultados apresentados no nosso estudo.

Outro mecanismo proposto para a redução da concentração do NHE₃ na membrana epitelial é através do aumento de AMPc no citosol desencadeado por processo patogênicos, tais como infecção por cólera, salmonelose e shigelose, além de infecção intestinal por *Campylobacter* (GURNEY, 2017). Desta forma, como discutido mais afrente, a infecção de Toxina do cólera no nosso modelo de diabetes induzido por STZ apresentou uma maior perda de sódio do que o comparado com os animais diabéticos sem a coinfeção.

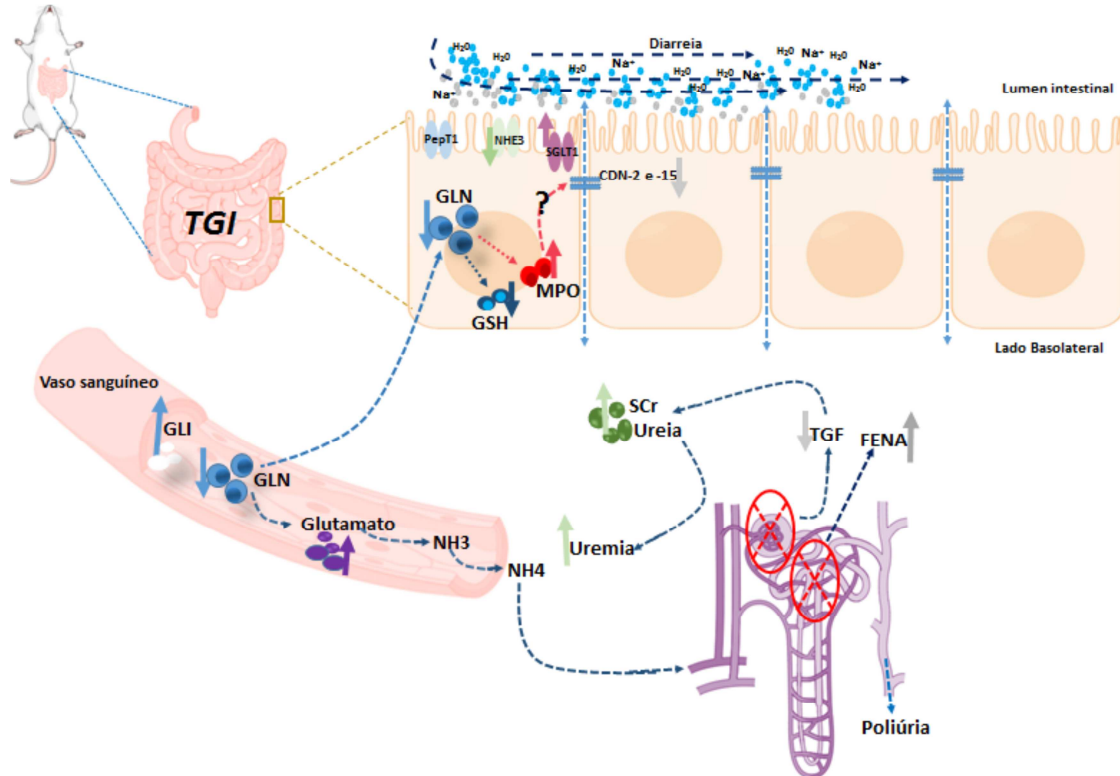
O transportador de glicose SGLT1 usa um gradiente de Na⁺ para transportar Na⁺ e glicose através da membrana borda em escova da célula epitelial intestinal. Em cada ciclo absorptivo, uma molécula de açúcar é cotransportada com Na⁺ através da célula, que é acompanhada por 260 moléculas de água (CHEN; COADY; JACKSON, 1995). Este mecanismo formou a base molecular da terapia de reidratação oral com o objetivo de controlar a mortalidade associada à cólera e outras doenças diarreicas (LOO; ZEUTHEN; CHANDY, 1996). Este fenômeno é possível devido à ativação do NHE₃ através da glicose e até mesmo com a reversão da inibição do boqueio deste transportador pela toxina do cólera (GHISHAN; KIELA, 2012).

Há mais de duas décadas tem se estudado sobre o PEPT-1, sendo caracterizado como um transportador de dipeptídeo predominantemente localizado na borda em escova das células epiteliais intestinais e também podendo ser encontrado em células renais (ADIBI, 1997). Inicialmente, postulou-se que a insulina poderia promover o aumento da concentração desta proteína na membrana do enterócito (THAMOTHARAN *et al.*, 1999). Entretanto, outros autores apresentaram evidências que falaram a favor de uma não alteração da

expressão gênica do PEPT-1 em decorrência da diabetes, tendo a sua maior expressão proteica promovida por uma estabilização de vesículas contendo mRNA que, após serem liberadas, promoveram um aumento da concentração deste transportador na membrana da célula intestinal (GANGOPADHYAY; THAMOTHARAN; ADIBI, 2002). Todavia, nossos resultados da expressão proteica não foram possíveis devido à técnica de Western Blot não ter sido eficaz para a caracterização da proteína no nosso modelo experimental. Por outro lado, os dados da expressão gênica e da expressão proteica referentes ao SGLT-1 do nosso trabalho são corroborados por dados clássicos da literatura que evidenciam o aumento de ambas as expressões em modelo de diabetes (BURANT *et al.*, 1994).

Nosso trabalho evidenciou uma disfunção da barreira intestinal e um distúrbio do transporte hidroeletrolítico, com perda de eletrólitos e água mais exacerbada em animais diabéticos em detrimento dos controles. Desta forma, nosso modelo experimental evidenciou um quadro de diarreia osmótica representando um quadro de enteropatia diabética amplamente discutido na literatura (GOTFRIED; PRIEST; SCHEY, 2017). Assim, a figura 32 resume de forma esquemática a nossa hipótese do mecanismo de lesão das junções firmes desencadeado pela hiperglicemia em nosso modelo animal de diabetes tipo 1 e a relação do aumento do estresse oxidativo e redução da concentração plasmática de glutamina com o aumento da permeabilidade intestinal.

Figura – 32. Disfunção intestinal e desordem metabólica na DM1 experimental



Fonte: Francisco Adelvane Rodrigues

Figura apresentando o possível mecanismo de lesão intestinal desencadeado pela hiperglicemia em modelo animal de diabetes e a via metabólica correlacionando com as alterações clínicas e laboratoriais observadas no diabetes tipo 1. . Água (H_2O); sódio (Na^+); PepT1 (transportador de dipeptídeo -1); NHE₃ (trocador H^+/Na^+ - 3); SGLT1 (transportador Na^+ /glicose -1) NH_4 (amônio); GLN (glutamina); CDN (claudina -2 e claudina – 15); Cr (creatinina); TGF (taxa de filtração glomerular); FENa (fração de excreção de sódio); GLI (glicose); TGI (trato gastrointestinal)

7.2.Avaliação da solução de reidratação oral a base de Alanil-Glutamina

O uso de uma solução de reidratação oral a base de dipeptídeo também teve como objetivo avaliar a sua eficácia em minimizar os efeitos da hiperglicemia na mucosa intestinal em nosso modelo de diabetes tipo 1 induzido por STZ. A aplicação de Alanil-Glutamina como terapia farmacológica seguiu o princípio da utilização do transportador de dipeptídeo (PEPT-1) para aumentar o aporte de sódio e o transporte passivo de água pela barreira intestinal e, assim, reverter o processo de perda de eletrólitos pelo lúmen (ADIBI, 2003).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que o uso de ALGLN foi favorável para reversão da perda hidroeletrólítica apresentada pelo grupo DM. A literatura não consta com muitos estudos que avaliem o transporte de eletrólitos e água pela barreira intestinal em modelos de diabetes. Utilizando técnicas laboratoriais tais como a perfusão intestinal,

podemos balizar os nossos resultados e promover uma discussão em torno desta temática. Todavia, sabe-se que glutamina facilita a absorção enteral de nutrientes e eletrólitos em animais com diarreia experimental (XUE *et al.*, 2008).

Assim, baseado nas evidências das modificações da fisiopatologia apresentado ao longo da introdução e das possíveis modificações na expressão dos transportadores transmembrânicos já apresentados, podemos inferir que o uso da ALGLN segue um princípio de transporte através do PEPT-1 que torna viável a sua aplicabilidade em estudos que possam ir além da fase pré clínica.

Por outro lado, a suplementação com glutamina em pacientes diabéticos tem se mostrado promissor de acordo com alguns trabalhos da literatura. O uso deste aminoácido pôde contribuir para a redução da hiperglicemia, principalmente após o exercício físico em pacientes adolescentes portadores de diabetes tipo 1 (SANTIAGO *et al.*, 2017) e (BADOLE *et al.*, 2014). Também foi demonstrado a possibilidade do uso de glutamina para a redução de pico de hiperglicemia pós prandial em pacientes DM tipo2 (BONET *et al.*, 2011). Uma das possíveis formas de reduzir a hiperglicemia é inibindo a oxidação de gordura e a lipólise (MOLFINO *et al.*, 2010).

A suplementação com este aminoácido também pode ser favorável ao aumento da massa magra em pacientes portadores de hiperglicemia crônica (MANSOUR *et al.*, 2015). Com relação ao epitélio intestinal, mecanismo da proteção da mucosa intestinal induzida por suplementação de glutamina oral contra a fome, o estresse, o trauma, a radiação e outras condições patológicas envolve aumento da taxa de síntese proteica e diminuição da proteólise (COEFFIER *et al.*, 2003), o que pode ser muito favorável para o ganho de massa magra esquelética em associação.

A utilização da glutamina vem sendo estudada a muito por pesquisadores do nosso grupo. Estes tem avaliado que o baixo nível de concentração sérica de glutamina correlacionou-se com perturbações da barreira intestinal, inflamação e doenças diarreicas entre crianças (GUERRANT *et al.*, 2008) e (LIMA *et al.*, 2007). Além disso, este mesmo grupo de trabalho tem investigado os patógenos relacionados com eventos diarreicos e seus diversos aspectos clínico-epidemiológicos, dentre eles o cólera.

Há mais de duas décadas nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a trabalhos relacionado com o cólera que tem contribuído para a formação do conhecimento científico sobre este vibrião, no que concerne a epidemiologia molecular, patogênese, tratamento e prevenção (LIMA, 1994). Os estudos que investigam a eficácia da glutamina no tratamento da diarreia secretória do cólera também vêm sendo desenvolvidos pelo nosso grupo e com

significativos resultados para a comunidade científica. Nosso laboratório demonstrou que a glutamina foi mais eficaz do que a glicose em promover a absorção de sódio e água em modelo de diarreia secretória induzida pela toxina do cólera em coelhos (SILVA *et al.*, 1998).

Em tese de doutorado defendida por NUNES, utilizou-se dois modelos animais de diarreia secretória por TC, chegando-se a conclusão de que a suplementação das soluções de reidratação oral com glutamina e alanil- glutamina melhoraram o transporte intestinal de água, sódio e cloreto no modelo de diarreia secretória em *Mus musculus* e em *Oryctolagus cuniculus*. Além disso, as soluções de reidratação oral acrescidas de GLN e ALGLN foram mais eficazes que a solução preconizada pela OMS e pela solução controle de Ringer na reabsorção de água e eletrólitos. Nesta tese, também foi citado como conclusão que a suplementação com GLN e ALGLN restabeleceram a morfo-fisiologia da barreira morfofuncional, no modelo de injúria intestinal por metrotexato, reduzindo o índice apoptótico e propiciando renovação celular. Além de restabelecer a permeabilidade intestinal após a lesão desencadeada pelo quimioterápico utilizado no método.

Nos resultados do nosso trabalho, foram apresentados dados que mostraram maior perda hidroeletrolítica através do lúmen intestinal na diarreia secretório pela TC em animais diabéticos. Já foi levantado a discussão que a diminuição do transportador NHE₃, a diminuição da expressão das claudinas formadoras de poros, além do processo inflamatório induzido pela hiperglicemia, poderia levar a desestabilização das junções firmes, que seriam os fatores promotores de uma maior perda hidroeletrolítica pelo lúmen intestinal neste grupo experimental. Desta forma, a toxina do colérica pode ter sido um agente agravante da condição intestinal de base, a enteropatia diabética, levando a uma diarreia secretória mais intensa.

Logo, a utilização de soluções de reidratação para a reversão das perdas de água e eletrólitos evidenciou que tanto aquela preconizada pela Organização Mundial da Saúde, quanto a de dipeptídeo foram eficazes na recuperação do déficit hidroeletrolítico. Entretanto, o modelo experimental empregado já evidencia uma enteropatia desencadeada pelo excesso de glicose endógena. Assim, um dos objetivos do nosso estudo foi aventar uma modalidade de recuperação de água e microelementos que não promovesse uma piora na doença de base, para que não se aumentasse os fatores de risco futuros, teorizando do ponto de vista clínico.

Desta forma, o uso de ALGN pode ser considerado mais favorável para a utilização em soluções de reidratação oral diante de eventos diarreicos para a recuperação das perdas de elementos essenciais através do lúmen intestinal, sem aumentar a glicemia plasmática. Outros dados da literatura podem favorecer esta reflexão.

A TC não afeta a absorção de sódio induzida por dipeptídeo, além de não afetar o metabolismo, oxidação e o transporte de glutamina. Assim como, a utilização de glutamina pode ser mais positiva como substrato em solução de reidratação por promover um aporte de aminoácido que será utilizado diretamente como fonte energética pelo enterócito (ABELY *et al.*, 2000).

Embora se saiba que a utilização de SRO tem como base o uso de amido de arroz possa ser mais barato (ATIA; BUCHMAN, 2010), este composto se converte em glicose após ser lisado pelas enzimas intestinais e, ainda assim, poderia provocar um maior aporte de glicose para uma população hiperglicêmica. Poderia se preconizar, ao menos, a utilização de SRO a base de ALGN para populações específicas, tais como os diabéticos.

A variante El Tor do *Vibrio cholerae* pode promover metabolização de glicose e resultar em aumento de virulência da bactéria (ZADNOVA *et al.*, 2017). Estudo demonstrou que o uso de SRO a base de glicose promoveu a recuperação do desequilíbrio hidroeletrólítico desencadeado pela infecção por TC. Entretanto, houve um aumento da expressão de genes de virulência no patógeno, podendo ser fator significativo na perpetuação de um surto desta infecção diarreica (KUHN *et al.*, 2014). Este mesmo grupo mostrou que o uso de solução de reidratação a base de arroz apresentou menor virulência nas cepas eliminadas pelas fezes dos pacientes contaminados.

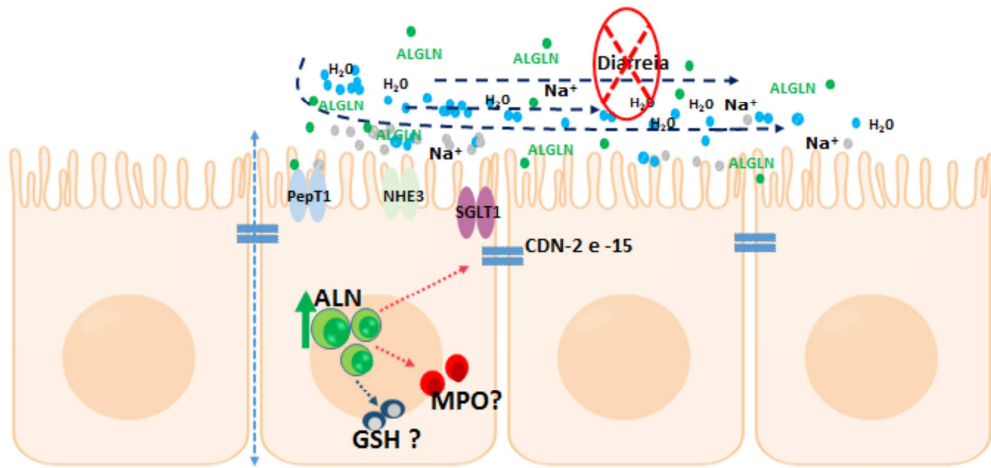
Embora não tenhamos feito a avaliação da expressão gênica dos transportadores transmembrânicos após a indução da diarreia secretória pela TC, dados do nosso grupo demonstraram que houve um aumento na expressão do PEPT-1 em modelo de infecção por TC em alça ileal de coelhos (LIMA *et al.*, 2010), podendo favorecer a utilização de ALGLN na reidratação.

Logo, o uso de ALGLN como possível substituto à glicose poderia ser um instrumento farmacológico eficaz não apenas com benefícios para uma população que padeça por hiperglicemia, mas também para a população em geral. Embora com custos mais elevados, poder-se-ia pensar que a diminuição do número de casos afetados, por um germe com menos potencial de virulência, trouxesse maior economia para a saúde pública, sendo afetado um menor número de casos.

A utilização de arroz como composto base para o desenvolvimento de SRO ou até mesmo como alimento para terapia de reidratação vem sendo empregado a baixos custos. Por exemplo, em Bangladesh, um tratamento com SRO a base de arroz custa 0,15 centavos por pessoa; enquanto o uso de SRO a base de glicose, 0,37 centavos (MURUGAIAH *et al.*, 2016).

É provável, que a utilização de ALGLN como base para a SRO saia a um custo mais elevado do que os dois compostos que já são mais consagrados pela prática clínica. Contudo, a sua eficácia já vem sendo demonstrada por pesquisas do nosso grupo (LIMA *et al.*, 2002), (LIMA *et al.*, 2014) e a utilização desta solução testada em nosso estudo poderia ser mais efetiva para o tratamento das condições diarreicas de pacientes portadores de diabetes, tanto na enteropatia diabética, quanto nas gastroenterites infecciosas, pela possibilidade de não promover um aumento no aporte glicêmico e não piorar a doença de base. A figura 33 resume a hipótese da atuação da ALGLN no estudo proposto.

Figura–33. Alanil-Glutamina restabelece equilíbrio hidroeletrólítico intestinal na DM1



Fonte: Francisco Advane Rodrigues

Figura apresentando a possível via farmacológica de reidratação a base de uma solução de Alanil- glutamina (ALGLN). Água (H₂O); sódio (Na⁺); PepT1 (transportador de dipeptídeo -1); NHE₃ (trocador H⁺/Na⁺ - 3); SGLT1 (transportador Na⁺/glicose -1).

8. CONCLUSÃO

O estado hipoinsulinêmico modulou a permeabilidade da barreira morfofuncional intestinal correlacionado ao aumento do estresse oxidativo, inflamação e redução de agente antioxidante no intestino delgado. As alterações promovidas pelo status de hiperglicemia não controlada se repercutiram na diminuição na transcrição gênica de transportadores transmembrânicos e de proteínas componentes das junções firmes. Esta modulação desencadeou um aumento na secreção hidroeletrólítica pelo lúmen do intestino delgado no modelo animal de diabetes tipo1. O emprego de uma SRO a base de Alanil-glutamina se mostrou eficaz na recuperação hidroeletrólítica de animais diabéticos que apresentaram maior perda de eletrólitos pelo lúmen intestinal.

A quebra da barreira morfofuncional intestinal caracterizada pelo aumento da permeabilidade paracelular também pode estar relacionada com o agravamento da diarreia secretória promovida pela toxina do cólera nos animais diabéticos, incrementando a perda hidroeletrólítica. Por outro lado, a solução de ALGLN perfundida nos animais diabéticos promoveu a diminuição da perda de eletrólitos e redução da osmolaridade de alça intestinal após a indução de diarreia, sendo ainda mais eficaz do que a solução preconizada pela OMS que é a base de glicose.

O estudo apresentado, de natureza pré – clínica considerou as alterações clínicas observadas e reportadas na literatura, porém sem uma melhor precisão da fisiopatologia que envolvesse diretamente a barreira intestinal. A perspectiva clínica da utilização de uma solução de reidratação oral pode vir a ser avaliada frente as necessidades crescentes do público diabético e a possibilidade de outras alternativas farmacológicas que diminuam os efeitos colaterais de uma hiperglicemia sustentada.

REFERÊNCIAS

- ABELY, M.; DALLET, P.; BOISSET, M.; DESJEUX, J. F. Effect of cholera toxin on glutamine metabolism and transport in rabbit ileum. **Am J Physiological Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 278, n. 5, p. G789-G796, jun. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.5.G789>>. Acesso em: 08 mar. 2018.
- American Diabetes Association. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. Supplement 1, p. S55-S64, jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/dc18-S006>>. Acesso em 24 mai. 2018.
- ADIBI, S. A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. **Gastroenterology**, v. 113, n.1, p. 332–340, jul. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508597003442>>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- ADIBI, S. A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, p. G779–G788, nov. 2003. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpgi.00056.2003>>. Acesso em: 25 mar. 2018.
- AMASHEH, S.; MEIRI, N.; GITTER, A. H.; SCHÖNEBERG, T.; MANKERTZ, J.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 4969-4976, dec. 2002. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/115/24/4969>>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- ANDRADE, M. E. R.; ARAUJO, R. S.; BARROS, P. A. V.; SOARES, A. D. N.; ABRANTES, F. A.; GENEROSO, S. V.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080-1087, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.01.012>>. Acesso em: 15 mai. 2018.
- ARONSON, D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. **Adv Cardiol.**, v. 45, p. 1-16, 2008. Disponível em: <doi: 10.1159/0000115118.>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- ATIA, A.; BUCHMAN, A. L. Treatment of cholera-like diarrhoea with oral rehydration. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 104, n. 6, p. 465–474, 2010. Disponível em: <DOI:10.1179/136485910X12786389891164>. Acesso em 7 jan. 2018.
- BADOLE, S. L.; JANGAM, G. B.; CHAUDHARI, S. M.; GHULE, A. E.; ZANWAR, A. A. L-Glutamine Supplementation Prevents the Development of Experimental Diabetic Cardiomyopathy in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n.3, p. e92697, mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092697>>. Acesso em: 30 jan. 2018.
- BANKIR, L.; ROUSSEL, R.; BOUBY, N. Protein- and diabetes-induced glomerular hyperfiltration: role of glucagon, vasopressin, and urea. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 309, n. 1, p. F2-F23, apr. 2015. Disponível em: <doi: 10.1152/ajprenal.00614.2014>. Acesso em: 17 jan. 2018.

BARBOZA JR., M. S.; SILVA, T. M. J.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases.

Braz J Med Biol Res [online], v.32, n.12, p.1499-1504, 1999. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100879X1999001200008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 jul. 2018.

BERBEL, M. N.; PINTO, M. P. R.; PONCE, D.; BALBI, A. L. Aspectos nutricionais na lesão renal aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 5, p. 600-606, 2011.

Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302011000500022>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

BEUTHEU, S.; GHOUZALI, I.; GALAS, L.; DÉCHELOTTE, P.; COËFFIER, M. Glutamine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells. **Clin Nutr.**, v. 32, n. 5, p. 863-869, oct. 2013. Disponível em: <doi: 10.1016/j.clnu.2013.01.014.>. Acesso em: 23 mar. 2018.

BEUKHOF, C. M.; HOORN, E. J.; LINDEMANS, J.; ZIETSE, R. Novel risk factors for hospital-acquired hyponatraemia: a matched case-control study. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 66, n. 3, p. 367-372, mar. 2007. Disponível em: <DOI:10.1111/j.1365-2265.2007.02741.x>. Acesso em: 12 dez. 2017.

BINDER, H. J.; BROWN, I.; RAMAKRISHNA, B. S.; YOUNG, G. P. Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 16, n. 3, p. 376, mar. 2014. Disponível em: <doi: 10.1007/s11894-014-0376-2.>. Acesso em: 18 nov. 2017.

BISCHOFF, S. C.; BARBARA, G.; BUURMAN, W.; OCKHUIZEN, T.; SCHULZKE, J. D.; SERINO, M.; TILG, H.; WATSON, A.; WELLS, J. M. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterol.**, v. 18, n. 14, p. 189, nov. 2014. Disponível em: <doi: 10.1186/s12876-014-0189-7.>. Acesso em: 21 mar. 2018.

BONET, S. D.; WONG, O.; SYNNOTT, E.; PIYARATNA, N.; DOUGLAS, A.; GRIBBLE, F. M.; HOLST, J. J.; CHISHOLM, D. J.; GREENFIELD, J. R. Glutamine Reduces Postprandial Glycemia and Augments the Glucagon-Like Peptide-1 Response in Type 2 Diabetes Patients. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 7, p. 1233-1238, jul. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/jn.111.139824>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, may. 1976. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 de jan. 2018.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n.3, p. 618-622, sep. 1982. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/60/3/618.long?sso-checked=true>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. VIGITEL Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 160p.: il. ISBN 978-85-334-2479-1

BURANT, C. F.; FLINK, S.; DEPAOLI, A. M.; CHEN, J.; LEE, W. S.; HEDIGER, M. A.; BUSE, J. B.; CHANG, E. B. Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. **J Clin Invest.**, v. 93, n. 2, p. 578–585, feb. 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC293881/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

BUTLER, T. Treatment of severe cholera: a review of strategies to reduce stool output and volumes of rehydration fluid. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 111, n. 5, p. 204-210, may. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/trstmh/trx041>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BYTZER, P.; TALLEY, N. J.; LEEMON, M.; YOUNG, L. J.; JONES, M. P.; HOROWITZ, M. Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. **Arch Intern Med.**, v. 161, n. 16, p. 1989-1996, sep. 2001. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/648896>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

CAMPBELL, H. K.; MAIERS, J. L.; DEMALI, K. A. Interplay between tight junctions & adherens junctions. **Exp Cell Res.**, v. 358, n. 1, p. 39-44, sep. 2017. Disponível em: <doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.061.>. Acesso em: 17 abr. 2018.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. **Cancer Discov.**, v. 2, n. 10, p. 881-898, oct. 2012. Disponível em: <doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0345.>. Acesso em: 05 fev. 2018.

CARLE, M. S. **Validation of bioimpedance spectroscopy by assessing.** 2010. Tese (Mestrado em Ciências) - The University of Alabama, Birmingham, Alabama, 2010.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; ORIÁ, R. B.; REA, W. K.; BRITO, G. A. C.; FUJII, J.; OBRIG, T.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**, v. 20, n. 10, p. 934-41, oct. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900704001777>>. Acesso: 12 fev. 2018.

CASPARY, W. F.; RHEIN, A. M.; CREUTZFELDT, W. Increase of intestinal brush border hydrolases in mucosa of streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 8, n. 6, p. 412–414, jan. 1972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Increase+of+intestinal+brush+border+hydrolases+in+mucosa+of+streptozotocin-diabetic+rats>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

CHAN, O.; INOUE, K.; RIDDELL, M. C.; VRANIC, M.; MATTHEWS, S. G. Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Minerva Endocrinol.**, v. 28, n. 2, p. 87–102, jul. 2003. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/10785937_Diabetes_and_the_hypothalamo-pituitary-adrenal_HPA_axis>. Acesso em: 13 jan. 2018.

CHEN, X. Z.; COADY, M. J.; JACKSON, F. Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. **Biophys J.**, v. 69, n. 6, p. 2405–2414, dec. 1995. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0006349595801104/1-s2.0-S0006349595801104-main.pdf?_tid=e1d9a785-0498-4f6b-9b4d-ae813c94287f&acdnat=1530507941_c0e3a87d5b991a33206145e311349acd>. Acesso em: 21 mar. 2018.

CHERTOW, G. M.; LAZARUS, J. M.; PAGANINI, E. P.; ALLGREN, R. L.; LAFAYETTE, R. A.; SAYEGH, M. H. Predictors of mortality and the provision of dialysis in patients with acute tubular necrosis. **J Am Soc Nephrol.**, v. 9, n. 4, p. 692–698, may. 1998. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/13724009_Predictors_of_mortality_and_the_provision_of_dialysis_in_patients_with_acute_tubular_necrosis_The_Auriculin_Anaritide_Acute_Renal_Failure_Study_Group>. Acesso em: 14 fev. 2018.

COEFFIER, M.; CLAEYSSSENS, S.; HECKETSWEILER, B.; LAVOINNE, A.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 285, n. 2, p. G266–G273, sep. 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/10797510_Enteral_glutamine_stimulates_protein_synthesis_and_decreases_ubiquitin_mRNA_level_in_human_gut_mucosa>. Acesso em: 22 jul. 2017.

DAI, Z. L.; LI, X. L.; XI, P. B.; ZHANG, J.; WU, G.; ZHU, W. Y. L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. **Amino Acids.**, v. 45, n. 3, p. 501–512, sep. 2013. Disponível em: <doi: 10.1007/s00726-012-1264-4.>. Acesso em: 24 mar. 2018.

DE FRONZO, R. A. Hyperkalemia and hyporeninemic hypoaldosteronism. **Kidney Int.**, v. 17, n. 1, p. 118–134, jan. 1980. Disponível em: <[https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)32217-1/pdf](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)32217-1/pdf)>. Acesso em: 24 fev. 2018.

DE SANTIS, S.; CAVALCANTI, E.; MASTRONARDI, M.; JIRILLO, E.; CHIEPPA, M. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. **Front Immunol.**, v. 6, n. 612, dec. 2015. Disponível em: <doi: 10.3389/fimmu.2015.00612.>. Acesso em: 16 jan. 2018.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31–36, abr. 2002. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=DELFINO+et+al.%2C+2002+STREPTZOTOCIN&btnG=>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

DORFMAN, T.; POLLAK, Y.; SOHOTNIK, R.; CORAN, A. G.; BEJAR, J.; SUKHOTNIK, I. Enhanced intestinal epithelial cell proliferation in diabetic rats correlates with b-catenin

accumulation. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 3, p. 135-143, sep. 2015. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/content/226/3/135.short>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DU, Y. T.; RAYNER, C. K.; JONES, K. J.; TALLEY, N. J.; E HOROWITZ, M. Gastrointestinal Symptoms in Diabetes: Prevalence, Assessment, Pathogenesis, and Management. **Diabetes Care**, v. 41, n. 3, p. 627-637, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2337/dc17-1536>>. Acesso em: 27 mai. 2018.

DUGGAN, C.; FONTAINE, O.; PIERCE, N. F.; GLASS, R. I.; MAHALANABIS, D.; ALAM, N. H.; BHAN, M. K.; SANTOSHAM, M. Scientific Rationale for a Change in the Composition of Oral Rehydration Solution. **JAMA**, v. 291, n. 21, p. 2628-2631, jun. 2004. Disponível em: <[doi:10.1001/jama.291.21.2628](https://doi.org/10.1001/jama.291.21.2628)>. Acesso em: 12 fev. 2018.

ELISAF, M. S.; TSATSOULIS, A. A.; KATOPODIS, K. P.; SIAMOPOULOS, K. C. Acid-base and electrolyte disturbances in patients with diabetic ketoacidosis. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 34, n. 1, p. 23-27, sep. 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(96\)01332-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(96)01332-0)>. Acesso em: 09 abr. 2018.

FARUQUI, R.; KHANUM, H.; BARDHAN, P. K.; SACK, D. Perfusion Study on Rat Small Intestine Exposed to Cholera Toxin to Observe absorption of Water and Electrolytes from a Liposome Based Ors. **Journal of Parasitic Diseases: Diagnosis and Therapy**, v. 1, n. 1, p.1-10, oct. 2016. Disponível em: <<http://www.alliedacademies.org/articles/perfusion-study-on-rat-small-intestine-exposed-to-cholera-toxin-to-observe-absorption-of-water-and-electrolytes-from-a-liposome-bas.html>>. Acesso em: 11 fev. 2018.

FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L. S.; BRANDT, L. J. **Intestinal Electrolyte Absorption and Secretion**. In: Sleisenger and Fordtran's: Gastrointestinal and Liver Disease. , 9th ed. [S.I.]: Elsevier, 2010, cap.99, p.1675-1694.

FUJITA, H.; CHIBA, H.; YOKOZAKI, H.; SAKAI, N.; SUGIMOTO, K.; WADA, T.; KOJIMA, T.; YAMASHITA, T.; SAWADA, N. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 54, n. 8, p. 933-944, may. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Differential+expression+and+subcellular+localization+of+claudin-7%2C+-8%2C+-12%2C+-13%2C+and+-15+along+the+mouse+intestine.>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Curr Protoc Pharmacol.**, v. 70, n. 5, p. 1-20, sep. 2015. Disponível em: <[doi:10.1002/0471141755.ph0547s70](https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70)>. Acesso: 26 mar. 2018.

FÜRST, P.; POGAN, K.; STEHLE, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. **Nutrition**, v. 13, n. 7-8, p. 731-737, jul./ago. 1997. Disponível em: <[https://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007\(97\)83035-3/pdf](https://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007(97)83035-3/pdf)>. Acesso em: 19 jun. 2018.

GANGOPADHYAY, A.; THAMOTHARAN, M.; ADIBI, S. A. Regulation of oligopeptide transporter 9 (Pept-1) in experimental diabetes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, n. 1, p. G133-G138, jul. 2002. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpgi.00445.2001>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

GARCIA-HERNANDEZ, V.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1397, n. 1, p. 66-79, may. 2017. Disponível em: <doi: 10.1111/nyas.13360>. Acesso em: 01 abr. 2018.

GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. Small intestinal ion transport. **Current opinion in gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 130-134, mar. 2012. Disponível em: <doi:10.1097/MOG.0b013e32834e7bc3>. Acesso: 17 mai. 2018.

GOTFRIED, J.; PRIEST, S.; SCHEY, R. Diabetes and the Small Intestine. **R. Curr Treat Options Gastro**, v. 15, n. 4, p. 490-507, dec. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11938-017-0155-x>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GRAHAM, S.; COURTOIS, P.; MALAISSE, W. J.; ROZING, J.; SCOTT, F. W.; ANDMOWAT, A. M. Enteropathy precedes type 1 diabetes in the BB rat. **Gut**, v. 53, n. 10, p. 1437-1444, oct. 2004. Disponível em: <doi: 10.1136/gut.2004.042481(2004)>. Acesso em: 22 abr. 2018.

GROSCHWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 124, n. 1, p. 3-20, jul. 2009. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.>. Acesso em: 22 jan. 2018.

GUERRANT, R. L.; KOSEK, M.; MOORE, S.; LORNTZ, B.; BRANTLEY, R.; LIMA, A. A. M. Magnitude and Impact of Diarrheal Diseases. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 351-355, jul-aug. 2002. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0188-4409(02)00379-X>. Acesso em: 30 abr. 2018.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr Rev.**, v. 66, n. 9, p. 487-505, sep. 2008. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00082.x.>. Acesso: 19 fev. 2018.

GÜLDEN, E.; WONG, F. S.; WEN, L. The Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. **Clin Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 143-153, aug. 2015. Disponível em: <doi: 10.1016/j.clim.2015.05.013>. Acesso: 26 fev. 2018.

GURNEY, M. A.; LAUBITZ, D.; GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. Pathophysiology of Intestinal Na⁺/H⁺ Exchange. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 27-40, jan. 2017. Disponível em: <doi:10.1016/j.jcmgh.2016.09.010>. Acesso em: 27 jan. 2018.

HAIDER, D. G.; LINDNER, G.; AHMAD, S. S.; SAUTER, T.; WOLZT, M.; LEICHTLE, A. B.; FIEDLER, G. M.; EXADAKTYLOS, A. K.; FUHRMANN, V. Hypermagnesemia is a strong independent risk factor for mortality in critically ill patients: results from a cross-sectional study. **Eur J Intern Med.**, v. 26, n. 7, p. 504-507, sep. 2015. Disponível em: <doi: 10.1016/j.ejim.2015.05.013>. Acesso em: 3 jun. 2015.

HE, F.; WU, C.; LI, P.; LI, N.; ZHANG, D.; ZHU, Q.; REN, W.; PENG, Y. Functions and Signaling Pathways of Amino Acids in Intestinal Inflammation. **BioMed Research**

International, v. 2018, Article ID 9171905, 13 pages, 2018. Disponível em: <doi:10.1155/2018/9171905>. Acesso em: 12 mar. 2018.

HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. **Clin nutr.**, v. 29, n. 1, p. 13-17, fev. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561409001812>>. Acesso em: 30 mar 2018.

GARCIA-HERNANDEZ, V.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1397, n. 1, p. 66-79, jun. 2017. Disponível em: <doi: 10.1111/nyas.13360.>. Acesso em: 11 mar. 2018.

HOFFMANOVÁ, I.; SÁNCHEZ, D.; HÁBOVÁ, V.; ANDĚL, M.; TUČKOVÁ, L.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. Serological markers of enterocyte damage and apoptosis in patients with celiac disease, autoimmune diabetes mellitus and diabetes mellitus type 2. **Physiol Res.**, v. 64, n.4, p. 537-546, 2015. Disponível em: <<http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/prepress/932916.pdf>>. Acesso em: 22 abr 2018.

HOLECK, M. Side effects of long-term glutamine supplementation. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 37, n. 5, p. 607-616, sep. 2013. Disponível em: <doi:10.1177/0148607112460682>. Acesso em: 18 sep. 2017.

HOLMES, J. L.; VAN ITALLIE, C. M.; RASMUSSEN, J. E; ANDERSON, J. M. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. **Gene Expr. Patterns**, v. 6, n. 6, p. 581–588, sep. 2006. Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/node/8863>>. Acesso em: 13 abr 2018.

IDF, 2015 - IDF - International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**. 7th ed. Brussels: IDF, 2015. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 2015 Nov 30.

JIJÓN, E. M.; MUÑOZ, R. R.; NAMORADO, M. D. C.; CHAVERRI, J. P.; EYES, J. L. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, p. 162-175, jul. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

JOHNSON, L. R.; et al. Water Transport in The Gastrointestinal Tract. **In Physiology of the gastrointestinal tract**. 5a Ed., vol 1. Cap. 77, p:1770 - 1806, 2012

KALIM, S.; KARUMANCHI, S. A.; THADHANI, R. I.; BERG, A. H. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. **Am J Kidney Dis.**, v. 64, n. 5, p. 793-803, nov. 2014. Disponível em: <DOI:<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.04.034>>. Acesso em: 25 fev. 2018.

KATSAROU, A.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; RAWSHANI, A.; DABELEA, D.; BONIFACIO, E.; ANDERSON, B. J.; JACOBSEN, L. M.; SCHATZ, D. A.; LERNMARK, Å. Type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers.**, v. 3, article number 17016, mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrdp201716>>. Acesso em: 07 abr. 2018.

KHAN, K.; ELIA, M. Factors affecting the stability of L-glutamine in solution. **Clin Nutr**, v. 1, p. 186-192, 1991. Disponível em: <[https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/0261-5614\(91\)90037-D/fulltext](https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/0261-5614(91)90037-D/fulltext)>. Acesso em: 16 mai. 2018.

KIM, M-H.; KIM, H. The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 5, p. 1051, may. 2017. Disponível em: <[doi:10.3390/ijms18051051](https://doi.org/10.3390/ijms18051051)>. Acesso em: 13 jan 2018.

KIM, S.; SHIN, Y.; KIM, H.; PAK, H.; HA, J. Impacts of typhoon and heavy rain disasters on mortality and infectious diarrhea hospitalization in South Korea. **Int J Environ Health Res.**, v. 23, n. 5, p. 365-376, oct. 2012. Disponível em: <[doi:10.1080/09603123.2012.733940](https://doi.org/10.1080/09603123.2012.733940)>. Acesso em: 14 fev. 2018.

KOSEK, M.; BERN, C.; LOZANO, R.; BRYCE, J.; GUERRANT, R. L. The magnitude of the global burden of diarrheal disease from studies published 1992–2000. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, p. 197-204, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.org/scielo.php?pid=S0042-96862003000300010&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 12 jan. 2018.

KOPIC, S.; GEIBEL, J. P. Toxin Mediated Diarrhea in the 21st Century: The Pathophysiology of Intestinal Ion Transport in the Course of ETEC, V. cholerae and Rotavirus Infection. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2132-2157, aug. 2010. Disponível em: <[doi:10.3390/toxins2082132](https://doi.org/10.3390/toxins2082132)>. Acesso em: 22 mar 2018.

KÜHN, J.; FINGER, F.; BERTUZZO, E.; BORGEAUD, S.; GATTO, M.; RINALDO, A.; BLOKESCH, M. Glucose- but Not Rice-Based Oral Rehydration Therapy Enhances the Production of Virulence Determinants in the Human Pathogen *Vibrio cholerae*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, p. e3347, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003347>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

KUITUNEN, M.; SAUKKONEN, T.; ILONEN, J.; AKERBLOM, H. K.; SAVILAHTI, E. Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1*02 Allele. **Autoimmunity**, v. 35, n. 5, p. 365–368, 2002. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0891693021000008526>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; editores. **Robbins & cotran. Patologia. Bases patológicas da doença**. 7ª ED. Rio De Janeiro: Elsevier; 2005.

LI, N.; LEWIS, P.; SAMUELSON, D.; LIBONI, K.; NEU, J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, n. 3, p. G726–G733, oct. 2004. Disponível em: <[DOI: 10.1152/ajpgi.00012.2004](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00012.2004)>. Acesso em: 16 dez. 2017.

LIAMIS, G.; LIBEROPOULOS, E.; BARKAS, F.; ELISAF, M. Diabetes mellitus and electrolyte disorders. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 10, p. 488-496, oct. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4198400/pdf/WJCC-2-488.pdf>> Acesso em: 30 jan. 2018.

LIAMIS, G.; MILIONIS, H. J.; ELISAF, M. Hyponatremia in patients with infectious diseases. **J Infect.**, v. 63, n. 5, p. 327-335, nov. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.07.013>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

LIAMIS, G.; RODENBURG, E. M.; HOFMAN, A.; ZIETSE, R.; STRICKER, B. H.; HOORN, E. J. Electrolyte disorders in community subjects: prevalence and risk factors. **Am J Med.**, v. 126, n. 3, mar. 2013. Disponível em: <[https://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(12\)00789-9/pdf](https://www.amjmed.com/article/S0002-9343(12)00789-9/pdf)>. Acesso em: 28 dez. 2017.

LIMA, A. A. M. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, oct. 1994. Disponível em: <DOI: 10.1097/00001432-199410000-00013>. Acesso em: 11 mar. 2018.

LIMA, A. A. M.; ANSTEAD, G. M.; ZHANG, Q.; FIGUEIREDO, I. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; LIMA, N. L.; GUERRANT, R. L.; ORIA, R. B. Effects of glutamine alone or in combination with zinc and vitamin A on growth, intestinal barrier function, stress and satiety-related hormones in Brazilian shantytown children. **Clinics**, v. 69, n. 4, p. 225-233, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322014000400225>. Acesso em: 18 fev. 2018.

LIMA, A. A. M.; CARVALHO, G. H.; FIGUEIREDO, A. A.; GIFONI, A. R.; SOARES, A. M.; SILVA, E. A. T.; GUERRANT, R. L. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 458-462, jul. 2002. Disponível em: <DOI: 10.1016/S0899-9007(02)00775-X>. Acesso em: 01 abr. 2018.

LIMA, A. A. M.; MONTEIRO, S. M. N.; HAVT, A.; LIMA, I. F. N.; SILVA, E. E.; SOARES, A. M.; MONTEIRO, M. S.; MOORE, S. R.; GUERRANT, R. L. Cholera toxin augments gene expressions of glutamine and alanyl-glutamine transporters in rabbit small intestine: the role of glutamine rich small peptides-based oral rehydration solutions. In: **ASTMH 59th Annual Meeting, 2010, Atlanta. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2010. v. 83. p. 146-146, 2010.

LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M.; MONTEIRO, H. S.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanylglutamine-supplemented enteral formula. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 44, n. 3, p. 365-374, mar. 2007. Disponível em: <https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2007/03000/Wasting_and_Intestinal_Barrier_Function_in.13.aspx>. Acesso em: 14 jan 2018.

LIMA, A. A. M. **Glutamina e Alanil-glutamil-glutamina: Síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal**. 1998. Tese (Professor Titular em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

LIU, G. F.; ZHAO, J. B.; ZHEN, Z.; SHA, H.; CHEN, P. M.; LI, M. Effect of tangweian jianji on upper gastrointestinal remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. **World J Gastroenterol.**, v. 18, n. 35, p. 4875-4884, sep. 2012. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i35/4875.htm>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **METHODS**, v. 25, p. 402–408, 2001. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.net/livak-2001.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

LOO, D. D.; ZEUTHEN, T.; CHANDY, G. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. **PNAS**, v. 93, n. 23, p. 13367–13370, nov. 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13367>>. Acesso em: 05 jan. 2018.

MAHAN, L. K.; STUMP, S. E.; RAYMOND, J. L. **Krause – Alimento, Nutrição e Dietoterapia**. 13a Edição, 2012. Elsevier – Rio de Janeiro – RJ

MANSOUR, A.; MOHAJERI-TEHRANI, M. R.; QORBANI, M.; HESHMAT, R.; LARIJANI, B.; HOSSEINI, S. Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 119-126, jan. 2015. Disponível em: <DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.05.014>>. Acesso em: 31 mar. 2018.

MATÉS, J. M.; SEGURA, J. A.; MARTÍN-RUFIÁN, M.; CAMPOS-SANDOVAL, J. A.; ALONSO, F. J.; MÁRQUEZ, J. Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. **Curr. Mol. Med.**, v. 13, n. 4, p. 514-534, 2013. Disponível em: <<http://pubmed.cn/22934847>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**, v. 3, n. 11, p. e442, nov. 2006. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0030442>>. Acesso em: 24 jan 2018.

MOLFINO, A.; LOGORELLI, F.; MUSCARITOLI, M.; CASCINO, A.; PREZIOSA, I.; FANELLI, F. R.; LAVIANO, A. Metabolic effects of glutamine on insulin sensitivity. **Nutritional Therapy & Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 7-11, jan. 2010. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/6375/2fb02c2218f0d870b9916abd3919a5acf670.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MOLS, R.; BROUWERS, J.; SCHINKEL, A.H.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. Intestinal Perfusion with mesenteric blood sampling in wild-type and knockout mice. Evaluation of a novel tool in biopharmaceutical drug profiling. **Drug Metab Dispos**, v.37, n. 6, p.1334-1337, jun. 2009. Disponível em: <<http://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/37/6/1334.full.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

MONTEIRO, S. M. N. **Eficácia da suplementação com glutamine, peptídeos, vitaminas A e E, na doença diarréica induzida por metotrexato e pela toxina do *Vibrio cholerae*: restabelecimento da barreira morfofuncional intestinal**. 2004. 167 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.

MOURAD, F. H. Animal and human models for studying effects of drugs on intestinal fluid transport in vivo. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 50, n. 1, p.3-12, jul./aug. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Animal+and+human+models+for+studying+effects+of+drugs+on+intestinal+fluid+transport+in+vivo.>>. Acesso em: 29 mar. 2018.

MOYER-MILEUR, L. J.; SLATER, H.; JORDAN, K. C.; MURRAY, M. A. IGF-1 and IGF-binding proteins and bone mass, geometry, and strength: relation to metabolic control in adolescent girls with type 1 diabetes. **J Bone Miner Res.**, v. 23, n. 12, p. 1884–1891, 2008. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/6375/2fb02c2218f0d870b9916abd3919a5acf670.pdf>>.

Acesso em: 23 mar. 2018.

MURUGAIAH, C.; PALASUBERNIAM, P.; FALAH, M. S.; AL-TALIB, H. Food based oral rehydration therapy: towards a better cholera treatment. **J prob health**, v. 4, n. 3, p. 151, 2016. Disponível em: <DOI: 10.4172/2329-8901.1000151>. Acesso em: 17 jun. 2018.

MUTO, S.; HATA, M.; TANIGUCHI, J.; TSURUOKA, S.; MORIWAKI, K.; SAITOU, M.; FURUSE, K.; SASAKI, H.; FUJIMURA, A.; IMAI, M.; KUSANO, E.; TSUKITA, S.; FURUSE, M. Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, n. 17, p. 8011-8016, apr. 2010. Disponível em: <doi: 10.1073/pnas.0912901107>. Acesso em: 20 jan. 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

NEU, J.; REVERTE, C. M.; MACKAY, A. D.; LIBONI, K.; TUHACEK-TENACE, L. M.; HATCH, M.; LI, N.; CAICEDO, R. A.; SCHATZ, D. A.; ATKINSON, M. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 40, n. 5, p. 589-595, may. 2005. Disponível em: < DOI: 10.1097/01.MPG.0000159636.19346.C1>. Acesso em: 10 jan. 2018.

NEU, J.; DEMARCO, V.; LI, N. Glutamine: clinical applications and mechanisms of action. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v. 5, n. 1, p. 69-75, jan. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Glutamine%3A+clinical+applications+and+m+echanisms+of+action>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, n. 2, p. 351-358, jun. 1979. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 abr. 2018.

OWEN, O. E.; KALHAN, S. C.; HANSON, R. W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 30409-30412, 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/277/34/30409.long>>. Acesso: 11 jan. 2018.

PALMER, B. F. Managing hyperkalemia caused by inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system. **N Engl J Med.**, v. 351, n. 6, p. 585-592, sep. 2004. Disponível em: <DOI: 10.1056/NEJMra035279>. Acesso em: 15 jan. 2018.

PERSELL, D. J.; ARANGIE, P.; YOUNG, C.; STOKES, E. N.; PAYNE, W. C.; SKORGA, P.; GILBERT-PALMER, D. Preparing for bioterrorism: category A agents. **Nurse Pract.**, v. 26, n. 12, p. 19-24, dec. 2001. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=11809039>>. Acesso em: 29 mai. 2018.

PHAM, P. C.; PHAM, P. M.; PHAM, S. V.; MILLER, J. M.; PHAM, P. T. Hypomagnesemia in patients with type 2 diabetes. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 2, n. 2, p. 366-373, mar. 2007. Disponível em: <<http://cjasn.asnjournals.org/content/2/2/366.full>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

PHILLIPS, L. K.; RAYNER, C. K.; JONES, K. L.; HOROWITZ, M. An update on autonomic neuropathy affecting the gastrointestinal tract. **Curr Diab Rep**, v. 6, n. 6, p. 417-423, dec. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118223>>. Acesso em: 13 jan 2018.

POLONSKY, K. S. The Past 200 Years in Diabetes. **N Engl J Med**, v. 367, p. 1332-1340, 2012. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1110560>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

PORTO, C. C. **Vademecum de Clínica Médica**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2014. 1070p.

RAHNER, C.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. **Gastroenterology**, n. 120, n. 2, p. 411-422, feb. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508501430198>>. Acesso: 01 mar. 2018.

RAO, R.; SAMAK, G. Role of Glutamine in Protection of Intestinal Epithelial Tight Junctions. **J Epithel Biol Pharmacol.**, v. 5, n. Suppl 1-M7, p. 47-54, jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369670/>>. Acesso em: 22 mai. 2018.

RAY, K. Intestinal tract: A breach in the intestinal barrier during hyperglycaemia. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 5, p. 255, may. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Intestinal+tract%3A+A+breach+in+the+intestinal+barrier+during+hyperglycaemia.>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

REAVEN, G. M. Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. **Cell Metab**, v. 1, p. 9-14, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413104000075>>. Acesso em: 13 abr. 2018.

RODRIGUES, F. A. P.; MEDEIROS, P. H. K. S.; PRATA, M. M. G.; LIMA, A. A. M. "Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal", p. 441-478. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. ISBN: 9788580391893, DOI 10.5151/9788580391893-18

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R. G.; CASTRO, I. A.; PIRES, I. S. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition.**, v. 22, n. 5, p.564-571, may. 2006. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899-9007\(05\)00348-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899-9007(05)00348-5)>. Acesso em: 11 mai. 2018.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. O. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina Em atletas: controvérsias e aspectos atuais. **J metab nutr.**, v. 7, p. 106-117, 2003.

ROSA, C. V. D. D.; AZEVEDO, S. C. S. F.; BAZOTTE, R. B.; PERALTA, R. M.; BUTTOW, N. C.; PEDROSA, M. M. D.; GODOI, V. A. F.; NATALI, M. R. M. Supplementation with L-Glutamine and L-Alanyl-L-Glutamine Changes Biochemical Parameters and Jejunum Morphophysiology in Type 1 Diabetic Wistar Rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143005, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143005>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Med.**, v. 21, n. 2, p. 80-97, feb. 1996. Disponível em: <<http://sci-hub.tw/10.2165/00007256-199621020-00002>>. Acesso em: 08 mar. 2018.

SAID, G. Diabetic neuropathy – a review. **Nat Clin Pract Neurol.** v. 3, p. 331-340, 2007. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncpneuro0504>>. Acesso em: 09 jan. 2018.

SALA, D.; IVANOVA, S.; PLANA, N.; RIBAS, V.; DURAN, J.; BACH, D.; TURKSEVEN, S.; LAVILLE, M.; VIDAL, H.; KARCEWSKA-KUPCZEWSKA, M.; KOWALSKA, I.; STRACZKOWSKI, M.; TESTAR, X.; PALACÍN, M.; SANDRI, M.; SERRANO, A. L.; ZORZANO, A. Autophagy-regulating TP53INP2 mediates muscle wasting and is repressed in diabetes. **J Clin Invest.**, v. 124, n. 5, p. 1914–1927, may 2014. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/72327>>. Acesso em: 12 fev 2018.

SALA, D.; ZORZANO, A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, n. 20, p. 3803-3817, oct. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091746>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

SANTIAGO, T. L.; MAURAS, N.; HOSSAIN, J.; WELTMAN, A. L.; DARMAUN, D. Does oral glutamine improve insulin sensitivity in adolescents with type 1 diabetes? **Nutrition**, v. 34, p. 1-6, feb. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.003>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

SAPONE, A.; DE MAGISTRIS, L.; PIETZAK, M.; CLEMENTE, M. G.; TRIPATHI, A.; CUCCA, F.; LAMPIS, R.; KRYSZAK, D.; CARTENI, M.; GENEROSO, M.; IAFUSCO, D.; PRISCO, F.; LAGHI, F.; RIEGLER, G.; CARRATU, R.; COUNT, S. D.; FASANO, A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1443–1449, mai. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644703>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

SAVILAHTI, E.; ORMAA, L. A. T.; SAUKKONEN, T.; SANDINI-POHJAVUORI, U.; KANTELE, J. M.; ARATO, A.; ILONEN, J.; AKERBLUM, H. K. Jejuna of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) show signs of immune activation. **Clin Exp Immunol**, v. 116, n. 1, p. 70 –77, apr. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1905225/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

SBD - Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018 / Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. São Paulo: Editora Clannad, 2017.

SECONDULFO, M.; IAFUSCO, D.; CARRATU, R.; DEMAGISTRIS, L.; SAPONE, A.; GENEROSO, M.; MEZZOGIOMO, A.; SASSO, F. C.; CARTENI, M.; DE ROSA, R.; PRISCO, F.; ESPOSITO V. Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type 1 diabetic patients. **Dig Liver Dis**, v. 36, n. 1, p. 35–45, jan. 2004. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1590865803005991>>. Acesso em: 02 fev. 2018.

SEDLAK, J.; LIDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)>. Acesso em: 11 mai 2018.

SHAKIL, A.; CHURCH, R. J.; RAO, S. S. Gastrointestinal complications of diabetes. **Am Fam Physician.**, v. 77, n. 12, p. 1697-1702, jun. 2008. Disponível em:

<<https://www.aafp.org/afp/2008/0615/p1697.html>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

SILVA, A. C.; SANTOS-NETO, M. S.; SOARES, A. M.; FONTELES, M. C.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 26, n. 5, p.513–519, may. 1998. Disponível em:

<<https://journals.lww.com/jpgn/Pages/ArticleViewer.aspx?year=1998&issue=05000&article=00006&type=Fulltext>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

SINGH, R.; KAUR, N.; KISHORE, L.; GUPTA, G. K. Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. **J Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 1, p. 51-70, oct. 2013. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jep.2013.08.051.>. Acesso em: 02 abr. 2018.

SONNENBURG, J. L.; BACKHED, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56-64, jul. 2016. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/nature18846>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

SOUZA, V. A.; OLIVEIRA, D.; MANSUR, H. N.; FERNANDES, N. M. S.; BASTOS, M. G. Sarcopenia na doença renal crônica. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 37, n. 1, p. 98-105, jan.-mar., 2015. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20150014\(2015\)](https://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20150014(2015))>. Acesso em: 18 mai. 2018.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Microbiol Rev.**, v. 56, n. 4, p. 622-647, dec. 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372891/>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 4, p. 631–659, fev. 2013. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-012-1070-x>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

TAMURA, A.; HAYASHI, H.; IMASATO, M.; YAMAZAKI, Y.; HAGIWARA, A.; WADA, M.; NODA, T.; WATANABE, M.; SUZUKI, Y.; TSUKITA, S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine.

Gastroenterology., v. 140, n. 3, p. 913-923, mar. 2011. Disponível em: <doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.006.>. Acesso em: 25 mar. 2018.

TAMURA, A.; TSUKITA, S. Paracellular Barrier And Channel Functions Of Tj Claudins In Organizing Biological Systems: Advances In The Field Of Barriology Revealed In Knockout Mice Seminars In Cell & Developmental Biology Journal 2014 DEC;36:177-85. DOI: 10.1016/J.SEMCDB.2014.09.019. EPUB 2014 OCT 12.

TESCH, G. H.; ALLEN, T. J. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Nephrology.**, v. 12, n. 3, p. 261, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

THAISS, C. A.; LEVY, M.; GROSHEVA, I.; ZHENG, D.; SOFFER, E.; BLACHER, E.; BRAVERMAN, S.; TENGELER, A. C.; BARAK, O.; ELAZAR, M.; BEN-ZEEV, R.; LEHAVI-REGEV, D.; KATZ, M. N.; PEVSNER-FISCHER, M.; GERTLER, A.; HALPERN, Z.; HARMELIN, A.; AAMAR, S.; SERRADAS, P.; GROSFELD, A.; SHAPIRO, H.; GEIGER, B.; ELINAV, E. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. **Science.**, v. 359, n. 6382, p. 1376-1383, mar. 2018. Disponível em: <doi: 10.1126/science.aar3318.>. Acesso em: 10 jan. 2018.

THAMOTHARAN, M.; BAWANI, S. Z.; ZHOU, X.; ADIBI, S. A. Hormonal regulation of oligopeptide transporter Pept-1 in a human intestinal cell line. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 276, n. 4, p. C821–C826, apr. 1999. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpcell.1999.276.4.C821>>. Acesso em: 10 jan 2018.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 4, p.285–293, apr. 2001. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35067088>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

TURNER, J. R.; BUSCHMANN, M. M.; ROMERO-CALVO, I.; SAILER, A.; SHEN, L. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 36, p. 204-212, dec. 2014. Disponível em: <doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.022.>. Acesso em: 12 fev. 2018.

VAZIRI, N. D.; YUAN, J.; NORRIS, K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. **Am J Nephrol**, v. 37, n. 1, p. 1-6, dec. 2013. Disponível em: <DOI: 10.1159/000345969>. Acesso em: 22 jan. 2018.

WADA, M.; TAMURA, A.; TAKAHASHI, N.; TSUKITA, S. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. **Gastroenterology**, v. 144, n. 2, p. 369–380, feb. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.035>>. Acesso: 24 fev. 2018.

WANG, B.; WU, G.; ZHOU, Z.; DAI, Z.; SUN, Y.; JI, Y.; LI, W.; WANG, W.; LIU, C.; HAN, F.; WU, Z. Glutamine and intestinal barrier function. **Amino Acids**, v. 47, n. 10, p. 2143-2154, oct. 2015. Disponível em: <DOI 10.1007/s00726-014-1773-4>. Acesso em: 10 mai. 2018.

WATTS, T.; BERTI, I.; SAPONE, A.; GERARDUZZI, T.; NOT, T.; ZIELKE, R.; FASANO, A. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. **PNAS**, v. 102, n. 8, p. 2916–2921, feb. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0500178102>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

WESTERHOLM-ORMIO, M.; VAARALA, O.; PIHKALA, P.; ILONEN, J.; SAVILAHTI, E. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2287–2295, set. 2003. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/52/9/2287>>. Acesso em: 29 mar. 2018.

WHO - World Health Organization. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva, WHO, 2014.

WHO - World Health Organization. Global Health Estimates: Diabetes. Geneva, WHO, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em: 27 out 2017.

WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. **Am J Physiol**, v. 264, n. 4, p. E668–E676, apr. 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.4.E668>>. Acesso em: 21 mai. 2018.

WU, G.; WU, Z.; DAI, Z.; YANG, Y.; WANG, W.; LIU, C.; WANG, B.; WANG, J.; YIN, Y. Dietary requirements of "nutritionally non-essential amino acids" by animals and humans. **Amino Acids**, v. 44, n. 4, p. 1107-1113, apr. 2013. Disponível em: <doi: 10.1007/s00726-012-1444-2>. Acesso em: 27 fev. 2018.

WU, J.; YAN, L-J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes Metab Syndr Obes.**, v. 8, p. 181-188, apr. 2015. |Disponível em: <doi:10.2147/DMSO.S82272>. Acesso em: 12 mai 2018.

XUE, H.; SAWYER, M. B.; FIELD, C. J.; DIELEMAN, L. A.; MURRAY, D.; BARACOS, V. E. Bolus oral glutamine protects rats against CPT-11-induced diarrhea and differentially activates cytoprotective mechanisms in host intestine but not tumor. **J Nutr.**, v. 138, n. 4, p. 740-746, apr. 2008. Disponível em: <<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4396517&blobtype=pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

XI, P.; JIANG, Z.; DAI, Z.; LI, X.; YAO, K.; ZHENG, C.; LIN, Y.; WANG, J., WU, G. Regulation of protein turnover by L-glutamine in porcine intestinal epithelial cells. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 8, p. 1012–1017, aug. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286311001732>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

YAN, L. J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **J Diabetes Res.**, v. 2014, p. 137919, jun. 2014. Disponível em: <doi:10.1155/2014/137919>. Acesso em: 23 abr. 2018.

YANG, C.; KO, B.; HENSLEY, C. T.; JIANG, L.; WASTI, A. T.; KIM, J.; SUDDERTH, J.; CALVARUSO, M. A.; LUMATA, L.; MITSCHKE, M.; RUTTER, J.; MERRITT, M. E.; DEBERARDINIS, R. J. Glutamine Oxidation Maintains the TCA Cycle and Cell Survival during Impaired Mitochondrial Pyruvate Transport. **Molecular Cell**, v. 56, n. 3, p. 414-424, nov. 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Glutamine+Oxidation+Maintains+the+TCA+Cycle+and+Cell+Survival+during+Impaired+Mitochondrial+Pyruvate+Transport>>. Acesso em: 05 mai. 2018.

ZADNOVA, S. P.; CHELDYSHOVA, N. B.; KRITSKII, A. A.; ADAMOV, A. K.; DEVDARIANI, Z. L.; KUTYREV, V. V. Comparative analysis of glucose metabolism in strains of *Vibrio cholera* biovar El Tor. **Mol. Genet. Microbiol. Virol.**, v. 32, n. 2, p. 94-99, apr. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3103/S0891416817020112>>. Acesso em: 06 mai. 2018.

ZANONI, J. N.; TRONCHINI, E. A.; MOURE, S. A.; SOUZA, I. D. Effects of L-glutamine supplementation on the myenteric neurons from the duodenum and cecum of diabetic rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 48, n. 1, p. 66-71, jan./mar. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032011000100014>. Acesso em: 27 abr. 2018.

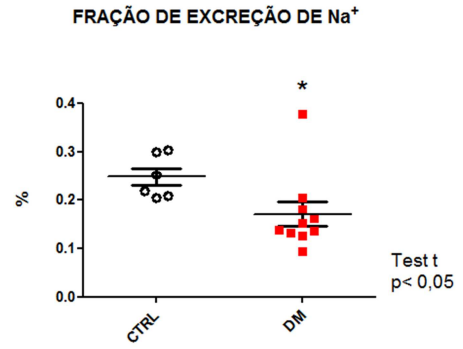
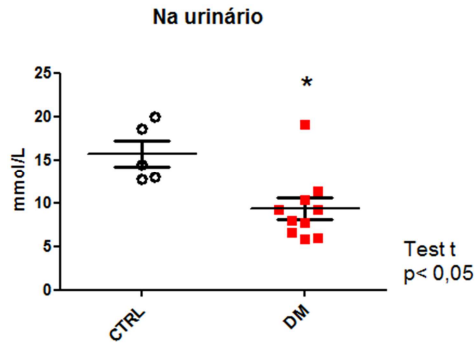
ZHANG, L.; PAN, J.; DONG, Y.; TWEARDY, D. J.; DONG, Y.; GARIBOTTO, G.; MITCH, W. E. Stat3 activation links a C/EBPdelta to myostatin pathway to stimulate loss of muscle mass. **Cell Metab**, v. 18, n. 3, p. 368-379, sep. 2013. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(13\)00329-X](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(13)00329-X)>. Acesso em: 9 jan. 2018.

ZHANG, Y.; WANG, Q. S.; CUI, Y. C.; MENG, F. C.; LIN, K. M. Changes in the intestinal absorption mechanism of icariin in the nanocavities of cyclodextrins. **Int J Nanomedicine.**, v. 7, p. 4239-4249, aug. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418075/>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

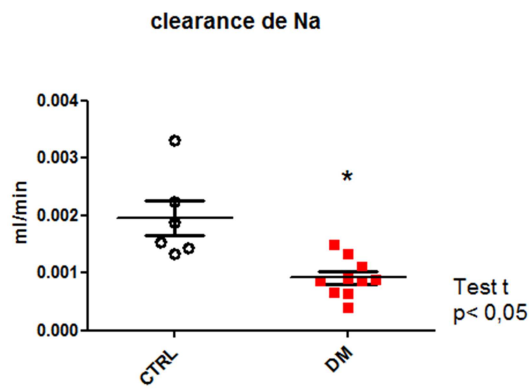
ZHAO, J.; FROKJAER, J. B.; DREWES, A. M.; EJSKJAER, N. Upper gastrointestinal sensory-motor dysfunction in diabetes mellitus. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 18, p. 2846-2857, may. 2006. Disponível em: <[doi:10.3748/wjg.v12.i18.2846](https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i18.2846)>. Acesso em: 2 fev. 2018.

APÊNDICE I – RESULTADOS FUNÇÃO RENAL

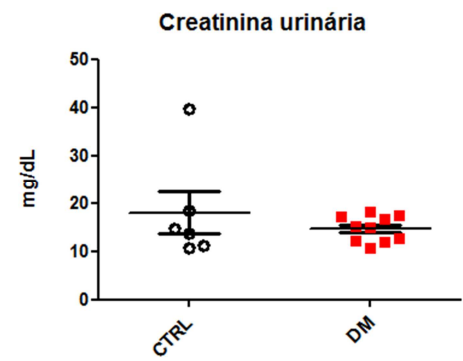
A)



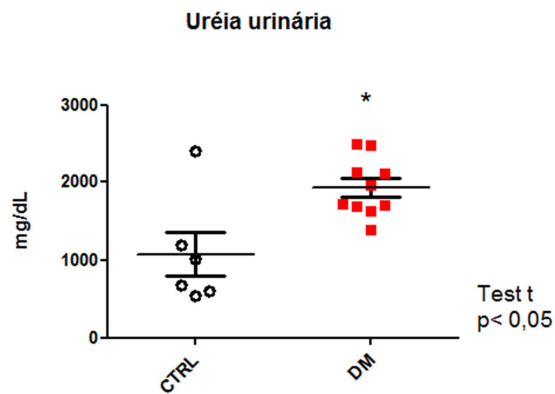
C)



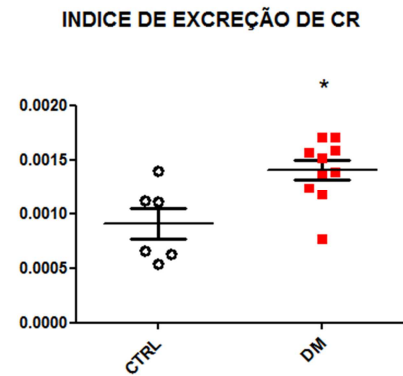
D)



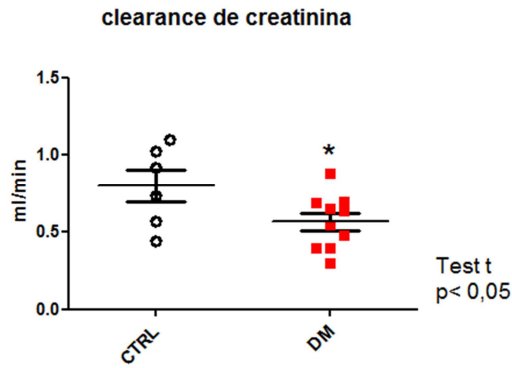
E)



F)



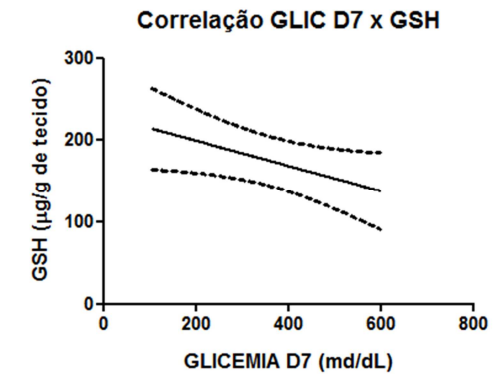
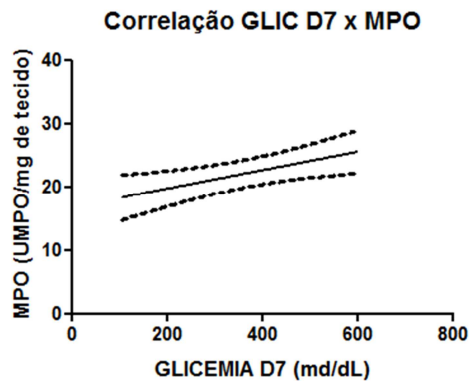
G)



Gráficos das alterações urinárias comparando os grupos controle (CTRL) x diabéticos (DM1). A) Concentração de sódio (Na⁺) urinário em mmol/L; B) Fração de excreção de sódio urinário em percentual (%); C) Clearance de sódio em ml/min; D) Concentração de creatinina urinária em mg/ dL; E) Concentração de ureia urinária em mg/ dL; F) Índice de excreção de creatinina; G) Clearance de creatinina em ml/min. Os valores são apresentados como média ± EPM.* P<0,05; dados não pareados, test t de Student.

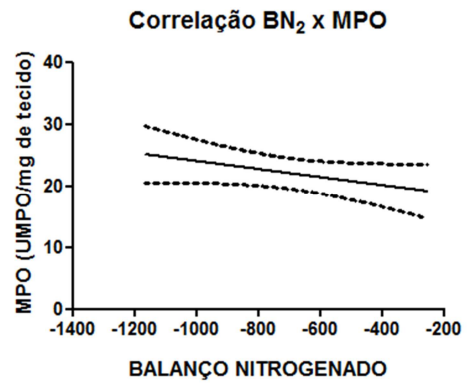
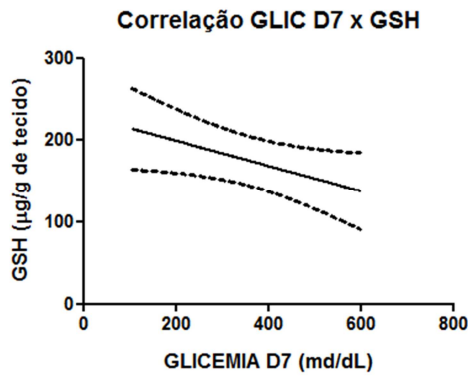
APÊNDICE II – GRÁFICOS DE CORRELAÇÕES

A)



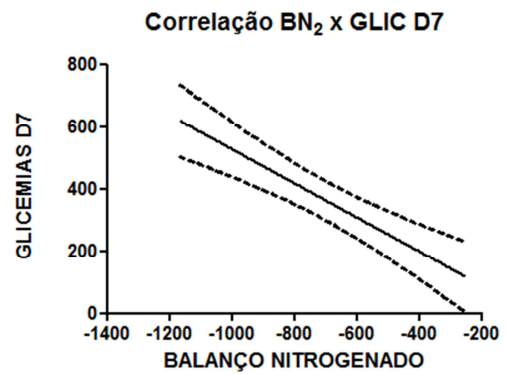
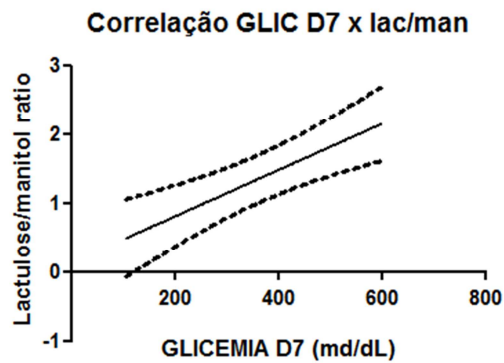
E)

C)



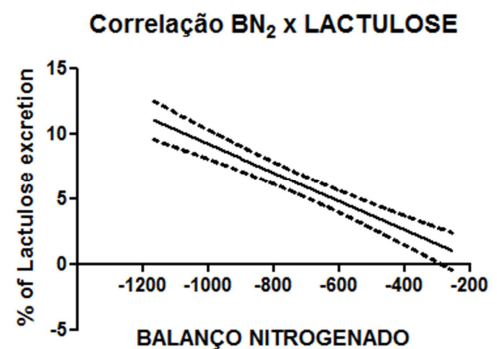
F)

B)



G)

D)



Gráficos representando correlações entre variáveis numéricas agrupando-se animais controles e diabéticos. A representação não pormenoriza os grupos e sim os valores absolutos das variáveis de cada animal, tanto ratos sadios quanto os ratos diabéticos. As variáveis estão dispostas nos gráficos alocados nas abscissas e ordenadas e as linhas representam os valores em regressão linear. O pontilhado que circunda as linhas representam o intervalo de confiança de 95%. Aplicado teste de Rô de Spearman avaliando variáveis não paramétricas, considerando uma correlação estatística para um $p < 0,05$. A) correlação entre os valores de Glicemia do dia 7(D7) x unidades de Mieloperoxidase (MPO) intestinal do íleo em UMPO/mg de tecido; B) Glicemia do dia

7(D7) x razão de Lactulose/ Manitol; C)) Glicemia do dia 7(D7) x concentração de glutathione reduzida (GSH) de amostra de íleo retirada no dia 14 (D14) em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido; D) Correlação entre os valores de balanço nitrogenado (BN_2) quantificado no dia 14 (D14) tanto de animais controles quanto de animais diabéticos x unidades de Mieloperoxidase (MPO) intestinal do íleo em UMPO/mg de tecido também coletado no D14; E) Glicemia do dia 7(D7) x percentual (%) de excreção urinária de lactulose no D14; F) BN_2 x Glicemia do dia 7(D7); G) BN_2 x % excreção de lactulose.

APÊNDICE III – GRÁFICOS PERFUSÃO INTESTINAL COM SOLUÇÕES DE REIDRATAÇÃO

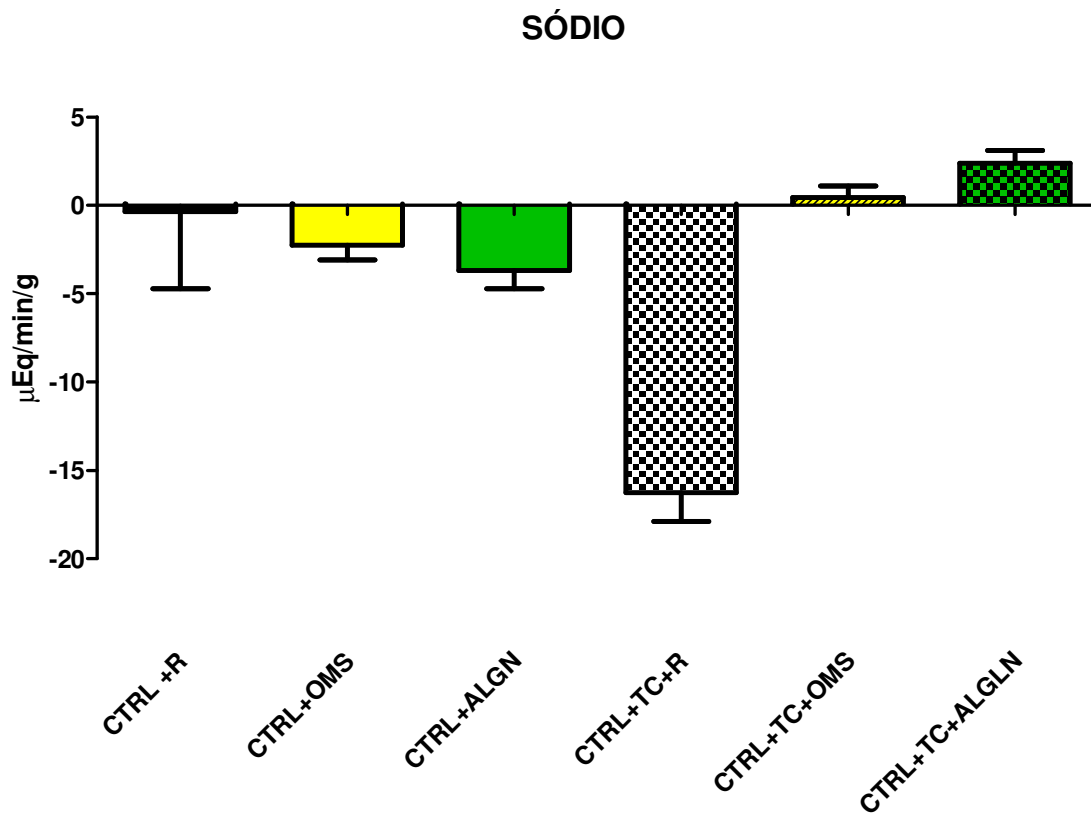


Gráfico apresentando o net de excreção de sódio em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ de animais controles (CTRL) com e sem diarreia induzida pela toxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL +R vs CTRL+OMS	0,1349
CTRL +R vs CTRL+ALGN	0,3855
CTRL +R vs CTRL+TC+R	0,0008
CTRL +R vs CTRL+TC+OMS	0,0194
CTRL +R vs CTRL+TC+ALGLN	0,0050
CTRL+OMS vs CTRL+ALGN	0,2100
CTRL+OMS vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+TC+OMS	0,0143
CTRL+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,0003
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+OMS	0,0019
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+TC+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,0702

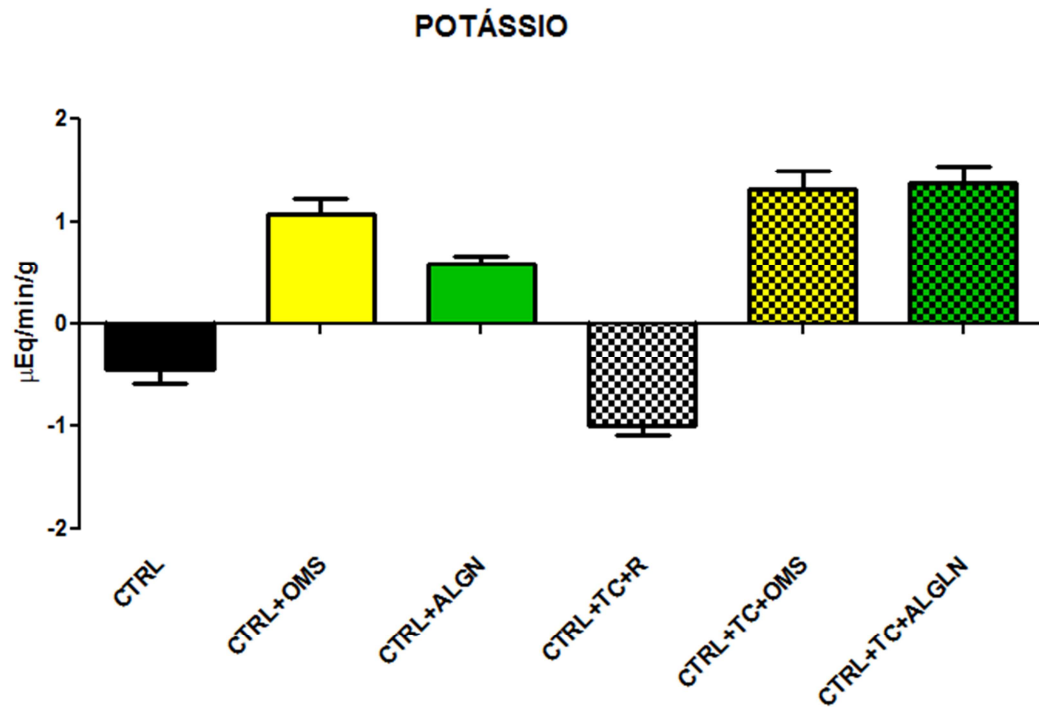


Gráfico apresentando o net de excreção de potássio em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ de animais controles (CTRL) com e sem diarreia induzida pela toxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn´s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL +R vs CTRL+OMS	$P < 0.0001$
CTRL +R vs CTRL+ALGN	$P < 0.0001$
CTRL +R vs CTRL+TC+R	0,0020
CTRL +R vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL +R vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+ALGN	0,0092
CTRL+OMS vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+TC+OMS	0,0741
CTRL+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,0830
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+TC+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,6836

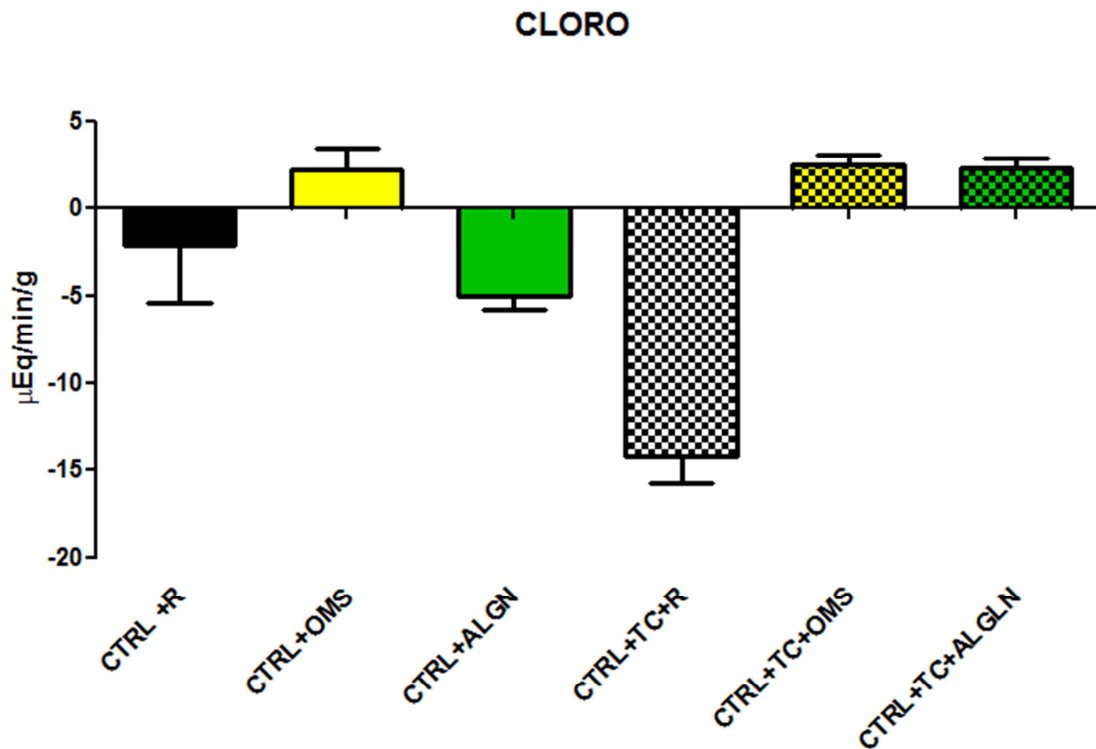


Gráfico apresentando o net de excreção de cloro em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ de animais controles (CTRL) com e sem diarreia induzida pela toxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL +R vs CTRL+OMS	0,0092
CTRL +R vs CTRL+ALGN	0,9903
CTRL +R vs CTRL+TC+R	0,0007
CTRL +R vs CTRL+TC+OMS	0,0021
CTRL +R vs CTRL+TC+ALGLN	0,0016
CTRL+OMS vs CTRL+ALGN	0,0002
CTRL+OMS vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+TC+OMS	0,8626
CTRL+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,8299
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+TC+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,7605

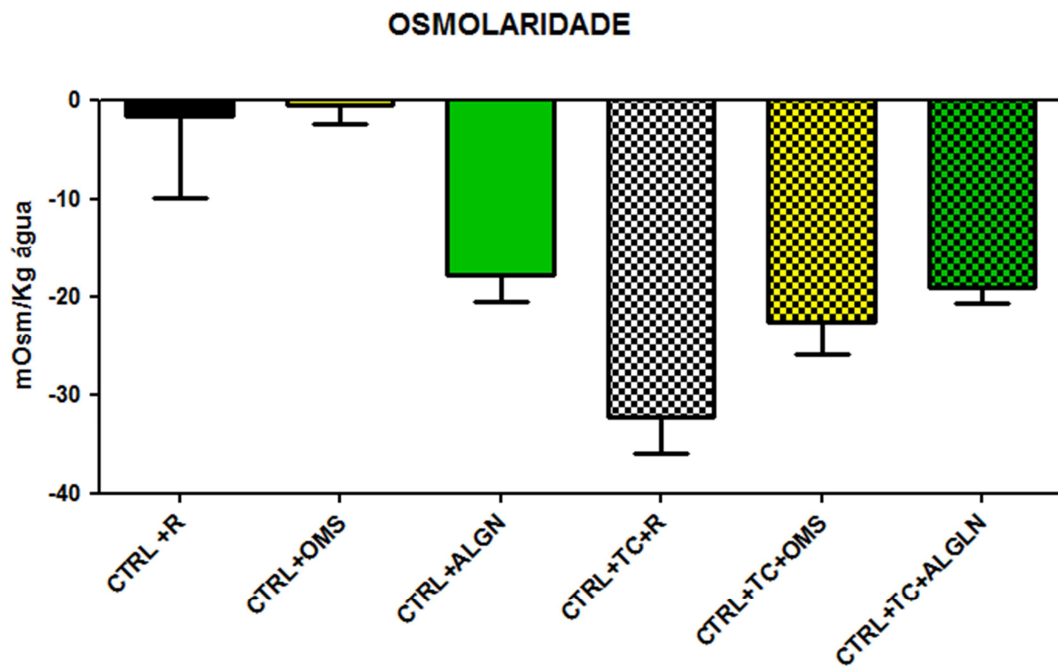


Gráfico apresentando a osmolaridade final mOsm/Kg água. do perfusato intestinal de animais controles (CTRL) com e sem diarreia induzida pelatoxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ One-Way ANOVA e pos roc realizado com teste de Bonferroni

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL +R vs CTRL+OMS	0,3414
CTRL +R vs CTRL+ALGN	0,1679
CTRL +R vs CTRL+TC+R	0,0031
CTRL +R vs CTRL+TC+OMS	0,0516
CTRL +R vs CTRL+TC+ALGLN	0,1171
CTRL+OMS vs CTRL+ALGN	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+TC+R	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+TC+OMS	$P < 0.0001$
CTRL+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	$P < 0.0001$
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+R	0,0080
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+OMS	0,4764
CTRL+ALGN vs CTRL+TC+ALGLN	0,3946
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+OMS	0,0742
CTRL+TC+R vs CTRL+TC+ALGLN	0,0093
CTRL+TC+OMS vs CTRL+TC+ALGLN	0,7244

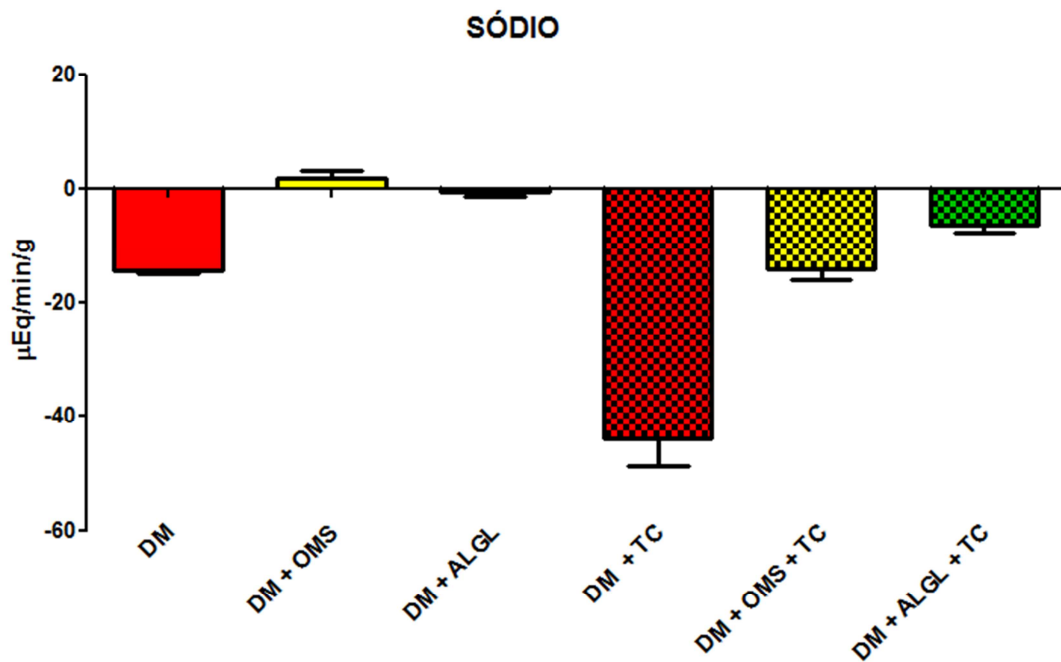


Gráfico apresentando o net de excreção de sódio em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ de animais diabéticos (DM) com e sem diarreia induzida pela toxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
DM vs DM + OMS	$P < 0.0001$
DM vs DM + ALGL	$P < 0.0001$
DM vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM vs DM + OMS + TC	0,7229
DM vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + ALGL	0,0815
DM + OMS vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + TC vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + TC vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS + TC vs DM + ALGL + TC	0,0028

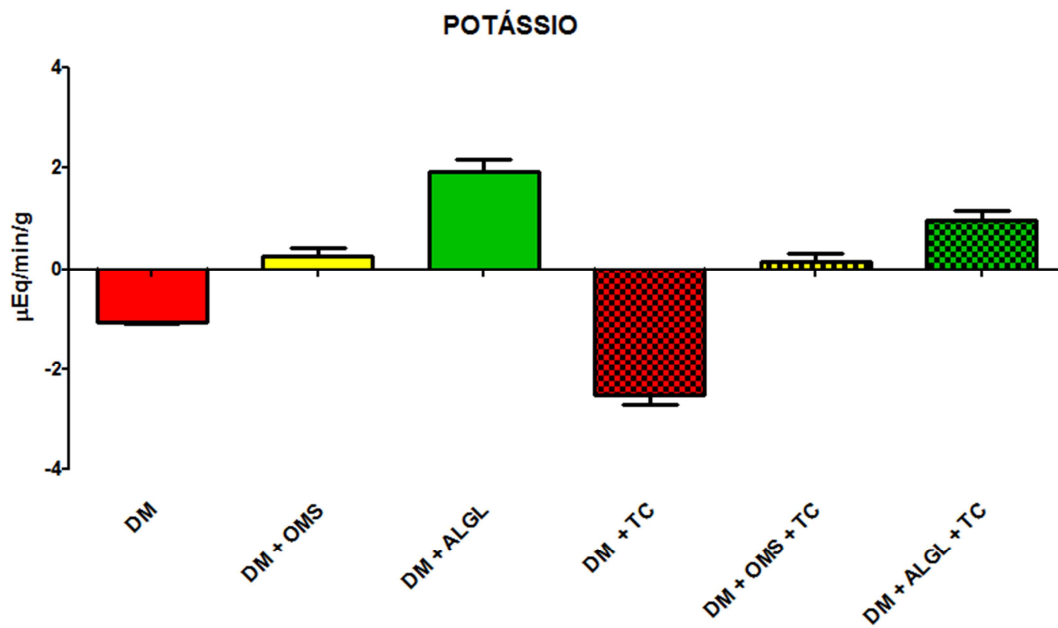


Gráfico apresentando o net de excreção de potássio em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ de animais diabéticos (DM) com e sem diarreia induzida pela toxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn´s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
DM vs DM + OMS	$P < 0.0001$
DM vs DM + ALGL	$P < 0.0001$
DM vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + ALGL	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + OMS + TC	0,5226
DM + OMS vs DM + ALGL + TC	0,0634
DM + ALGL vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + ALGL + TC	0,0018
DM + TC vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + TC vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS + TC vs DM + ALGL + TC	0,0094

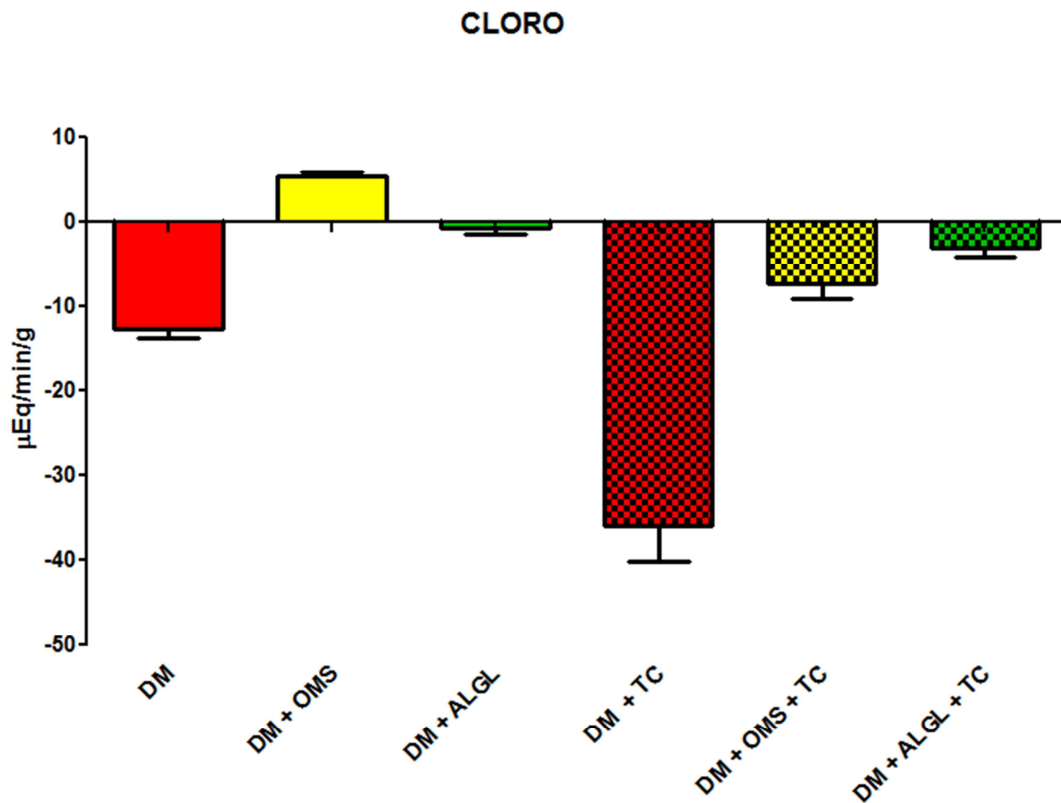


Gráfico apresentando o net de excreção de sódio em $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$ de animais diabéticos (DM) com e sem diarreia induzida pela toxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
DM vs DM + OMS	$P < 0.0001$
DM vs DM + ALGL	$P < 0.0001$
DM vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM vs DM + OMS + TC	0,0428
DM vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + ALGL	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + OMS + TC	0,0029
DM + ALGL vs DM + ALGL + TC	0,1869
DM + TC vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + TC vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS + TC vs DM + ALGL + TC	0,0442

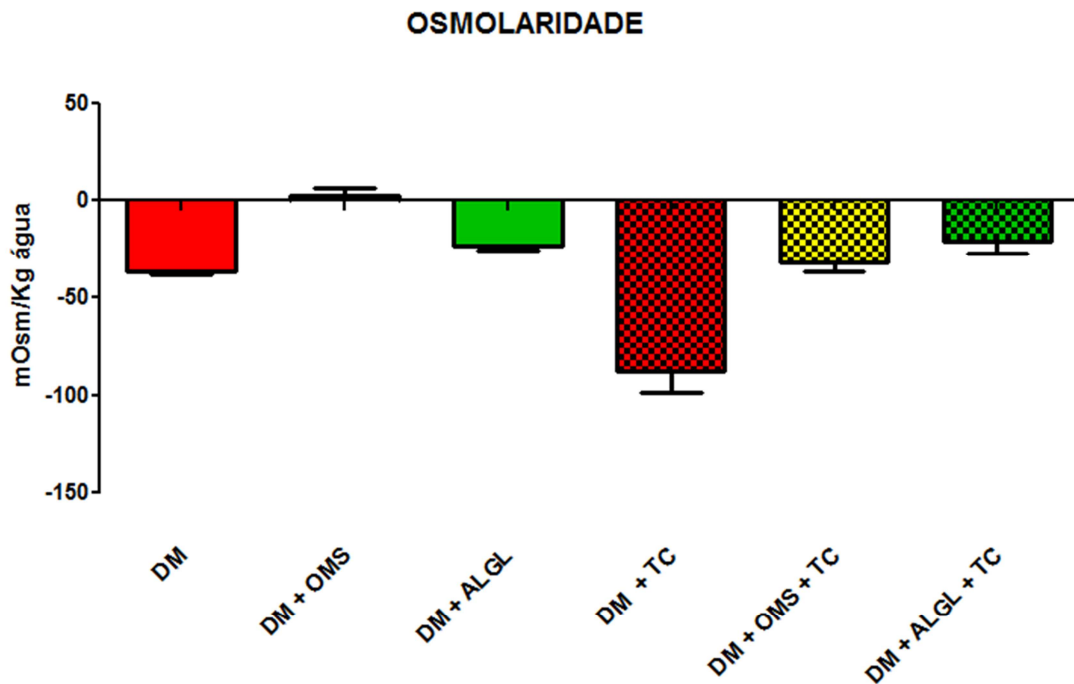
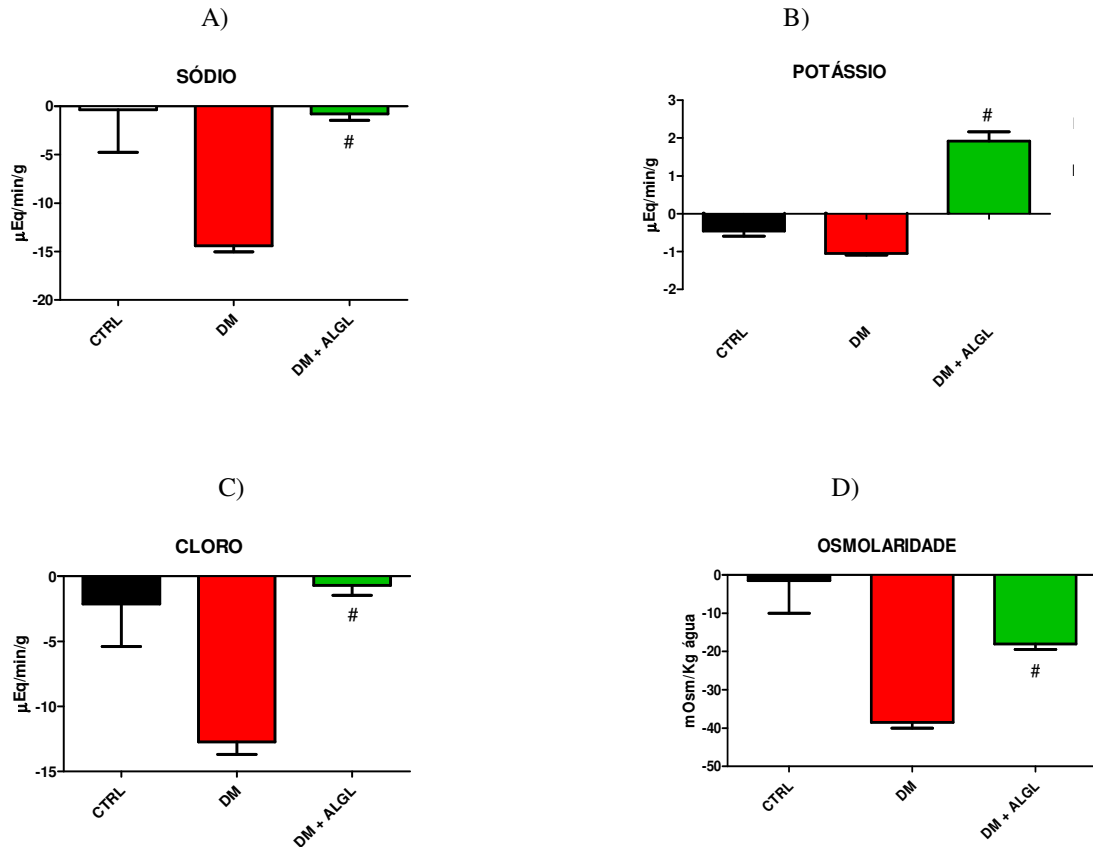


Gráfico apresentando a osmolaridade final mOsm/Kg água. do perfusato intestinal de animais diabéticos (DM) com e sem diarreia induzida pelatoxina do cólera (TC) e perfusão intestinal com soluções de reidratação – Ringer (R), solução a base de glicose da Organização Mundial da Saúde (OMS), solução a base de Alanil-glutamina (ALGLN) Valores negativos representando excreção. Todos Os valores são apresentados como média \pm EPM, avaliação estatística para grupos não pareados * $p < 0,05$ Kruskal – Wallis test, Dunn’s multiple comparison test.

Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
DM vs DM + OMS	$P < 0.0001$
DM vs DM + ALGL	0,0003
DM vs DM + TC	0,0006
DM vs DM + OMS + TC	0,5131
DM vs DM + ALGL + TC	0,0017
DM + OMS vs DM + ALGL	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS vs DM + ALGL + TC	0,0010
DM + ALGL vs DM + TC	$P < 0.0001$
DM + ALGL vs DM + OMS + TC	0,3823
DM + ALGL vs DM + ALGL + TC	0,3648
DM + TC vs DM + OMS + TC	$P < 0.0001$
DM + TC vs DM + ALGL + TC	$P < 0.0001$
DM + OMS + TC vs DM + ALGL + TC	0,1878

APÊNDICE VI – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRÁFICOS DAS FIGURAS 28 E 29

Figura – 28. Avaliação da eficácia da solução de Alanil-glutamina na recuperação da perda hidroeletrolítica de animais diabéticos



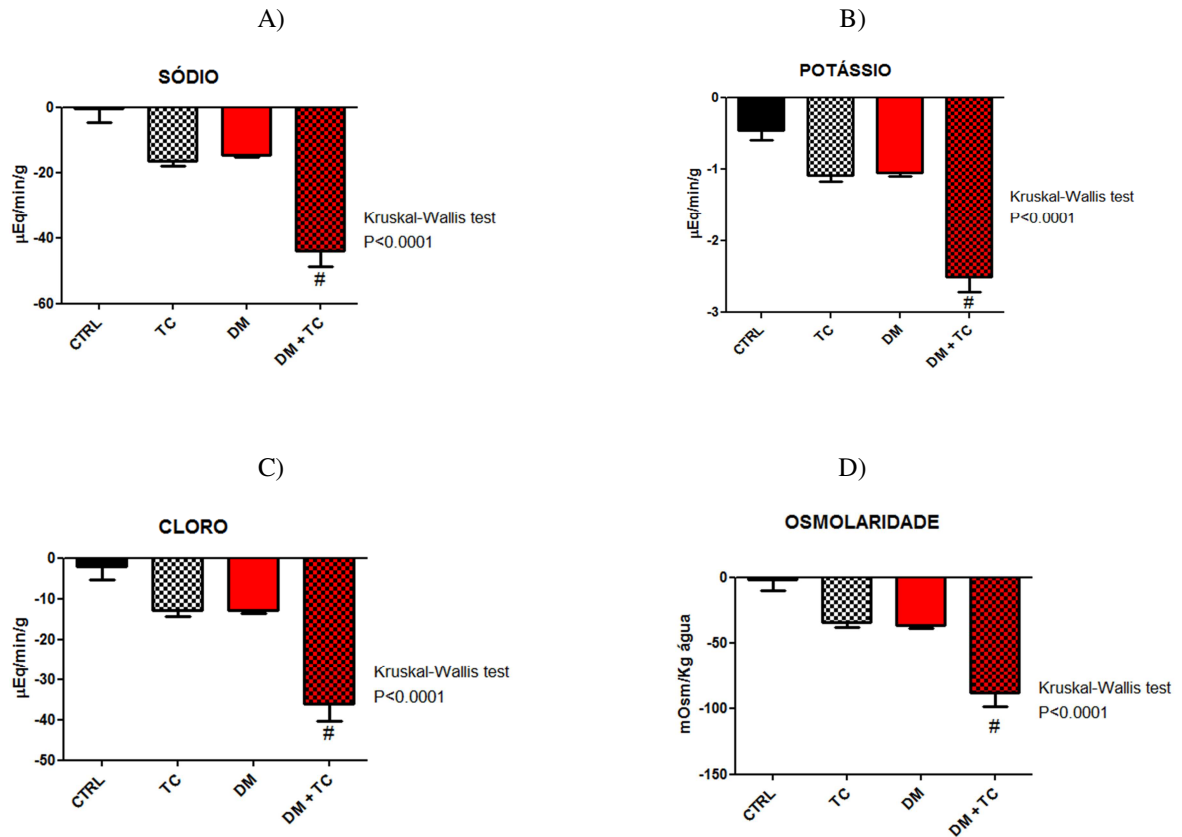
SÓDIO - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	
CTRL vs DM	Valor de p 0,0003
CTRL vs DM + ALGL	0,0491
DM vs DM + ALGL	P<0.0001

POTÁSSIO - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	
CTRL vs DM	Valor de p 0,0002
CTRL vs DM + ALGL	P<0.0001
DM vs DM + ALGL	P<0.0001

CLORO - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	
CTRL vs DM	Valor de p 0,0014
CTRL vs DM + ALGL	0,0491
DM vs DM + ALGL	P<0.0001

OSMOLARIDADE - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	
CTRL vs DM	Valor de p P<0.0001
CTRL vs DM + ALGL	0,2703
DM vs DM + ALGL	P<0.0001

Figura – 29. Alteração hidroeletrólítica em modelo de diarreia secretória induzida pela toxina do cólera em animais controles e diabéticos



SÓDIO - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL vs TC	0,0008
CTRL vs DM	0,0003
CTRL vs DM + TC	P<0.0001
TC vs DM	0,8398
TC vs DM + TC	P<0.0001
DM vs DM + TC	P<0.0001

POTÁSSIO - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL vs TC	0,0004
CTRL vs DM	0,0002
CTRL vs DM + TC	P<0.0001
TC vs DM	0,5160
TC vs DM + TC	P<0.0001
DM vs DM + TC	P<0.0001

CLORO - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL vs TC	0,0041
CTRL vs DM	0,0014
CTRL vs DM + TC	P<0.0001
TC vs DM	0,6707

TC vs DM + TC	P<0.0001
DM vs DM + TC	P<0.0001

OSMOLARIDADE - Avaliação estatística entre os grupos – Mann Whitney	Valor de p
CTRL vs TC	0,0015
CTRL vs DM	0,0002
CTRL vs DM + TC	P<0.0001
TC vs DM	0,3862
TC vs DM + TC	P<0.0001
DM vs DM + TC	0,0006

ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA DE JUNÇÕES FIRMES CLAUDINAS NA BARREIRA PARACELULAR INTESTINAL E DA FUNÇÃO DO CANAL DE ÍON SÓDIO NO MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1", protocolo n°55/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de n°8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 10 de maio de 2016, e adendo aprovado em 27 de junho de 2017.

Vigência do projeto	14/03/2016 a 31/01/2018
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
N° de Animais	80 + 60
Peso/Idade	250-300g – 13-15 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 09 de agosto de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA - UFC