

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Universidade da Beira Interior
2009



**EFEITO DA SITAGLIPTINA NUM MODELO
ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 –
DESMETABOLISMO, STRESSE OXIDATIVO E
INFLAMAÇÃO**

Liliana Figueiredo Ferreira

Orientador: Doutor Flávio Reis

***Co-orientadora: Professora Doutora Petronila Rocha
Pereira***

ÍNDICE

Agradecimentos	7
Publicações e Comunicações Científicas	9
Lista de Abreviaturas	11
Resumo – Abstract	15
<u>Parte I</u>	
Introdução – Revisão da Literatura	21
<i>Capítulo I</i> - Epidemiologia e fisiopatologia da obesidade e da Diabetes Mellitus Tipo 2	23
1 – Diabetes e síndrome metabólica: definição	23
2 - Prevalência	25
3 - Hereditariedade	30
4 - Diagnóstico	30
5 - Fisiopatologia da hiperglicemia	32
6 – Papel da insulina	33
6.1 - Secreção de insulina na DMT2	34
6.2 - Insulino-resistência (IR)	36
7 - Metabolismo/dismetabolismo da glicose e dos lipídeos na insulino-resistência	39
7.1 - Glicotoxicidade e IR	39
7.2 - Dislipidemia e IR	40
8 - Obesidade, ácidos gordos livres e inflamação na IR	42
9 - Stresse oxidativo na insulino-resistência	47
<i>Capítulo II</i> – Pâncreas: inflamação e stresse oxidativo na disfunção das células β	49
1 - Morfologia do pâncreas	49
2 - Perturbações de função e massa na DMT2	49
3 - Papel da inflamação na disfunção dos ilhéus de Langherhans	51
4 - Papel do stresse oxidativo na disfunção dos ilhéus de Langherhans	53
<i>Capítulo III</i> - Modelos Experimentais (animais) de obesidade e DMT2: o rato <i>Zucker Diabetic Fatty</i> (ZDF)	55
1 – Ratos <i>Zucker Diabetic Fatty</i> (ZDF)	56
<i>Capítulo IV</i> - Terapêutica actual da DMT2: O papel das incretinas	59
1 - Fármacos utilizados no tratamento da DMT2 e sua eficácia terapêutica	60
1.1 - Necessidade de um tratamento faseado para monitorização da DMT2	60
1.1.1 - Sensibilizadores da insulina	61

a) Metformina (MET)	61
b) Tiazolidinedionas (TZD)	62
1.1.2 - Secretagogos	63
c) Sulfonilureas	63
d) Secretagogos não-sulfonilureia	63
e) Inibidores α -glucosidase	64
f) Insulina	64
2- Incretinas	68
2.1 – “Conceito incretina”	68
2.2 - Incretinas na DMT2	74
2.2.1 - Diminuição do efeito incretina na DMT2	74
2.2.2 - Potencial terapêutico de GLP-1	76
2.3 - Incretinomiméticos	77
2.4 – Inibidores da DPP-IV - Gliptinas	78
2.5 – Sitagliptina	80
2.5.1 – Mecanismo de acção	82
2.5.2 – Estabilidade e segurança	82
2.5.3 – Lugar na terapêutica da DMT2	83

Parte II

Definição e Justificação dos Objectivos	87
--	----

Parte III

Material e Métodos	95
1 – Animais e dietas: “Desenho” do estudo	95
1.1 – Animais e Dieta	95
1.2 – Preparação do Fármaco	96
1.3 – “Desenho” do estudo	96
1.4 – Determinação do peso corporal	99
1.5 – Avaliação do perímetro abdominal	99
1.6 – Avaliação da variação dos níveis de glicemia	99
1.7 – Pressão arterial	100
1.7.1 – Medição da pressão arterial sistólica, diastólica e média e da frequência cardíaca	100
1.5.2 – Cálculo da pressão diferencial	100
1.8 – Sacrifício dos animais, colheita de sangue e órgãos	101
2 – Avaliação dos parâmetros metabólicos	101
2.1 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos	102

2.1.1-Glicose	102
2.1.2 - Col-total, Col-HDL, Col-LDL e TG	103
2.1.3 - Insulina	103
2.1.4 – Cálculo do HOMA-IR	103
2.1.5 – Hemoglobina glicosilada	104
2.1.6 – Hemograma	105
2.1.7 – Medição da Agregação Plaquetar	105
2.2 – Avaliação da função renal	106
2.2.1 – Creatinina	106
2.2.2 - Ureia	107
2.3 – Avaliação da função pancreática	107
3 – Avaliação do stresse oxidativo	108
3.1 – Avaliação da agressão oxidativa	108
3.1.1 – Doseamento de TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances)	108
3.1.2 – Medição da concentração plasmática de 3-nitrotirosina (3-NT)	109
3.2 - Defesas não enzimáticas contra o stresse oxidativo	109
3.2.1 – Quantificação do Estado Antioxidante Total (TAS)	109
4 – Avaliação do perfil inflamatório	110
4.1 – Adiponectina	111
4.2 – Interleucina-6 (IL-6)	111
4.3 – Interleucina-1 β (IL-1 β)	111
4.4 – Factor de Necrose Tumoral (TNF- α)	111
4.5 – Proteína C Reactiva (PCR)	112

Parte IV

Resultados	116
1 – Evolução do peso corporal e do perímetro abdominal	116
1.1 – Peso Corporal	116
1.1 – Perímetro abdominal	117
2 – Monitorização da comida ingerida	119
3 – Pressão arterial e trofismo cardíaco	120
3.1 – Indicadores de trofismo cardíaco	120
3.2 – Pressão arterial e frequência cardíaca	123
4 – Perfil glucídico	124
4.1 – Glicemia	124
4.2 – Hemoglobina glicosilada (HbA1c)	126
4.3 – Insulina	127

4.4 – Resistência à insulina – HOMA-IR	128
5 – Perfil lipídico	129
5.1 – Colesterol total	129
5.5 – Índices aterogénicos	135
7 – Função pancreática	140
7.1 – Trofismo do pâncreas	140
7.2 – α - amilase sérica	141
8 – Hemograma e agregação plaquetar	142
8.1 – Hemograma	142
8.2 – Agregação plaquetar	145
9 – Marcadores de estado redox	146
9.1 – Peroxidação lipídica (MDA)	146
9.1.1 – Em soro	146
9.1.2 – Tecidual	147
9.2 – Estado antioxidante total	149
9.3 – Malondialdeído (MDA)/Estado Antioxidante Total (TAS)	151
9.4 – 3-Nitrotirosina (3-NT)	152
10 – Perfil inflamatório	153
10.1 – Avaliação dos níveis de adipocitocinas	153
10.1.1 – Adiponectina	153
10.1.2 – Interleucina-1 β (IL-1 β)	154
10.1.3 – Interleucina-6 (IL-6)	155
10.1.4 – Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)	157
10.2 – Avaliação de proteínas de fase aguda	158
10.2.1 – Proteína C reactiva (PCR)	158

Parte V

Discussão	1901
-----------	------

Parte VI

Conclusões	183
------------	-----

Parte VII

Referências Bibliográficas	187
----------------------------	-----

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor Professor Doutor Frederico Teixeira, Director do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra, não só pela forma como me acolheu, como pelo privilégio da sua orientação científica, e pela disponibilização de todos os meios necessários à realização deste trabalho.

Ao Senhor Doutor Flávio Reis expresso a mais profunda gratidão por todos os ensinamentos que me transmitiu e por toda a sua capacidade de trabalho e inteligência. Agradeço pela forma como sempre me incentivou, encorajou e apoiou, pela sua amizade e postura generosa. Espero ter sido merecedora da confiança que em mim depositou.

À Professora Doutora Pretronila Rocha Pereira o meu agradecimento pelo apoio e amizade, sempre manifestados ao longo da realização do trabalho.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Edite Lemos por todo o entusiasmo, determinação, rigor, amizade e pela sua capacidade de transmitir os seus conhecimentos científicos.

Agradeço de uma forma especial a minha colega Dr^a Filipa Pinto pela sua forte contribuição para esta dissertação, com todo o companheirismo e incentivo que me demonstrou, de forma a ter tornado tudo parecer mais simples.

Um agradecimento extensivo a todos os que integram o Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra, em especial à Senhora Dona Graciela, à Dr^a Joana Gonçalves, à Dr^a Sofia Baptista, à Dr^a Patricia Garrido, ao Dr José Sereno, ao Dr Belmiro Parada e à Senhora Doutora Teresa Morgadinho, pela amizade e ambiente de trabalho que jamais esquecerei.

Agradeço a todos os meus amigos, em particular à Anaisa, à Liliana, ao José Raimundo e ao José Gedeão, a amizade e a compreensão para as opções e privações a que os submeti para a satisfação deste trabalho.

Por fim, AGRADEÇO E DEDICO esta tese às pessoas que me aceitam incondicionalmente, não só por se mostrarem sempre presentes, transmitindo um amor indiscriminado, mas por serem as pessoas que mais acreditam em mim.

Ao meu PAI, à minha MÃE, ao meu irmão MIGUEL, à minha AVÔ CECÍLIA e em especial ao meu AVÔ AGOSTINHO.

PUBLICAÇÕES e COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

a) – Publicações em Revistas Científicas:

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, J Sereno, **L Ferreira**, AF Pinto, F Teixeira. Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population. 9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 – 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

N Piloto, F Reis, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, J Sereno, E Costa, R Pinto, AF Pinto, **L Ferreira**, P Rocha-Pereira, A Santos-Silva, F Teixeira. Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model. 9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 – 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

b) – Comunicações em Reuniões Científicas:

Sereno J, Parada B, Reis F, Teixeira-Lemos E, Garrido P, **Ferreira L**, Cunha MF, Rocha-Pereira P, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Selective cyclooxygenase-2 inhibition promotes efficient chemopreventive on a rat model of bladder cancer. Eur J Cancer Prev 2009 (submetido).

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, J Sereno, **L Ferreira**, AF Pinto, F Teixeira. Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population. Proc Eur Assoc Clin Pharmacol 2009 (*no prelo*).

N Piloto, F Reis, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, J Sereno, E Costa, R Pinto, AF Pinto, **L Ferreira**, P Rocha-Pereira, A Santos-Silva, F Teixeira. Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model. Proc Eur Assoc Clin Pharmacol 2009 (*no prelo*).

N Piloto, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, J Sereno, **L Ferreira**, E Costa, L Belo, A Santos-Silva, P Rocha-Pereira, J Pego, G Marques, M Lourenço, CA Tavares, R Alves, F Teixeira, F Reis. Toxicological effects of recombinant human erythropoietin doping – chronic versus acute aerobic exercise. Proceedings IALM 2009 (*no prelo*).

Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population
E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido¹, J Sereno, F Melo¹, **L Ferreira**, AF Pinto, F Teixeira
Basic & Clin Pharmacol Toxicol 2009; 105(Suppl. 1): 146.

Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model
N Piloto¹, F Reis¹, HM Teixeira², E Teixeira-Lemos¹, B Parada¹, P Garrido¹, J Sereno, E Costa, R Pinto, AF Pinto, **L Ferreira**, P Rocha-Pereira, A Santos-Silva, F Teixeira
Basic & Clin Pharmacol Toxicol 2009; 105(Suppl. 1): 147.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	- acetil CoA síntase
ADP	- difosfato de adenosina
AG	- ácidos gordos
AGL	- ácidos gordos livres
AMPK	- cinase do AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
ATG	- anomalia da tolerância à glicose
ATP	- trifosfato de adenosina
cAMP	- AMP cíclico
CETP	- proteína de transferência de ésteres de colesterol
col-HDL	- fracção de colesterol associado a lipoproteínas de alta densidade
col-LDL	- fracção de colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade
CVE	- coeficiente de variação eritrocitária
DCV	- doença cardiovascular
DM	- diabetes mellitus
DMT2	- diabetes mellitus tipo 2
DPP-II	- dipeptidil peptidase-II
DPP-IV	- dipeptidil peptidase-IV
DPP-IX	- dipeptidil peptidase-IX
DPP-VIII	- dipeptidil peptidase-VIII
DTG	- diminuição da tolerância à glicose
FAP- α	- proteína α activada por fibroblastos (<i>fibroblast-activating protein-α</i>)

FATP	- proteína transportadora de ácidos gordos (<i>fatty-acid transport protein</i>)
GIP	- peptídeo insulínico dependente de glucose (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide ou gastric inhibitory polypeptide</i>)
GLDH	- glutamato-desidrogenase
GLP-1	- peptídeo-1 do tipo glucagina (<i>glucagon- like peptide-1</i>)
GLUT2	- transportador de glicose-2
GLUT4	- transportador de glicose-4
GOD	- glicose oxidase
GRP	- peptídeo libertador de gastrina (<i>gastrin release peptide</i>)
GV	- glóbulo vermelho
HbA1c	- hemoglobina glicosilada
HCT	- hematócrito
HGB	- hemoglobina
HOMA- β	- <i>homeostase model assessment-β</i>
HOMA IR	- índice de avaliação da insulino- resistência
IGF-1	- factor de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>insulin growth factor-1</i>)
IL-1	- interleucina-1
IL-1 β	- interleucina-1 β
IL-6	- interleucina-6
IMC	- índice de massa corporal
IR	- insulino-resistência ou resistência à insulina
IRS	- substrato do receptor de insulina (<i>insulin receptor substrate</i>)
IRS-1	- substrato do receptor de insulina-1

LPL	- lipoproteína lipase
MET	- metformina
NF-κB	- factor nuclear kappa-B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
3-NT	- 3-nitrotirosina
PA	- pressão arterial
PACAP	- proteína pituitária activadora de adenilato ciclase (<i>pituitary adenylate cyclase-activating protein</i>)
PAD	- pressão arterial diastólica
PAI-1	- inibidor do activador de plasminogenio-1 (<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PAM	- pressão arterial média
PAS	- pressão arterial sistólica
PCR	- proteína C reactiva
PD	- pressão diferencial
PDX-1	- <i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PI-3K	- fosfatidil inositol-3 cinase
PLT	- plaqueta
POD	- peroxidase
PP	- polipeptídeo pancreático
PPAR-γ	- Receptor γ Activado do Proliferador dos Peroxisomas (<i>peroxisome proliferated activated receptor-γ</i>)
PRP	- plasma rico em plaquetas
ROS	- espécies reactivas de oxigénio
SUR-1	- receptor da sulfonilurea-1
TA	- tecido adiposo
TAS	- estado antioxidante total (<i>total antioxidant status</i>)
TBA	- ácido tiobarbitúrico
TBAR	- espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico

	<i>(Tiobarbituric Acid Reactive Substances)</i>
TG	- triglicéridos
TGF- β	- factor de transformação do crescimento- β
TNF- α	- factor de necrose tumoral- α
TZD	- tiazolidinedionas
VCM	- volume corpuscular médio
VLDL	- lipoproteínas de muito baixa densidade
ZDF	- <i>Zucker Diabetic Fatty</i>

ACRÓNIMOS

ADA	- <i>American Diabetes Association</i>
APDP	- Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal
DGS	- Direcção Geral da Saúde
EASD	- European Association for the Study of Diabetes
EMA	- <i>European Medicines Agency</i>
SPD	- Sociedade Portuguesa de Diabetologia
UKPDS	- United Kingdom Prospective Diabetes Study
WHO	- <i>World Health Organisation</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
WHO	- Word Health Oprganization

RESUMO – *ABSTRACT*

RESUMO

A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é a desregulação endócrina mais comum a nível mundial, abrangendo 90 a 95% dos casos de diabetes, e é considerada a primeira causa da elevada mortalidade e morbidade cardiovascular. A patogénese da doença envolve anomalias no metabolismo da glicose e lipídeos, incluindo a secreção irregular de insulina das células β pancreáticas e a resistência à actividade desta hormona.

Considerando a obesidade mundial, as previsões de um aumento da prevalência da diabetes de 135 milhões em 1997 para 300 milhões em 2030, em todas as faixas etárias, não são surpreendentes. Como nem todos os obesos desenvolvem esta doença, algumas interacções entre a susceptibilidade genética e factores ambientais contribuem para o crescimento desta doença epidémica. Desta forma, a prática de exercício físico, em conjunto com alterações na dieta, constituem ferramentas importantes na prevenção do aparecimento e atenuação da progressão da DMT2. Contudo, por vezes estas medidas relacionadas com a modificação do estilo de vida não são suficientes e são adoptadas algumas estratégias farmacológicas.

Já na segunda metade desta década, as entidades responsáveis pela introdução de medicamentos nos EUA e Europa (FDA e EMEA, respectivamente) aprovaram a sitagliptina de forma a melhorar o controlo glicémico em pacientes com DMT2, sendo o primeiro de uma nova classe de inibidores da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV). O seu mecanismo de acção passa pelo aumento dos efeitos de duas hormonas incretinas insulino-trópicas, a GIP e a GLP-1, por inibição da enzima responsável pelas suas degradações, a DPP-IV. Estas incretinas, libertadas pelo intestino em resposta a uma refeição, têm um papel de elevada importância na homeostase da glicose, assim como no aumento da função das células β , em resultado da inibição da apoptose e proliferação das mesmas. Desta forma, a sitagliptina torna-se uma hipótese na terapêutica para a prevenção ou progressão da DMT2. Contudo, sendo a diabetes uma doença caracterizada por diferentes estadios, ainda se encontra por definir em qual fase esta opção farmacológica deve ser adoptada para que se obtenha a máxima eficácia.

Por ser difícil a avaliação de todos os efeitos bioquímicos e fisiológicos da sitagliptina em humanos diabéticos, optamos pela utilização de um modelo ajustado com elevada relevância e utilidade, o rato *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF).

Neste contexto, foi objectivo primordial do presente trabalho, a avaliação da eficácia da sitagliptina na prevenção e progressão da DMT2, nas três fases principais da doença, procurando entender os mecanismos bioquímicos subjacentes.

Deste modo, definimos 4 grupos de ratos diabéticos, ZDF (*fa/fa*), 3 deles com diferentes tempos de início administração com sitagliptina, e um sem qualquer tratamento. Assim, o primeiro grupo com sitagliptina iniciou a administração com 8 semanas de idade, ou seja numa fase ainda pré-diabética; às 14 semanas foi iniciado o tratamento do segundo grupo, correspondendo a uma fase de marcada intolerância à glicose e hiperglicemia, e o último grupo às 20 semanas de idade, já com uma diabetes mais severa. Nas mesmas condições, foram também definidos 4 grupos de ratos controlo ZDF (+/+). De forma a atingir mais facilmente o objectivo deste estudo, o sacrifício dos animais foi dividida em 3 tempos, mais precisamente às 8, 20 e 26 semanas de idade.

A finalidade do nosso estudo abrangeu também a caracterização deste modelo animal, com avaliação do perfil glicémico e lipídico, assim como o balanço oxidativo e o estado inflamatório. Depois de conhecidas as alterações metabólicas do modelo, avaliámos as alterações (dos mesmos parâmetros) estabelecidas pela administração da sitagliptina.

Os resultados obtidos indicaram claramente que a administração a partir das 20 semanas de idade seria o melhor tempo para iniciar o tratamento com sitagliptina, pois foi o único grupo com baixos níveis de glicose, HbA1c, resistência à insulina e peroxidação lipídica (MDA). Ou seja, a sitagliptina parece ter resultados mais positivos quando administrada numa fase de diabetes severa, com um elevado dismetabolismo e disfunção das células β . Contudo, este fármaco mostrou algumas limitações em estabilizar alguns parâmetros avaliados, como o perfil glicémico. Neste contexto, são necessários mais estudos para clarificar o real potencial desta opção terapêutica, pondo a hipótese de uma terapia combinada com outros antihiperglicémicos, já existentes no mercado.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is the most common endocrine disorder worldwide, covering 90–95% of all diabetes cases and is the prime cause for the high cardiovascular morbidity and mortality. The pathogenesis of the disease involves abnormalities in glucose and lipid metabolism, including inadequate insulin secretion from pancreatic beta-cells and resistance to insulin activity (insulin resistance).

Considering the worldwide obesity epidemic, predictions of increasing diabetes prevalence from 135 millions in 1997 to 300 millions in 2030, in every age group, are not surprising. Since not every obese person develops T2D, some interaction between genetic susceptibility and environmental factors is clearly involved in the continuing diabetes epidemic. Thus, the regular practice of physical exercise, together with changes in diet, constitutes important therapeutic tools in the prevention of development and attention of progression of DT2. However, this life-style modifications could not be enough and pharmacological strategies are needed.

In the second half of this decade, the US and Europe authorities for drugs administration (FDA and EMEA, respectively) have approved sitagliptin in order to improve glycemic control in patients with type 2 diabetes, becoming the first compound in a new class of medications witch inhibit the enzyme dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). Sitagliptin mechanism of action involves the increment in the effects of incretin hormones insulintropics, GIP and GLP-1, by inhibition of DPP-IV, responsible for their degradation. Secreted in the intestine in response to food, GIP and GLP-1 have a key role in the regulation of glucose homeostasis and promotes β -cell resistance to apoptosis, proliferation, and neogenesis, resulting in enhanced β -cell function. As a result, sitagliptin has become a new and important therapeutic hypothesis for T2D prevention. However, being diabetes a disease with different stages, is not well defined in which phase of the disease this pharmacologic option should be used in order to obtain the maximal efficacy.

The accomplishment of studies able to evaluate the physiological and biochemical effects of sitagliptin in diabetic humans is complicated. In such circumstances, the use of

an adjusted model, such as the rat *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF), can constitute an alternative of extreme relevancy and utility.

In this context, the main aim of our work was to evaluate the effectiveness of sitagliptin in the prevention and progression of T2D, in the three key stages of the disease, as well as to assess the underlying biochemical mechanisms.

Thus, we have defined four groups of diabetic rats, ZDF (*fa/fa*), 3 of them with different times for starting sitagliptin administration treatment and one of them without any treatment. The first group with sitagliptin started the administration in a pre-diabetes phase, with 8 weeks of age; at 14 weeks, the second group of rats started the treatment, in a phase of consistent glucose intolerance, hyperglycaemia and hyperinsulinemia; and the last one at 20 weeks in a severe diabetes phase. In the same conditions, we also defined 4 groups of control rats ZDF (+/+). In an attempt to easily achieve the aim of the study, the rats sacrifice was divided in 3 times: at 8, 20 e 26 weeks of age.

The general purpose of our work also includes the characterization of this animal model, with evaluation of glycaemic and lipid profile, as well as the oxidative balance and the inflammatory status. After knowing the alterations observed in this experimental model, it was figured important to evidence the alterations due to sitagliptin administration.

The obtained results clearly showed the 20 weeks as the best time for starting the sitagliptin administration, being the only group to present lower values of glycaemia, HbA1c, insulin resistance and lipid peroxidation (MDA). That is, sitagliptin was able to promote better results when given in a more severe diabetes, with high dysmetabolism and β cell dysfunction. However, sitagliptin seems to have some limitations concerning the control of some parameters, such as the glycaemic profile. In this context, more studies are needed to clarify the real value of this therapeutic option, namely by testing a combined therapy with other anti-hyperglycaemic drugs already in the market.

Parte I

INTRODUÇÃO – REVISÃO DA LITERATURA

Capítulo I - Epidemiologia e fisiopatologia da obesidade e da Diabetes Mellitus Tipo 2

1 – Diabetes e síndrome metabólica: definição

A Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de anomalias metabólicas, caracterizada pela hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou acção da insulina.

As maiores subclasses da DM incluem a DM gestacional, a DM tipo 1, definida por uma deficiência dramática da insulina em resultado da destruição autoimune das células β do pâncreas, e a DM tipo 2 (Marchetti e col., 2008).

Representando cerca de 90% dos casos de DM, a DM2 foi tradicionalmente vista como uma patologia unicamente relacionada com a resistência à insulina e alterações na sua secreção. No entanto, esta visão está a ser rapidamente alterada. Hoje em dia, a DM2 é vista como um contínuo de alterações metabólicas, que inclui a pré-diabetes e a síndrome metabólica, envolvendo defeitos específicos no ciclo da insulina, bem como outras perturbações metabólicas (Dominiczak, 2003).

A síndrome metabólica é um termo que descreve um grupo de alterações metabólicas, que predispõem a doenças cardiovasculares e diabetes, associando factores de risco, tais como a resistência à insulina, o aumento dos triglicéridos (TG), a diminuição do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (col-HDL) e a pressão arterial elevada. Na presença destes factores verifica-se um risco aumentado de cerca de 1,5 a 3 vezes maior para desenvolver doença coronária e de um risco 3 a 5 vezes superior para a diabetes (Fig. 1) (Eckel, 2007). A alta prevalência desta síndrome metabólica é um motivo de grande preocupação no mundo global.

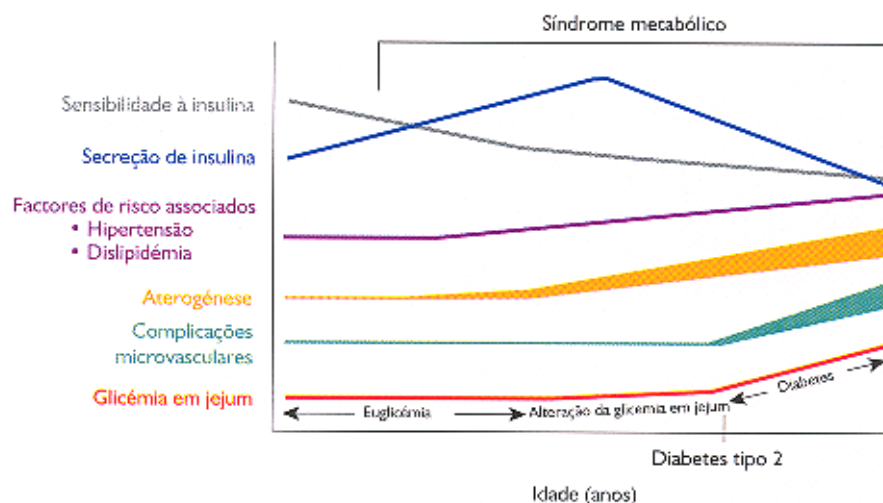


Figura 1 – Demonstração esquemática do desenvolvimento da síndrome metabólica na história natural da DMT2 (adaptado de Cefalu e Cannon, 2007). À medida que se desenvolve o síndrome metabólico verifica-se um aumento da prevalência dos factores de risco associados, que se observam muitos anos antes do diagnóstico da DMT2. Para além disso, o risco de DCV agrava-se substancialmente durante este período.

A obesidade é um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de DMT2. Um índice de massa corporal (IMC) de 31 kg/m^2 confere um risco aumentado de 40 vezes, e um IMC $> 35 \text{ kg/m}^2$ equivale a um risco 90 vezes superior. Adicionalmente, a obesidade é central para outras alterações cada vez mais prevalentes, como a pré-diabetes e a síndrome metabólica, representando um risco acrescido de diabetes e doenças cardiovasculares (Day, 2007; Eckel, 2007).

A DMT2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticada após os 40 anos. Apesar disto, actualmente assiste-se a um aumento significativo de jovens que são afectados por esta patologia, sugerindo uma relação com o aumento da obesidade. A obesidade e o sedentarismo são factores de risco centrais para a progressão da DMT2, pois o tecido adiposo produz diversos factores, tais como ácido gordos livres (AGL) e adipocitocinas, que podem influenciar o metabolismo da glicose (Gallwitz e col., 2007).

Dado o grande número de pessoas afectadas por pré-diabetes e síndrome metabólica, significando um risco aumentado de diabetes, vários estudos clínicos têm sido desenvolvidos no sentido de comprovar a necessidade de mudanças do estilo de vida e/ou terapêutica farmacológica para prevenir o aparecimento da diabetes nestas populações em risco e/ou retardar a sua progressão.

2 - Prevalência

A Diabetes Mellitus (DM) representa um dos maiores problemas de saúde pública em todo o Mundo, sendo já apelidada de “epidemia do século XXI”, uma vez que afecta mais de 200 milhões de indivíduos (Virally e col., 2007).

A Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) representa perto de 90% dos casos de diabetes e a sua prevalência em adultos com idade superior ou igual a 20 anos é bastante assustadora. É esperado um aumento de 135 para 300 milhões de doentes entre 1997 e 2030, e uma maior prevalência nos países em desenvolvimento (Fig. 2) (Wild e col., 2004).

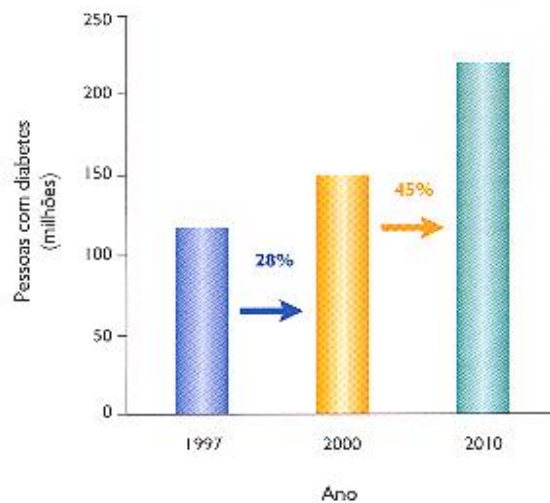


Figura 2 – Estimativa do número de indivíduos com Diabetes em 2010 no Mundo. Caso se concretize, teremos um aumento de 45% em relação a 2000 (adaptado de Cefalu e Cannon, 2007).

O aumento da diabetes parece ser, em grande medida, secundário ao aumento da obesidade. É do conhecimento público o aumento significativo da obesidade nos EUA, nas últimas décadas. Como consequência, vários são os estudos que mostram como o aumento da prevalência da diabetes parece espelhar o aumento das taxas de obesidade (Mokdad e col., 2000) (Fig. 3). Embora o gráfico da fig. 3 apenas ilustre os números crescentes nos EUA, a diabetes e a obesidade são problemas graves a nível mundial (Fig. 4).

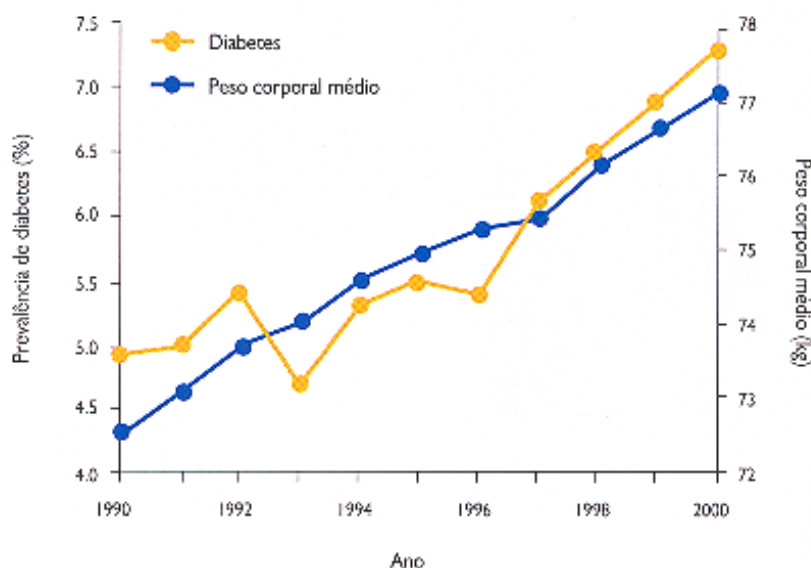


Figura 3 – Prevalência de diabetes e obesidade nos EUA desde 1990 (adaptado de Cefalu e Cannon., 2007). O aumento da prevalência da diabetes parece espelhar o aumento das taxas de obesidade. É possível constatar que a prevalência da obesidade aumentou cerca de 61% entre 1991 e 2000. Estas observações apoiam o conceito de que o aumento de peso é um factor de risco *major* para a diabetes.

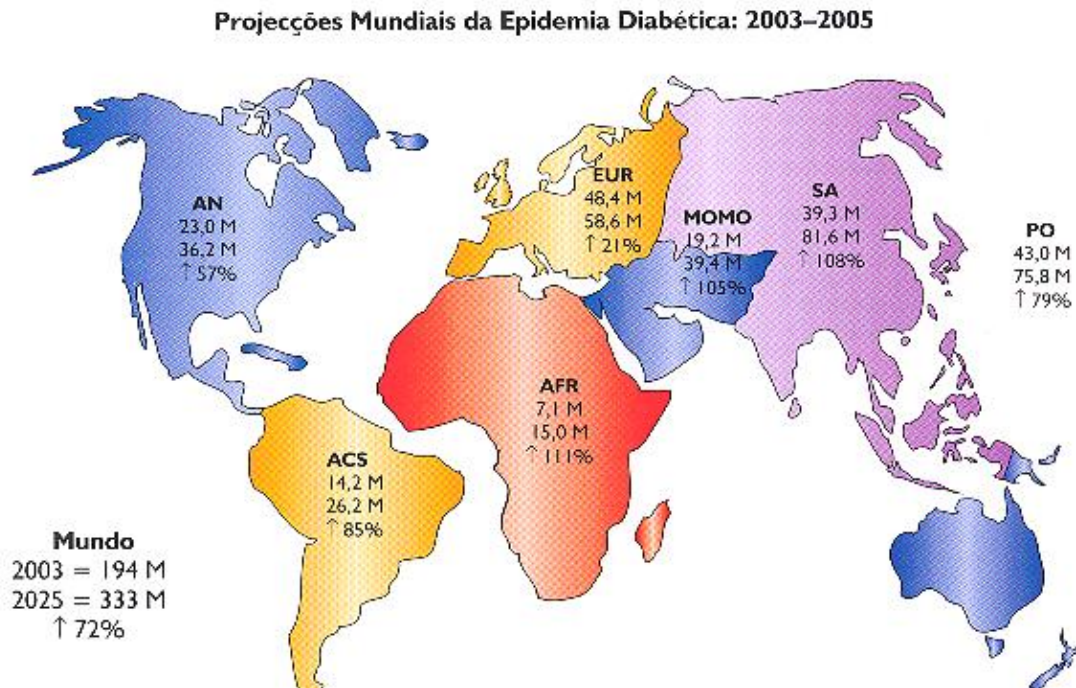


Figura 4 – Projeções mundiais da epidemia diabética (adaptado de Cefalu e Cannon, 2007). Ao observar este mapa, é possível afirmar que irá haver um aumento de novos casos de diabetes em todas as partes do mundo. M: milhões; AFR: África; NA: América do Norte; EUR: Europa; ACS: América Central e do Sul; MOMO: Mediterrâneo Oriental e Médio Oriente; SA: Sudoeste Asiático; PO: Pacífico Ocidental.

De acordo com o Estudo da Prevalência da Diabetes em Portugal, 11,7% da população portuguesa é diabética, representando mais 5,2% do total em relação a 2006. O cenário torna-se ainda mais negro quando a estes números se juntam os da pré-diabetes. Com efeito, foi encontrada uma percentagem de 23,2% entre os 20 e os 79 anos, o que corresponde a 1.782.663 pessoas com pré-diabetes. Os números tornam-se realmente alarmantes, tanto mais quando é sabido que existem 2.687.698 portugueses com diabetes ou em situação de risco, o que significa mais de um quarto da população (34,9%) (Fig. 5).

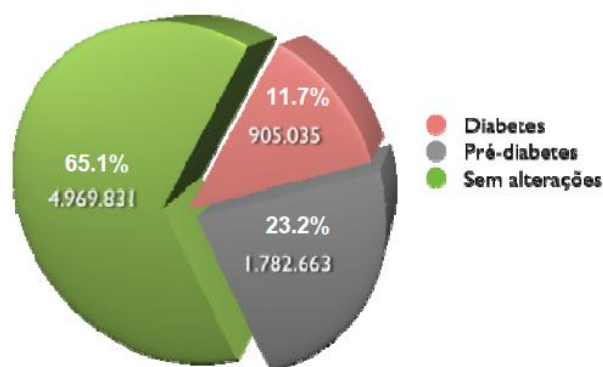


Figura 5 – Estimativa da prevalência da diabetes e pré-diabetes em Portugal, no ano de 2009 (adaptado de Sociedade Portuguesa de Diabetologia).

Segundo os resultados do estudo desenvolvido pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia (SPD), através do Observatório Nacional de Diabetes, em conjunto com a Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (APDP), o Instituto de Higiene e Medicina Social da Faculdade de Medicina de Coimbra e com o apoio da Direcção Geral da Saúde (DGS), Portugal tem actualmente 905.035 diabéticos.

É de referir que a prevalência da diabetes é superior entre a população masculina, pois 14,2% dos homens portugueses têm diabetes. São também os mais velhos quem apresenta o maior número de casos. Mais de um quarto da população portuguesa entre os 60 e os 79 anos é, actualmente, diabética: 26,3%, correspondentes a 497.485 pessoas (Fig. 6).

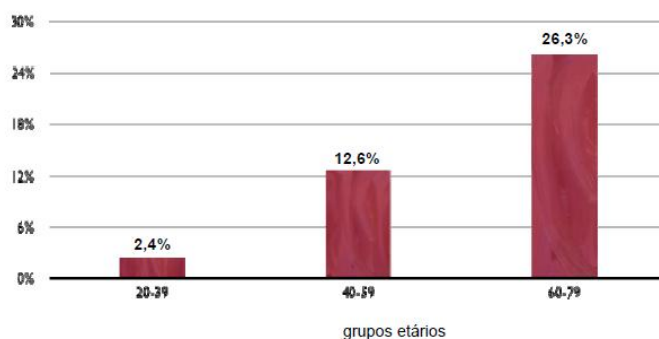


Figura 6 – Prevalência da Diabetes em Portugal, no ano de 2009, por grupos etários (adaptado de Sociedade Portuguesa de Diabetologia).

Em suma, a diabetes tornou-se um problema mundial bastante profundo e complexo, sendo que a maior preocupação dos agentes da Saúde passa por tentar travar todas as complicações a ela envolvidas (Fig. 7).

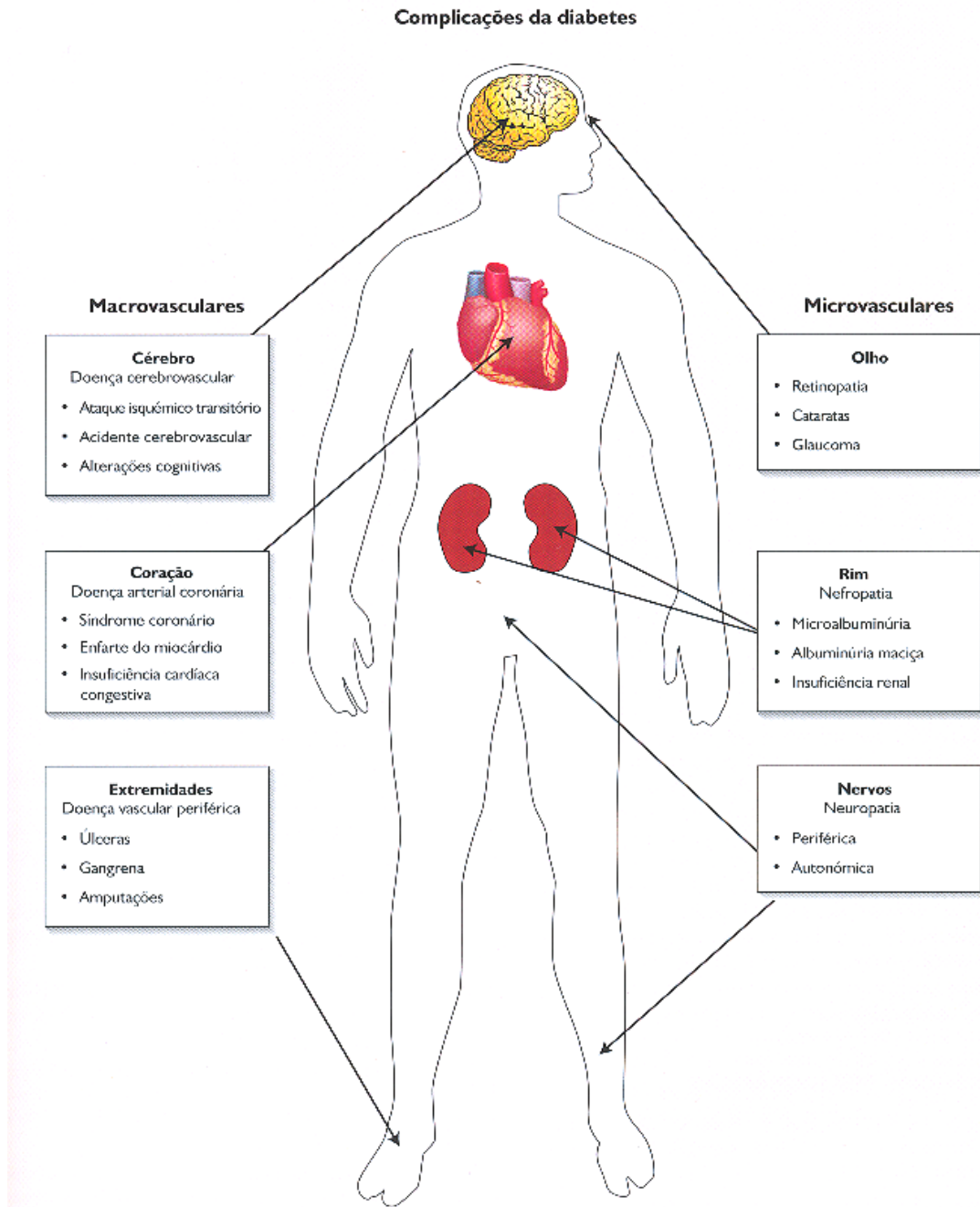


Figura 7 – Demonstração esquemática das complicações micro e macrovasculares da diabetes (adaptado de Cefalu e Cannon, 2007).

3 - Hereditariedade

Apesar do estilo de vida e a sobrealimentação poderem ser factores patogénicos, elementos genéticos também estão envolvidos na génese da DMT2. Na verdade, genes relacionados com a secreção de insulina e com o seu mecanismo de acção nos tecidos periféricos foram identificados como susceptíveis ao aparecimento da DMT2 (Virkamaki e col., 1999). Assim, mutações num único gene, como o gene do receptor de insulina, ou do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) ou da fosfatidil inositol-3 cinase (PI-3K), envolvidas no transporte de glicose para os tecidos, podem culminar na resistência à insulina (Moller e col., 1994). Porém, estas mutações só conseguem explicar uma pequena percentagem de doentes com DMT2.

A evidência de que a exposição a certos factores ambientais, a hereditariedade e a elevada ingestão de gorduras saturadas e ácidos gordos *trans* possa influenciar o desenvolvimento da DMT2, pode vir de encontro à diferença de prevalências em diferentes etnias e países, já anteriormente referido.

4 - Diagnóstico

Numa fase inicial, a DMT2 é praticamente assintomática, dificultando o seu diagnóstico. Contudo, é nesta fase que aparecem muitas das complicações associadas à doença.

A DMT2 é diagnosticada com base nas recomendações de WHO (1999), que incorpora a quantificação da glicemia em jejum e de 2h após uma dose de 75g da mesma, numa classificação prática de diagnóstico (Stumvoll e col., 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 – Critério de diagnóstico da DMT2 e de outras anomalias da regulação da glicose

	Concentração da glicose plasmática
Normal	Jejum < 6,1 mmol/l (110 mg/dl) 2 horas após sobrecarga oral < 7,8 mmol/l (140 mg/dl)
Anomalia da tolerância à glicose (ATG) ou Diminuição da tolerância à glicose (DTG)	Jejum (se medida) \leq 7,0 mmol/l (126 mg/dl) 2 horas após sobrecarga oral \geq 7,8 mmol/l e < 11,1 mmol/l (\geq 140 mg/dl e < 200 mg/dl)
Anomalias da glicemia em jejum (AGJ)	Jejum \geq 6,1 mmol/l e <7,0 mmol/l (\geq 110 mg/dl e <126 mg/dl) 2 horas após sobrecarga oral (se medido) <7,8 mmol/l (140 mg/dl)
Diabetes Mellitus	Jejum > 7,0 mmol/l (126 mg/dl) 2 horas após sobrecarga oral \geq 11,1 mmol/l (200 mg/dl)

Nota: sobrecarga oral de glicose = 75g de glicose anidra.

As condições que predis põem para uma manifestação da diabetes, e que incluem um comprometimento da glicose em jejum e uma anomalia da tolerância à glicose, não são apenas de interesse acadêmico, uma vez que, quando não tratados, cerca de 7% dos indivíduos com estes problemas podem progredir para uma situação de diabetes, a cada ano (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Tuomilehto e col., 2001). Para além disso, anomalias na tolerância à glicose podem resultar num aumento do risco de doenças cardiovasculares (Stumvoll e col., 2005).

5 - Fisiopatologia da hiperglicemia

Para entender os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela DMT2 é necessário conhecer os processos pelos quais a glicemia é controlada.

A insulina é a hormona chave para a regulação da glicose sanguínea. A normoglicemia é mantida principalmente pelo equilíbrio entre a acção e a secreção da insulina, apesar de existir também a contribuição de uma hormona de efeito contrário, a glucagina.

Funcionando como um ciclo, a célula pancreática normal adapta-se às mudanças de acção da insulina, respondendo a uma diminuição desta com um aumento da regulação da sua secreção, e vice-versa.

Na DMT2, a função das células β é inadequadamente baixa para o grau de sensibilidade de insulina. E, infelizmente, agrava ao longo do tempo, pois quando a acção da insulina diminui (com o aumento da obesidade, por exemplo) o sistema tenta compensar por um aumento de função celular. Porém, a uma certa altura, as concentrações de glicose sanguíneas em situações de jejum ou de 2h após uma carga de glicose irão aumentar ligeiramente. Este aumento agrava-se com o tempo, transformando-se num dano continuado, maioritariamente pela toxicidade da glicose, contribuindo para a falência das células β (Stumvoll e col., 2005). Assim, mesmo com uma reserva celular teoricamente ilimitada, a resistência à insulina abre o caminho para a hiperglicemia sustentável que dá origem à DMT2.

Contribuindo para a fisiopatologia da hiperglicemia, encontra-se também a produção aumentada de glicose hepática. Esta é estimulada pela glucagina que, por sua vez, é erradamente libertada devido a um defeito nas células α pancreáticas. Adicionalmente, também níveis aumentados de AGL libertados pelo TA, por exemplo em caso de obesidade, estimulam o fígado a sintetizar glicose (Fig. 8).

Assim, o aumento da glucagina e a diminuição de insulina causam um aumento da gluconeogénese hepática e, desta forma, contribuem para a subida da glicemia em jejum e pós-prandial (Gallwitz e col., 2007).

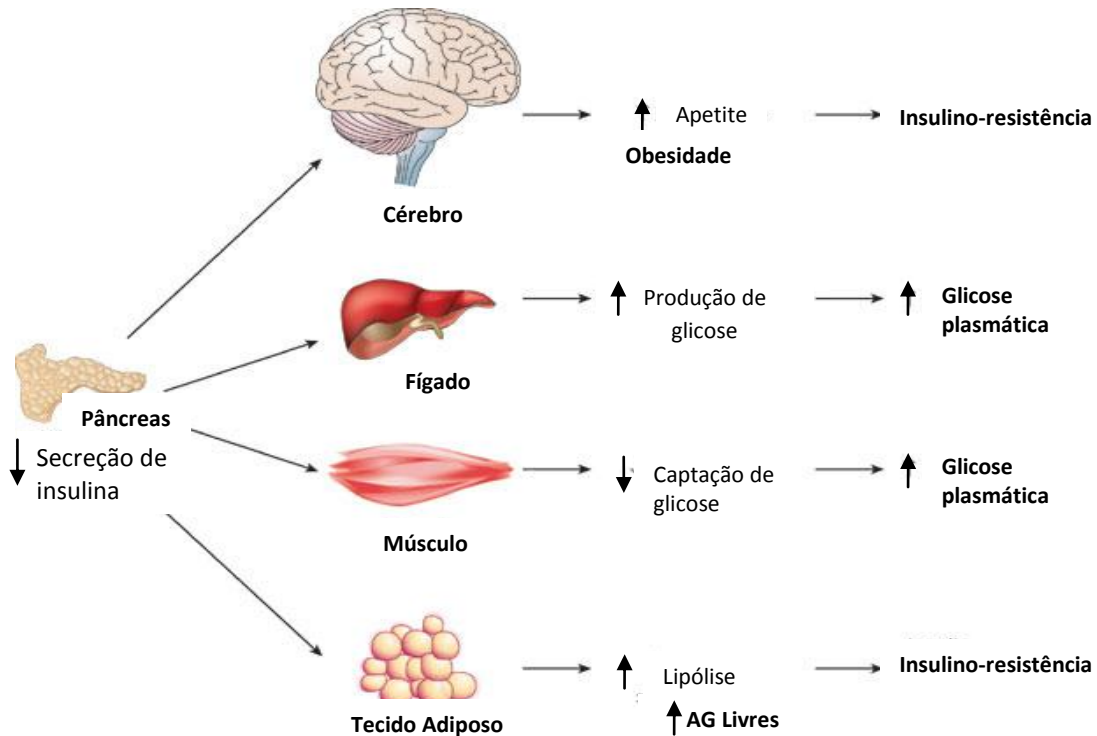


Figura 8 – Modificações primárias da DMT2. Na DMT2 observa-se uma diminuição dos efeitos da insulina, por insulino-resistência nos tecidos alvo, como o fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo, e um aumento da secreção da glucagona pelo pâncreas, aumentando a produção de glicose pelo fígado.

6 – Papel da insulina

A insulina é a maior hormona anabólica e a sua acção é essencial para o desenvolvimento e crescimento de tecidos específicos e manutenção da homeostase da glicose. Esta hormona é secretada pelas células β pancreáticas, principalmente em resposta aos níveis circulantes aumentados de glicose, depois de uma refeição.

Quando em estado de jejum, a secreção de insulina é suprimida, o que leva ao aumento da gluconeogénese e quebra do glicogénio, no fígado, aumentando os níveis séricos de glicose. Já no estado de saciedade, a insulina libertada pelas células β tem uma acção reversa, pois inibe a glicogenólise e a gluconeogénese, aumentando a captação e utilização da glicose periférica e diminuindo a lipólise e proteólise. Ou seja, o excesso de glicose ingerido é convertido em glicogénio, triglicérideos (TG) e proteínas. Portanto, quanto mais glicose chega às células do fígado, maior é a metabolização e o armazenamento como glicogénio ou a conversão em AGL. Estes são “empacotados” como TGs nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), para o transporte no sangue e depositadas no tecido adiposo, contribuindo para a obesidade (Guyton e col., 2006).

6.1 - Secreção de insulina na DMT2

Como já foi mencionado, a DMT2 é definida em resultado de defeitos na secreção de insulina, na sensibilidade a ela e na função das células β . A disfunção das células inclui anomalias na pulsatilidade e na cinética da secreção de insulina, bem como anomalias na quantidade e qualidade da mesma, e perda das células β e sua evolução (Virally e col., 2007).

A secreção de insulina é estimulada pela entrada de glicose nas células β do pâncreas, através dos transportadores de glicose-2 (GLUT2). Ao ser degradada por diferentes enzimas, a glicose resulta na formação do piruvato que, por sua vez, é utilizado pela mitocôndria, com o objectivo de formar ATP. Este é essencial para a formação de energia necessária para a despolarização da membrana, que, com mais alguns passos adicionais, resulta na libertação da insulina contida em grânulos (Fig. 9) (Stumvoll e col., 2005).

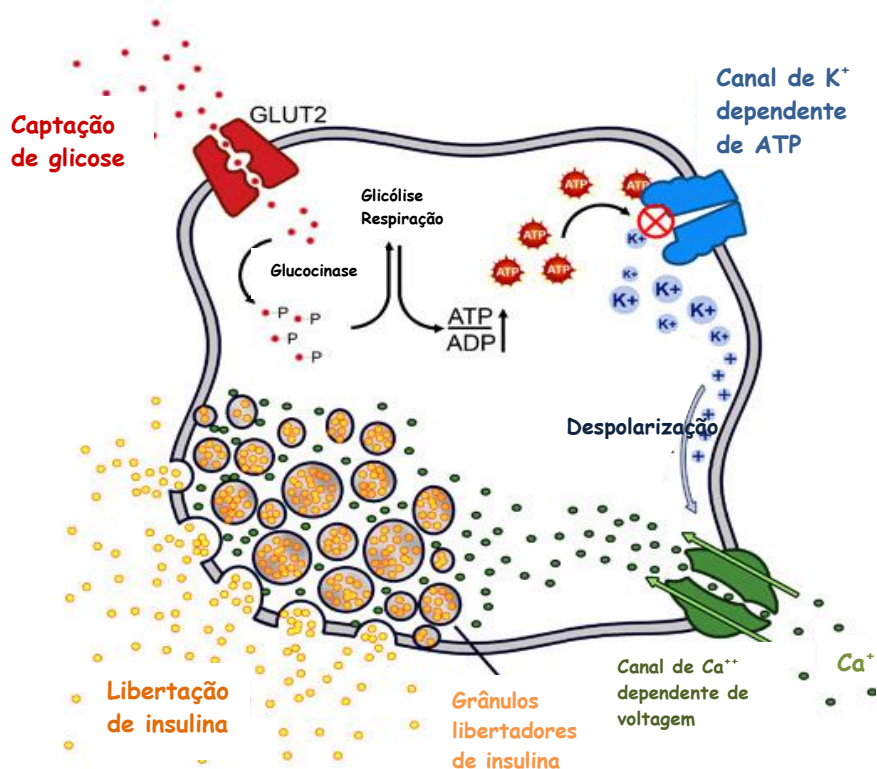


Figura 9 – Mecanismo de secreção de insulina dependente de glicose nas células β (adaptado de Stumvoll e col., 2005). A secreção de insulina é estimulada pelos níveis elevados de glicose no sangue. Esta tem início na captação de glicose pelos transportadores GLUT 2 e toda a fosforilação da glicose leva a um aumento da razão ATP/ADP. Este aumento inativa os canais de K^+ que despolariza a membrana, levando a um aumento da entrada dos íons de cálcio e, conseqüentemente, a uma liberação exocítica da insulina dos grânulos e da célula.

Em indivíduos normoglicémicos, a insulina expõe variações rápidas de concentrações plasmáticas, com picos de secreção de 5 a 10 minutos e com oscilações grandes de 60 a 120 minutos. Os picos de secreção na DMT2 encontram-se reduzidos ou muitas vezes ausentes (Polonsky e col., 1988; O’Rahilly e col., 1988).

Numa situação normal de estimulação, por glicose i.v., a secreção de insulina é caracterizada por um padrão bifásico, com um primeiro pico bastante elevado de 10 minutos, seguido de uma fase mais lenta e progressiva. Na DMT2, a primeira fase de secreção é abolida e a fase tardia é reduzida e atrasada (Virally e col., 2007).

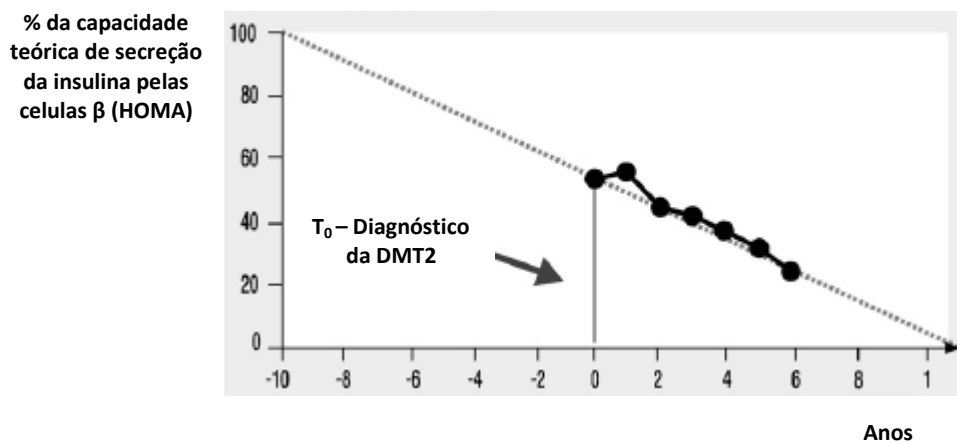


Figura 10 – Deficiência de insulina na DMT2 (adaptado de Virally e col., 2007). Estudos indicam que a capacidade de secreção de insulina residual encontra-se diminuída cerca de 50% na altura do diagnóstico. Passados 6 anos esta capacidade diminuí mais 15%, tornando-se linear ao longo do tempo.

Na transição do estado de jejum para o de saciedade, a fase inicial de secreção de insulina é essencial, pois suprime a produção de glicose hepática e lipólise e atravessa a barreira endotelial, onde prepara as células alvo para a acção da insulina (Luzi e col., 1989; Getty e col., 1999; Virally e col., 2007). A diminuição da primeira secreção tem lugar logo numa fase inicial da doença e progride com o tempo (Ratzmann e col., 1981; Virally e col., 2007). Assim, a capacidade secretória da insulina residual encontra-se 50% diminuída na fase de diagnóstico, com uma diminuição adicional de 15% nos 6 anos seguintes e tornando-se depois linear ao longo do tempo (Fig. 10) (UK Prospective Diabetes Study Group, 1995).

Com o auxílio de alguns ensaios imunoradiométricos, identificou-se uma deficiência na síntese de insulina. Através de um excesso circulante de prohormonas, como *proinsulina*, *slip 32-33* e *proinsulina 64-65*, contabilizadas em mais de 40% dos peptídeos circulantes (5% em não diabéticos) (Getty e col., 1999), descobriu-se que este excesso de proinsulina é uma consequência de um defeito na biosíntese da insulina, e não de uma hiperestimulação das células β , uma vez que o excesso de proinsulina está ausente em estados de hiperinsulinismo secundário, como a obesidade e doenças hepáticas.

Com muito ainda para clarificar, diferentes explicações têm sido propostas para explicar a redução progressiva da secreção de insulina, incluindo elevados níveis de glicose e AGL nos tecidos, respectivamente glicotoxicidade e lipotoxicidade. A glicosilação avançada, particularmente no gene promotor da insulina, assim como os depósitos de amilina nos ilhéus pancreáticos, representam algumas das explicações avançadas (Matsuoka e col., 1997; Höppener e col., 2000). Mais pertinente é o papel das espécies reactivas de oxigénio (ROS), produzidas em excesso numa diabetes não controlada, e responsáveis pela apoptose das células β (Butler e col., 2003).

Recentemente, identificou-se um gene susceptível à DMT2, o TCF7L2, que é identificado em aproximadamente 20% dos casos. Este gene encontra-se associado a alterações na secreção de insulina, e defeitos envolventes neste gene também resultam numa redução da massa das células β e/ou na sua habilidade para compensar a resistência à insulina (Grant e col., 2006).

6.2 - Insulino-resistência (IR)

A insulino-resistência (ou resistência à insulina) é uma condição cujos defeitos na acção da insulina se encontram de tal forma elevados que os níveis normais de insulina não conseguem compensar o sinal para a absorção de glicose, nos tecidos alvo (Eckel e col., 2005). O resultado é uma hiperglicemia na tentativa de manter uma normoglicemia. Esta resistência culmina no pâncreas a compensar a diminuição da resposta à insulina, por aumento da libertação da mesma, até a capacidade de reserva ser excedida por consequências metabólicas, e naturalmente a secreção de insulina deixa de ser adequada (Jellinger, 2007). Enquanto os níveis de glicose aumentam, a intolerância à glicose e a DMT2 evoluem. Desta forma, é possível desenhar um espectro contínuo de sensibilidade à

insulina, indo de uma resposta normal até a uma insulino-resistência severa (Jellinger, 2007).

Na DMT2, a produção hepática de glicose é menos suprimida, e a utilização de glicose periférica é menos estimulada pela insulina, indicando que tanto o fígado como os tecidos periféricos e o TA são responsáveis pela resistência à insulina. Esta resistência nestes tecidos não é tanto o resultado de uma diminuição do receptor de insulina, mas sobretudo do defeito na sua via de sinalização.

Com o avanço de novas tecnologias, tornou-se possível a identificação *in vivo* de todos os passos celulares defeituosos no músculo esquelético na DMT2. Desta forma, tornou-se claro que a resistência à insulina no músculo esquelético é uma consequência de uma diminuição do transportador de glicose dependente da insulina. Esta diminuição resulta de um defeito na fosforilação do substrato receptor de insulina (IRS), ou da associação do IRS com a subunidade regulatória (p85) da fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3cinase) que resultam numa diminuição da cascata de sinalização responsável pela estimulação do transportador de glicose. O transportador de glicose é um passo do metabolismo da glicose no músculo esquelético, e a sua estimulação em resposta à insulina resulta na translocação de transportadores de glicose (GLUT4), localizados nas membranas das vesículas intracelulares e que se dirigem para a membrana plasmática, para a captação de glicose (Fig. 11) (Arner, 2003).

Na DMT2, a estimulação do transportador de glicose em resposta à insulina encontra-se reduzida até 50% no músculo esquelético, assim como a concentração de GLUT4 se encontra modestamente diminuída (Virally e col., 2007).

A insulino-resistência é também uma característica de um número de outros distúrbios, incluindo a obesidade, a intolerância à glicose, a dislipidemia e a hipertensão associada à síndrome metabólica (Tabela 2). Esta resistência encontra-se associada a diferentes alterações metabólicas, como elevados níveis de AGL e de glicose, e como a presença de stresse oxidativo e inflamação nos tecidos. Todos estes parâmetros serão esclarecidos em capítulos seguintes.

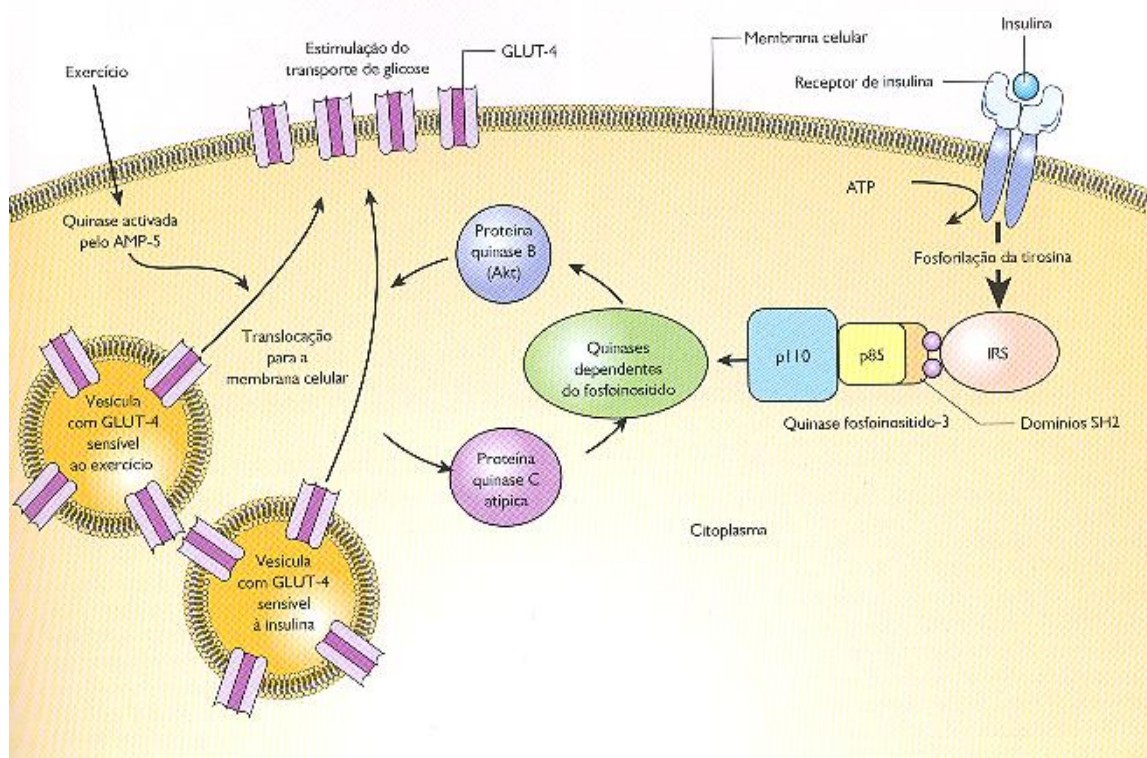


Figura 11 – Vias de sinalização da insulina que regulam o metabolismo da glicose nas células musculares e adipócitos (adaptado de Cefalu e col., 2007). O GLUT 4 é armazenado em vesículas intracelulares. A insulina liga-se ao seu receptor situado na membrana plasmática, o que resulta na fosforilação do receptor e de substratos do receptor da insulina, como o IRS. Estes complexos formam outros complexos com proteínas de ancoragem como a fosfatidil inositol-3 quinase (PI-3quinase). A P85 é ligada à subunidade catalítica (p110). A activação da PI-3quinase é uma via *major* de mediação de transporte e metabolismo da glicose mediados pela insulina: activa cinases dependentes do fosfatidilinositol que participam na activação da proteína cinase B (ou Akt) e formas atípicas da proteína cinase C. Através desta cascata de sinalização, é estimulada a captação de glicose nas células do músculo, aumentando a translocação das moléculas transportadoras de glicose 4 (GLUT4) para a membrana celular. Um defeito numa destas vias leva a uma diminuição da translocação dos transportadores de glicose para a membrana e conseqüentemente uma redução da captação de glicose para as células do músculo.

Tabela 2 – Condições genéticas ou adquiridas que podem provocar resistência à insulina.

Condições que podem levar à insulino-resistência

Obesidade

Excesso de glucocorticóides

Excesso de hormona de crescimento

Diabetes gestacional

Fígado gordo (acumulação de lipídeos no fígado)

Mutações no receptor da insulina

Mutações em genes que levam à obesidade

Auto-anticorpos no receptor de insulina

(adaptado de Jellinger, 2007)

7 - Metabolismo/dismetabolismo da glicose e dos lipídeos na insulino-resistência

7.1 - Glicotoxicidade e IR

A resistência à insulina é manifestada primeiramente no músculo e no tecido adiposo, enquanto que os outros tecidos, numa fase inicial, ainda retêm a sua sensibilidade à insulina. A hiperinsulinemia compensatória necessária para manter a homeostase da glicose tem algum impacto negativo em tecidos que permanecem sensíveis à insulina. Assim, a diferenciada resistência à insulina e, conseqüentemente, a hiperglicemia, resultam numa toxicidade observada em algumas síndromes clínicas associadas à insulino-resistência (Jellinger, 2007).

Quando as células são expostas a níveis anormalmente elevados de glicose, elas são dotadas da capacidade de reduzir o transporte de glicose para o citoplasma, mantendo assim as concentrações internas de glicose a níveis próximos dos normais. Contudo, algumas células não são munidas de rapidez suficiente para diminuir este transporte, o que leva a níveis elevados de glicose dentro da célula. Como exemplos desta toxicidade celular despoletada pela hiperglicemia, encontram-se incluídas as células endoteliais capilares da retina, células mesangiais dos glomérulos renais, neurónios e células Schwann nos nervos periféricos. Estas falhas nas células levam, respectivamente, a um prejuízo visual, renal e neuronal (Sango e col., 2006; Efrati e col., 2009).

Por sua vez, uma hiperglicemia crónica provoca a diminuição da acção da insulina ao nível dos tecidos periféricos, através da diminuição da síntese e actividade do transportador da glicose 4 (GLUT4), responsável pela entrada de glicose no músculo (e outros), por acção da insulina. A hiperglicemia interfere igualmente na supressão da produção hepática da glicose pela insulina, na medida em que compromete a activação da glucocinase (Postic e col., 1993)

Os níveis elevados de glicose podem provocar, num indivíduo diabético tipo 2, por estimulação de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão celular e por inibição da função leucocitária, uma inflamação vascular e, conseqüentemente, dano ao nível do sistema imunitário (Ling e col., 2005)

Através da produção excessiva de radicais livres de oxigénio (como o superóxido) em vários tecidos, a hiperglicemia também culmina num dano funcional e apoptose de células.

Sob a forma de exemplo, nas células endoteliais, o stresse oxidativo pode activar várias vias de dano microvascular, o que sugere que a hiperglicemia pode ter um papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (Jellinger, 2007).

Conclusivamente, a hiperglicemia induzida pela IR encontra-se associada ao desequilíbrio oxidativo e inflamação que causam, subsequentemente, o dano de alguns componentes celulares como lipídios, proteínas ou DNA e, por sua vez, estes danos encontram-se associados a um aumento da resistência à insulina.

7.2 - Dislipidemia e IR

A dislipidemia na DMT2 e na síndrome metabólica é caracterizada por uma hipertrigliceridemia, níveis pós-prandiais elevados de lipídeos, baixas concentrações de colesterol-HDL e elevadas de colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (col-LDL). Um trio apelidado de *fenótipo lipoproteico aterogénico*, característico por aumentar o risco cardíaco (Ginsberg, 2000).

Numa situação normal a insulina inibe a lipólise no TA, diminuindo os níveis de AGL. Porém, na DMT2, a resistência à insulina bloqueia este efeito inibitório na degradação dos lipídeos. Sendo assim, os mecanismos que ligam a insulino-resistência e a dislipidemia, iniciam-se com o número elevado de AGL na circulação, libertados pelos adipócitos e recebidos pelo fígado e músculo.

No fígado, quantidades limitadas de AGL são oxidados, e re-esterificados para formar triglicerídeos (TG). Desta forma, os TG são constantemente transportados entre o fígado e o TA. Caso este transporte não seja suficientemente a favor do TA, o fígado pode acumular os TG, numa condição chamada de fígado gordo (Brown e col., 2008).

Os lipídeos podem também ser armazenados nas células do músculo, devido à ineficiente oxidação no fígado ou ao transporte excessivo de AGL para o músculo.

Como foi referido, na presença de IR a lipólise nos adipócitos está aumentada, e os AGL resultantes são transportados para o fígado e músculo, ao mesmo tempo é estimulada uma lipogénese no fígado. Com isto, e com concentrações elevadas de glicose plasmática, a síntese de TG aumenta no fígado, assim como a síntese de VLDL que, com a ajuda da apolipoproteína B, entra na circulação para o transporte de TG. As VLDL são depois modificadas pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), resultando em

outras lipoproteínas, HDL e LDL. O colesterol destas lipoproteínas retorna ao fígado, apesar de algumas porções permanecerem em lipoproteínas remanescentes, acabando na parede arterial (Miranda e col., 2005).

Com o enriquecimento em TG, as HDL e as LDL são substratos da lipólise pela enzima lipase. As HDL depois de sofrerem lipólise são eliminadas rapidamente da circulação, resultando em concentrações reduzidas de colesterol das HDL (col-HDL) e apolipoproteína A-I (apoA-I), que são antiaterogénicas por participarem no transporte reverso de colesterol e por apresentarem propriedades antioxidantes.

As LDL, também ricas em TG, são lipolizadas e tornam-se mais pequenas (LDL de baixa densidade). Apesar de todas as LDL serem aterogénicas, as de baixa densidade são mais, talvez devido ao aumento da sua capacidade de penetração pela artéria, diminuição da capacidade antioxidante e outras propriedades (Miranda e col., 2005) (Fig. 12).

Esta série de eventos resulta em níveis elevados de TG e de LDL e baixos de HDL, um quadro característico da DMT2.

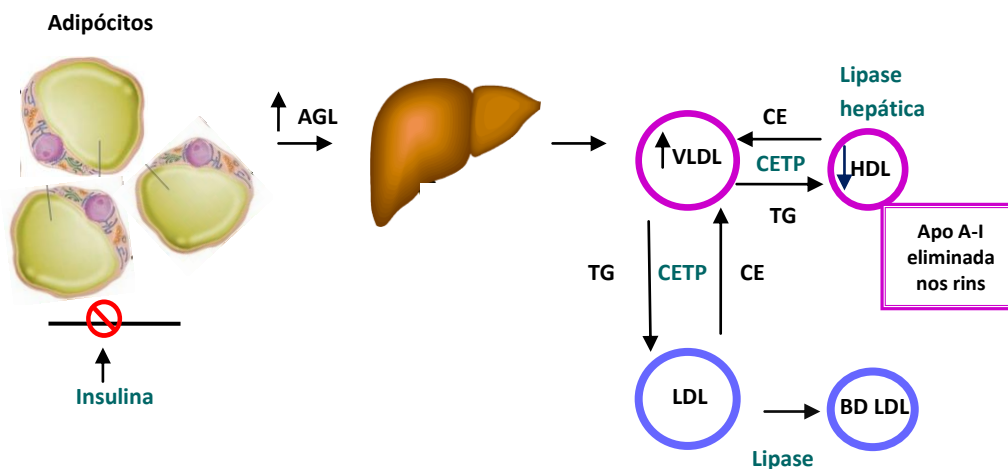


Figura 12 - A influência da resistência à insulina na dislipidemia (adaptado de Miranda e col., 2005). Quando a resistência à insulina bloqueia o efeito inibitório da insulina na lipólise, os adipócitos aumentam a libertação de AGL, que são transportados para o fígado. O fígado incorpora os AGL em TG, que se agregam nas VLDL. Através da CETP, a VLDL permuta os TG por colesterol das LDL e HDL. As lipases actuam nas LDL ricas em TG para criar BD LDL. A Apolipoproteína A-1 é deixada pela HDL rica em TG nos rins e em outros tecidos, reduzindo a HDL disponível. AGL: ácidos gordos livres; BD LDL: LDL de baixa densidade; TG: triglicéridos; CETP: proteína de transferência de ésteres de colesterol.

8 - Obesidade, ácidos gordos livres e inflamação na IR

Alguns investigadores consideram a insulino-resistência como um mediador da síndrome metabólica, mas não a primeira causa. E consideram o armazenamento disfuncional de energia como o principal problema. De acordo com esta teoria, acredita-se que a resistência à insulina resulta também das anormalidades no processamento e armazenamento de ácidos gordos (AG) e TG, ou seja, moléculas responsáveis pela utilização e armazenamento da energia corporal. Na maioria dos casos, a anormalidade é simplesmente a presença de demasiados TG ou gordura corporal, ou seja, a existência de obesidade (Miranda e col., 2005).

O objectivo do tecido adiposo, por excelência é o armazenar de energia proveniente das calorias da comida depois de uma refeição, e armazenadas já como TG nos adipócitos, e depois libertadas sob a forma de AG sempre que seja necessária energia. Normalmente, e de uma forma mais saudável, o corpo armazena os TG nos pequenos adipócitos periféricos. Se a capacidade destes adipócitos em armazenarem os TG for excedida, então estes lipídeos são acumulados nos hepatócitos, miócitos esqueléticos e adipócitos viscerais. Esta acumulação anormal de TG pode levar ao desenvolvimento de insulino-resistência hepática e muscular (Miranda e col., 2005; Fulop e col., 2006; Mlinar e col., 2007).

A distribuição no TA tem sem dúvida um impacto maior na sensibilidade à insulina. Na verdade, a acumulação de gordura na víscera abdominal encontra-se bastante associada com a IR, independentemente da obesidade total. Isto deve-se ao facto dos adipócitos viscerais se encontrarem resistências à insulina com o aumento da expressão de receptores adrenérgicos, aumentando a lipólise mediada por catecolaminas e aumentando a antilipólise mediada pela insulina, ambos levando a um aumento da libertação de AGL plasmáticos (Giles e col., 2005). Este aumento de AGL libertados leva a um aumento de AGL recebidos pelo fígado, resultando nas alterações lipídicas e lipoproteicas, anteriormente referidas. Adicionalmente, este número elevado de AGL nas células de alguns tecidos origina também uma perturbação da redistribuição do substrato do receptor da insulina-1 (IRS-1) e de fosfatidil inositol-3 cinase (PI-3K) e uma redução da translocação de GLUT4 pela membrana plasmática, originando resistência à captação de glicose estimulada por insulina, no músculo, no TA e no fígado (Fig. 13) (Virally e col., 2007).

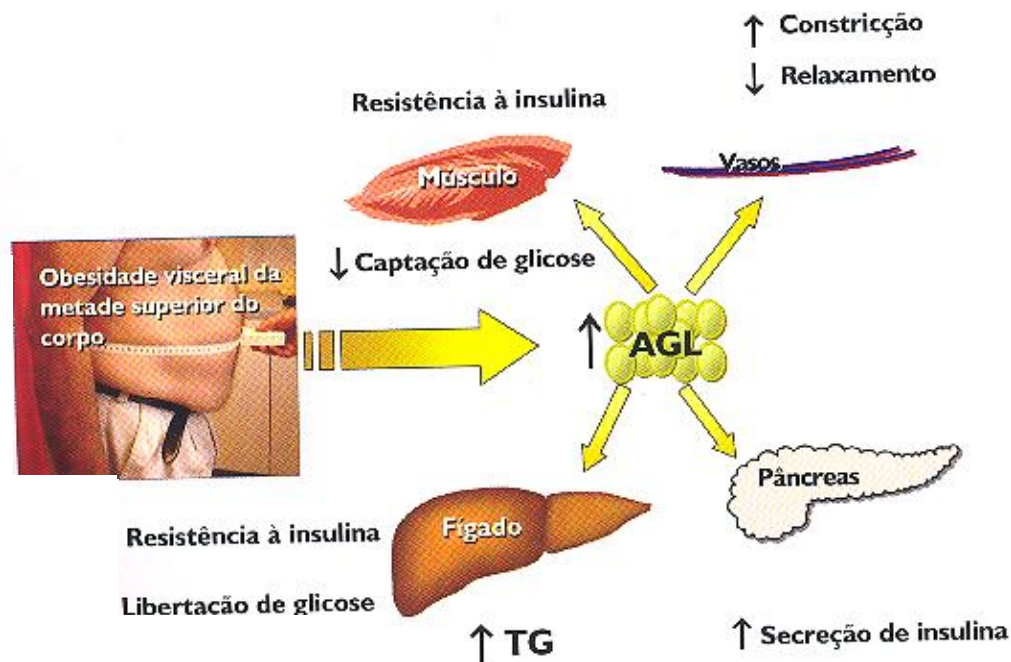


Figura 13 – A obesidade e a resistência à insulina estão intimamente relacionadas (adaptado de Cefalu e col., 2007). Existem várias ligações possíveis entre a função do tecido adiposo e a resistência à insulina determinadas em outros órgãos, como o músculo esquelético ou o fígado. Uma destas ligações é a regulação da disponibilização de AGL aos tecidos periféricos. Uma massa de tecido adiposo expandida fornece mais AGL à circulação sistêmica e aos tecidos periféricos. Pensa-se que estes ácidos gordos “competem” pela utilização do substrato no músculo esquelético o que, por sua vez, reduz a utilização de glicose. Isto leva a um aumento da concentração sanguínea de glicose e fornece o estímulo para o aumento da secreção de insulina e hiperinsulinemia, manifestações chave de resistência à insulina. AGL: ácidos gordos livres; TG: triglicérides.

Passados já muitos anos de investigação na área, torna-se agora claro que a obesidade, por si só, nem sempre se encontra associada com um risco metabólico alterado. Mas é largamente admitido que a IR e a obesidade se encontram fortemente relacionadas (Fulop e col., 2006).

A obesidade é caracterizada por elevados níveis de AGL, o que ocorre também na fase aguda do processo inflamatório (Fig. 14). A acumulação de gordura no TA estimula a invasão dos macrófagos nestas células que, por activação da via NF-kB, aumenta a expressão de moléculas de adesão celular, assim como o bloqueio de uma via de sinalização da insulina, aumentando assim a IR (Hotamisligil e col., 1995).

Até há bem pouco tempo o tecido adiposo era considerado apenas um reservatório de gordura; porém, hoje em dia é considerado um órgão endócrino metabólico imune. O TA, mais especificamente a zona visceral, tem a capacidade de secretar varias substâncias com actividades parácrinas e autócrinas. Este tecido secreta substâncias chamadas de adipocitocinas, uma grande família de moléculas importantes.

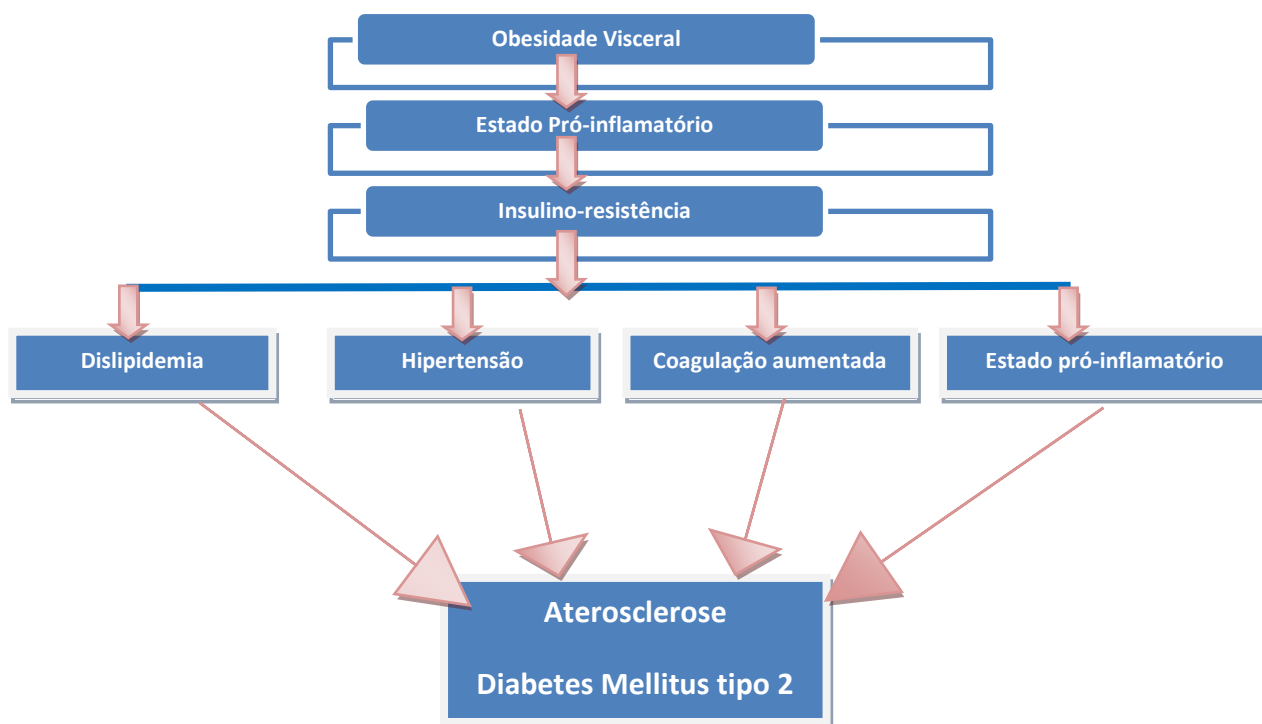


Figura 14 – O papel da obesidade visceral na síndrome metabólica: representação esquemática.

As adipocitocinas têm a capacidade de induzir a IR, a inflamação, a dislipidemia e a disfunção endotelial associados à síndrome metabólica e aterosclerose. Porém, algumas delas, como as adiponectinas, têm efeitos protectores. Assim, tornou-se evidente que tanto o tecido adiposo visceral como os macrófagos infiltrados têm a capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), a proteína C-reativa (PCR) e o factor de transformação do crescimento- β (TGF- β) e, com especial importância, o factor de necrose tumoral- α (TNF- α) onde a sua secreção no TA, e também no músculo e no fígado de obesos viscerais é bastante elevada (Fulop e col., 2006; Mlinar e col., 2007). O TNF- α , em particular, é uma chave moduladora do metabolismo dos adipócitos, com um papel directo nos processos mediados pela insulina, a homeostase da glicose e o metabolismo dos lipídeos. O TNF- α regula a expressão da lipoproteína lipase (LPL), da proteína transportadora de AG (FATP) e da acetil CoA síntase (ACS), de modo a inibi-las, e activando a lipólise, contribuindo para o aumento de AGL e desenvolvimento da IR (Arner, 2003).

Desta forma, torna-se evidente que o aumento da produção de $\text{TNF-}\alpha$ no TA pode ser um elo de ligação entre a obesidade e a IR, tendo um papel importante no desenvolvimento da DMT2, onde a resposta inflamatória induzida pela obesidade sublinha a IR (Fig. 15). Esta citocina modula também a expressão e produção de adipocitocinas, de forma a aumentar a formação de leptina (um modulador da oxidação de AG no músculo) e do inibidor do activador de plasminogenio-1 (PAI-1), e diminuindo a de adiponectina (Arner, 2003; Fulop e col., 2006).

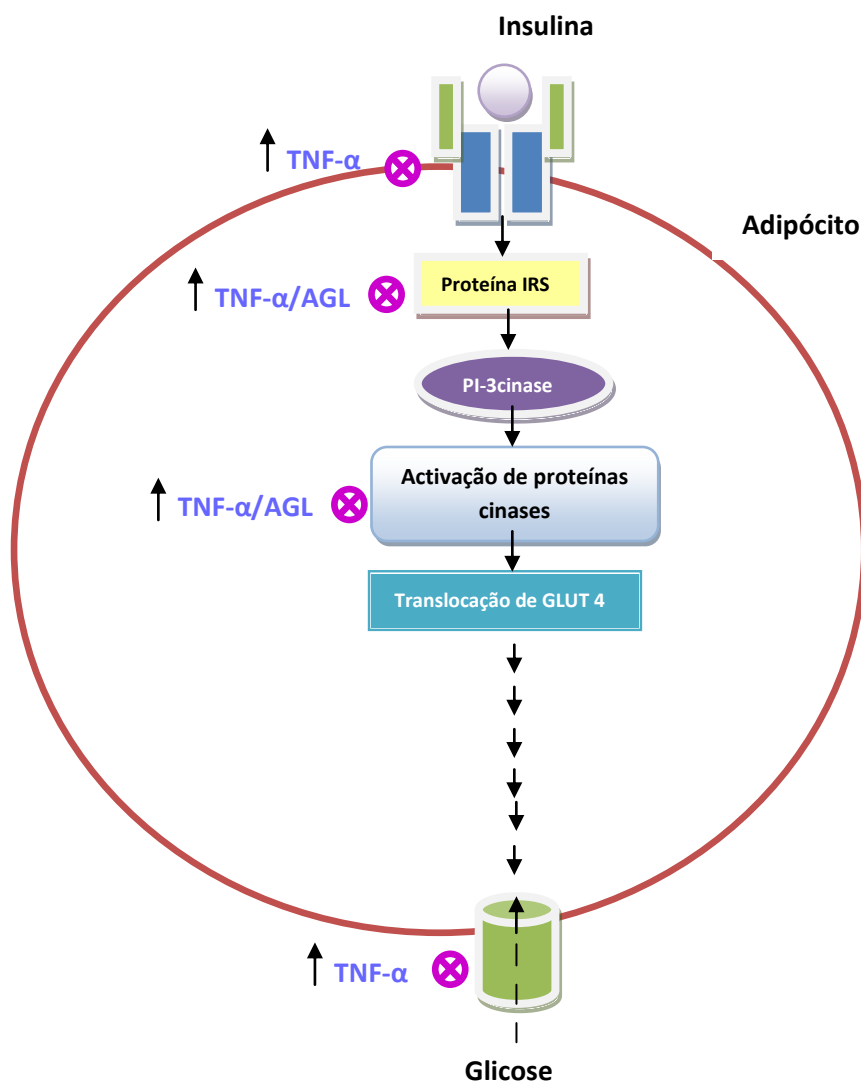


Figura 15 – Influência do $\text{TNF-}\alpha$ na insulino-resistência (adaptado de Arner, 2003). Alguns factores libertados pelos adipócitos, como o $\text{TNF-}\alpha$, a IL-6 e os AGL, parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina, nos adipócitos, por inibição da via de sinalização.

A adiponectina é umas das mais importantes adipocitocinas com actividades anti-diabéticas, anti-inflamatórias e anti-aterosclerótica (Matsuda e col., 2002) e, assim como o TNF- α , tem também um papel regulador na homeostase dos lipídeos e da glicose (Berg e col., 2002). Na DMT2, a adiponectina, libertada apenas pelo TA encontra-se diminuída (Gil-Campos e col., 2004).

Em suma, os AGL promovem uma IR que, por sua vez, estimula uma maior quantidade de AGL. Estes AGL induzem a produção de citocinas pelo TA, resultando numa inflamação que sublinha o desenvolvimento da IR, tornando-se num “ciclo vicioso”. Estas evidências sugerem que a obesidade é um estado inflamatório que contribui para a IR, ambos mediados por AGL e adipocitocinas (Fig. 16) (Fulop e col., 2006).

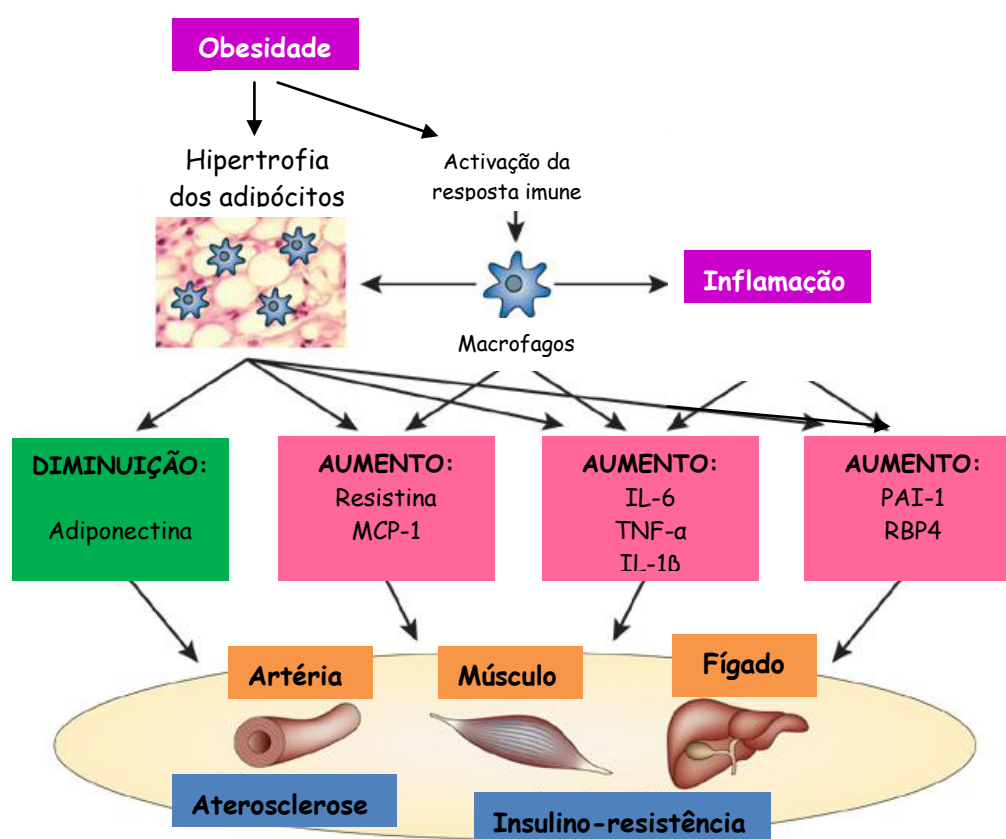


Figura 16 – Influência da obesidade e inflamação no TA e suas contribuições para o aumento da insulino-resistência.

9 - Stresse oxidativo na insulino-resistência

Definido como uma alteração do equilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a capacidade oxidativa, resultante numa acumulação de produtos oxidativos, o stresse oxidativo encontra-se envolvido no desenvolvimento da DM2. Nas células, existe uma série de funções reguladas por moléculas de radicais livres, actuando como sinais intra ou extracelulares e activando algumas vias de sinalização.

Assim como a inflamação, também o stresse oxidativo participa no desenvolvimento da insulino-resistência e, conseqüentemente, no dano celular dos tecidos que levam a complicações na diabetes. Contudo, ainda permanece por esclarecer se a diabetes é a causa ou o resultado do stresse oxidativo aumentado. No entanto, existem certos factores característicos da diabetes, como a obesidade, a dislipidemia e a hiperglicemia, que contribuem para o stresse oxidativo e para a resistência à insulina (Stephens e col., 2009).

Recentemente, observou-se que a hiperglicemia gera espécies reactivas de oxigénio por diferentes vias, tais como: irregularidade no balanço redox, aumento de produtos avançados de glicosilação, activação da proteína cinase C e elevada produção mitocondrial de superóxidos (Brunner e col., 2009).

Normalmente, no desenvolvimento da obesidade, a ingestão de calorias excede o gasto de energia. Em muitas células diferentes (incluindo células endoteliais, hepatócitos e adipócitos), o excesso energético sob a forma de glicose ou AGL entra no ciclo do ácido cítrico, estimulando um excesso de NADH mitocondrial que, ao não ser dissipado pela fosforilação oxidativa, aumenta o gradiente de prótons na mitocôndria, levando à formação de ROS (Stephens e col., 2009).

Ao stresse oxidativo é também atribuído a perturbação da redistribuição do IRS e PI-3K, com seguinte diminuição da translocação de glicose pelo GLUT4 nos adipócitos (Rudich e col., 1998), fígado (Ling e col., 2003) e músculo (Dokken e col., 2007), de forma a contribuir para a IR.

Devido aos níveis muito baixos de enzimas antioxidantes, os ilhéus pancreáticos tornam-se muito susceptíveis ao stresse oxidativo (Brunner e col., 2009). Também a retina, que tem uma elevada captação de oxigénio e oxidação de glicose, é vítima dos níveis elevados de ROS (Kowluru, 2003). Na verdade, algumas complicações diabéticas macrovasculares e microvasculares encontram-se associadas ao stresse oxidativo característico da DMT2.

Desta forma, existe um vasto número de razões para considerar que a glicolipotoxicidade, através do stresse oxidativo, contribuí para a insulino-resistência e para as complicações secundárias características da diabetes, envolvendo múltiplos tecidos.

Capítulo II – Pâncreas: inflamação e stresse oxidativo na disfunção das células β

1 - Morfologia do pâncreas

O pâncreas tem um papel regulador na homeostase da glicose, através do controlo do equilíbrio entre a secreção de insulina e de glucagina. A síntese e secreção destas hormonas são controladas por algumas moléculas sinalizadoras, como neurotransmissores, hormonas, nutrientes e glicose (o estimulador mais importante).

No pâncreas, as células endócrinas encontram-se agrupadas em ilhéus de Langerhans, constituindo aproximadamente 1-2% da massa do pâncreas. No caso de humanos adultos e saudáveis, estes ilhéus estão distribuídos por todo o órgão, chegando a atingir valores como um milhão de ilhéus por pâncreas.

Cada ilhéu contém entre 1000 a 3000 células de diferentes tipos (5), onde as mais abundantes são as células β , que sintetizam e secretam insulina, e as células α libertadoras de glucagina. Em quantidades menores, encontram-se as células δ e as células do polipeptídeo pancreático (PP), responsáveis pela libertação de somatostatina e do PP, respectivamente (Brissova e col., 2005; Cabrera e col., 2006). Recentemente, foi identificado uma nova e pequena população de células que secretam grelina, identificadas como células ϵ (Prado e col., 2004).

2 - Perturbações de função e massa na DMT2

A DMT2 é reconhecida por um defeito na secreção de insulina e por uma deficiência funcional e/ou de massa nas células β dos ilhéus pancreáticos, que resultam num desenvolvimento de hiperglicemia.

Na fase de diagnóstico, a função das células β encontra-se diminuída cerca de 50% em relação à função normal, independentemente do grau de insulino-resistência. A diminuição de função tem início, provavelmente, 10 a 12 anos antes do diagnóstico e agrava com o aumento dos níveis de glicose plasmática em fase de jejum (Holman, 1998).

Na DMT2, as células β ao tentarem compensar a resistência à insulina, provocam uma exaustão e disfunção das mesmas, contribuindo para a irregularidade da homeostase da glicose, e conseqüentemente, para a patologia. Assim, a inabilidade do pâncreas em adaptar a massa das células β às necessidades de insulina (plasticidade do pâncreas), leva, provavelmente, a uma diminuição da massa e função destas células pancreáticas (fig. 17) (Karaca e col., 2009).

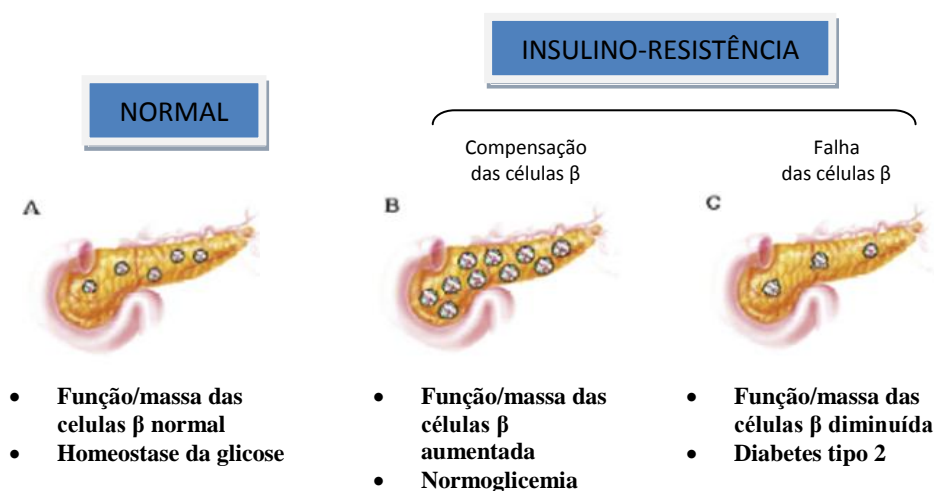


Figura 17 – Plasticidade do pâncreas endócrino (adaptado de Karaca e col., 2009). A figura demonstra a capacidade do pâncreas em modular a massa e a função das células β para se adaptar à produção e necessidade de insulina. Em condições de insulino-resistência existe um aumento de massa funcional das células β . Esta plasticidade defeituosa leva a uma hiperglicemia.

A disfunção das células β na DMT2 encontra-se relacionada com dois componentes: uma deficiência da insulina e um defeito na secreção da mesma. Como referido anteriormente, a deficiência da insulina na DMT2 encontra-se associada à prevalência da hiperglicemia, pois os níveis de insulina não são suficientes para a controlar. Um aumento da razão proinsulina/insulina indica a diminuição do processamento da insulina, que se encontra correlacionada com a disfunção das células β e com o desenvolvimento da doença (Wajchenberg, 2007).

Também marcador da disfunção das células β , encontram-se algumas anormalidades na quantidade da insulina secretada, evidenciadas por uma ausência da primeira fase de secreção de insulina e uma diminuição da segunda. Por outro lado, existe também uma diminuição da sensibilidade à glicose pelas células α , levando a uma hiperglucaginemia.

Estes defeitos de secreção, particularmente a ausência da resposta à glicose, em conjunto com a deficiência da insulina, comprometem a habilidade residual das células β em fornecer insulina suficiente para atingir uma normoglicemia, na presença de insulino-resistência (Wajchenberg, 2007).

A massa das células β é determinada e mantida por um equilíbrio entre a neogénese (formação dos ilhéus a partir dos seus precursores), hiperplasia (replicação das células β já existentes), hipertrofia (aumento do tamanho das células β) e apoptose (morte celular programada) (De Koning e col., 2008).

Na DMT2, ainda está por clarificar quais destes factores contribuem mais para a diminuição da massa celular; porém, tornou-se óbvio que a proliferação diminuída e o aumento da apoptose, ou ambos, resultam numa massa reduzida das células. A dificuldade em distinguir, em tecido humano, entre estes dois mecanismos, a formação das células ou a morte, é devido à rápida remoção das células mortas pelos macrófagos e células vizinhas. Ainda assim, parece razoável assumir que a dislipidemia e a hiperglicemia, características da DMT2, afectem negativamente a massa das células β por aumento da apoptose (Donath e col., 2004).

3 - Papel da inflamação na disfunção dos ilhéus de Langherhans

O aumento crónico de mediadores inflamatórios observados na DMT2 pode não só afectar a sensibilidade à insulina nos tecidos, mas também as células β pancreáticas.

Muitas citocinas e hormonas produzidas por tecidos, anteriormente referidas, ao serem libertadas na circulação, representam um papel endócrino. Em particular, a leptina, o TNF- α , a IL-6 e a interleucina-1 (IL-1) são produzidas e libertadas pelo TA, estando aumentadas na obesidade e directamente correlacionadas com a resistência à insulina (Ronti e col., 2006).

A leptina, expressa inicialmente no TA, é considerada uma citocina pró-inflamatória devido à sua similaridade estrutural com outras citocinas e, conseqüentemente, pela activação de vias de sinalização induzidas pela estimulação do receptor. Em situações normais, a leptina induz em ratos a proliferação das células β e protege a apoptose destas células induzida por níveis elevados de AGL (Otero e col., 2005). Inversamente, numa situação de exposição crónica, a leptina resulta na apoptose dos ilhéus humanos por

aumento da libertação de interleucina-1 β (IL-1 β) e diminuição de IL-1. Para além desta, outras citocinas, como o TNF- α e a IL-6, podem modular a sobrevivência das células β , apesar de ainda ser desconhecido qual a quantidade suficiente para afectar estas células (Maedler e col., 2004).

Contudo, não só as citocinas podem afectar a função das células β , uma vez que dependendo da duração da exposição à glicose ou a AGL e do perfil genético dos ilhéus, a glicose e os AGL podem induzir a proliferação das células β e ter efeitos pro ou antiapoptóticos.

Na presença de uma hiperglicemia crónica, as células β iniciam uma libertação de IL-1 β e de ROS, que, para além de provocar dano oxidativo, activam a transcrição de NF- κ B, um mediador de respostas inflamatórias referido no capítulo I. A viabilidade das células β pode também ser afectada por elevadas concentrações de AGL, como em casos de obesidade e/ou através de citocinas libertadas pelo TA, anteriormente referidas, que podem actuar directamente nas células ou activar o sistema imune inato (Fig. 18) (Wajchenberg, 2007).

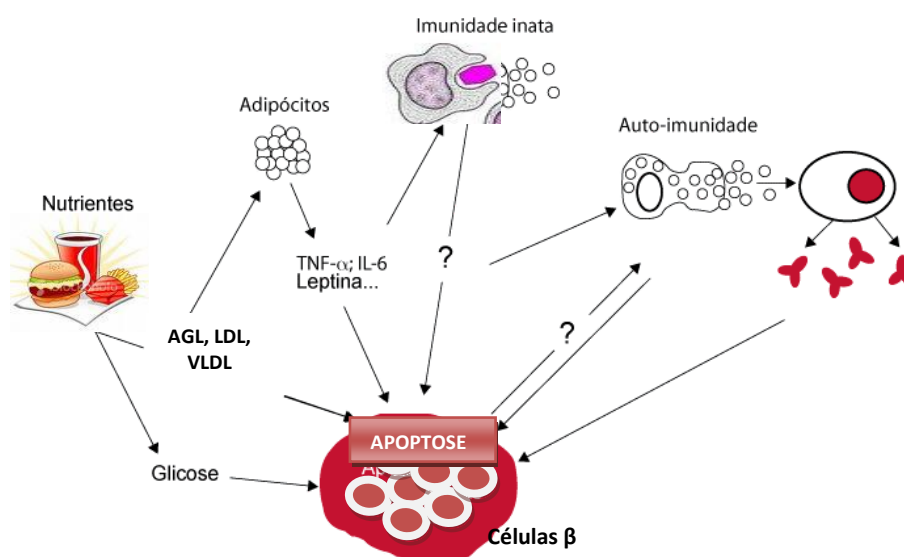


Figura 18 – Modelo esquemático da influencia do tecido adiposo, da glicose e do sistema imunitário na apoptose das células β (adaptado de Wajchenberg, 2007).

Assim, em adição à actividade endócrina dos adipócitos, também os macrófagos e o endotélio podem contribuir para os níveis séricos aumentados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na DMT2 e podem actuar nos ilhéus pancreáticos, desregulando a função secretória das células β e/ou despoletando uma resposta imune.

4 - Papel do stresse oxidativo na disfunção dos ilhéus de Langherhans

As espécies reactivas de oxigénio, quando em níveis fisiológicos, são bastante importantes para a manutenção de algumas funções celulares, mas quando em níveis tão elevados que excedam a capacidade antioxidante das células, induzem o stresse oxidativo (Kaneto e col., 2006). Assim, quando uma hiperglicemia se torna aparente no organismo, a função das células inicia um prejuízo gradual, que se classifica como glicotoxicidade. Este mecanismo é em parte mediado por espécies reactivas de oxigénio. De forma similar os AGL, também essenciais no metabolismo, tornam-se tóxicos quando presentes em níveis excessivos (Unger, 1995; Pick e col., 1998; Shimabukuro e col., 1998).

Na DMT2, o stresse oxidativo é provocado em vários tecidos, já referidos anteriormente, incluindo as células β pancreáticas. Estas células são bastante susceptíveis ao stresse oxidativo, por terem níveis de enzimas antioxidantes (como a catalase e a glutaciona peroxidase) bastante baixos, quando comparadas com outros tecidos. Desta forma, representam o maior alvo do dano tecidual mediado por stresse oxidativo (Evans e col., 2002). Nestas células pancreáticas em hiperglicemia existe um vasto número de fontes de produção de ROS, como a reacção de glicosilação não enzimática, a cadeia transportadora de electrões na mitocôndria e a via de hexosamina.

O mecanismo pelo qual o stresse oxidativo está envolvido na secreção de insulina e indirectamente na massa das células β é através da redução da actividade do gene promotor da insulina, que envolve o “*pancreatic and duodenal homeobox factor-1*” (PDX-1). O PDX-1, também conhecido por IDX-1/STF-1/IPF1, é membro de uma família de factores de transcrição e têm um papel crucial no desenvolvimento e diferenciação do pâncreas, assim como na manutenção da função das células β , por regulação de múltiplos genes, como a insulina, o GLUT2 e a glucocinase. Verificou-se, então, que a actividade do PDX-1 duodenal e pancreática é bastante sensível ao stresse oxidativo, confirmado por uma diminuição da ligação deste ao gene da insulina. Assim, o stresse oxidativo induzido pela

DMT2 induz a supressão da síntese de insulina, por uma redução da actividade do PDX-1 na ligação ao DNA (Fig. 19) (Kaneto e col., 2006; Kaneto e col., 2001; Matsuoka e col., 1997).

Actualmente estudos são feitos para avaliar o potencial dos antioxidantes (Probuco) como tratamento da DMT2 em ratinhos obesos e diabéticos (C57BL/KsJ-db/db). Estes estudos mostram alguns resultados positivos no metabolismo destes ratinhos, diminuindo os níveis de glicose sanguíneos e aumentando a massa das células β , ainda que de forma moderada (Kaneto e col., 2006; Gorogawa e col., 2002).

Assim, é possível afirmar que o tratamento antioxidante pode proteger as células β contra a toxicidade da glicose, característica da diabetes.

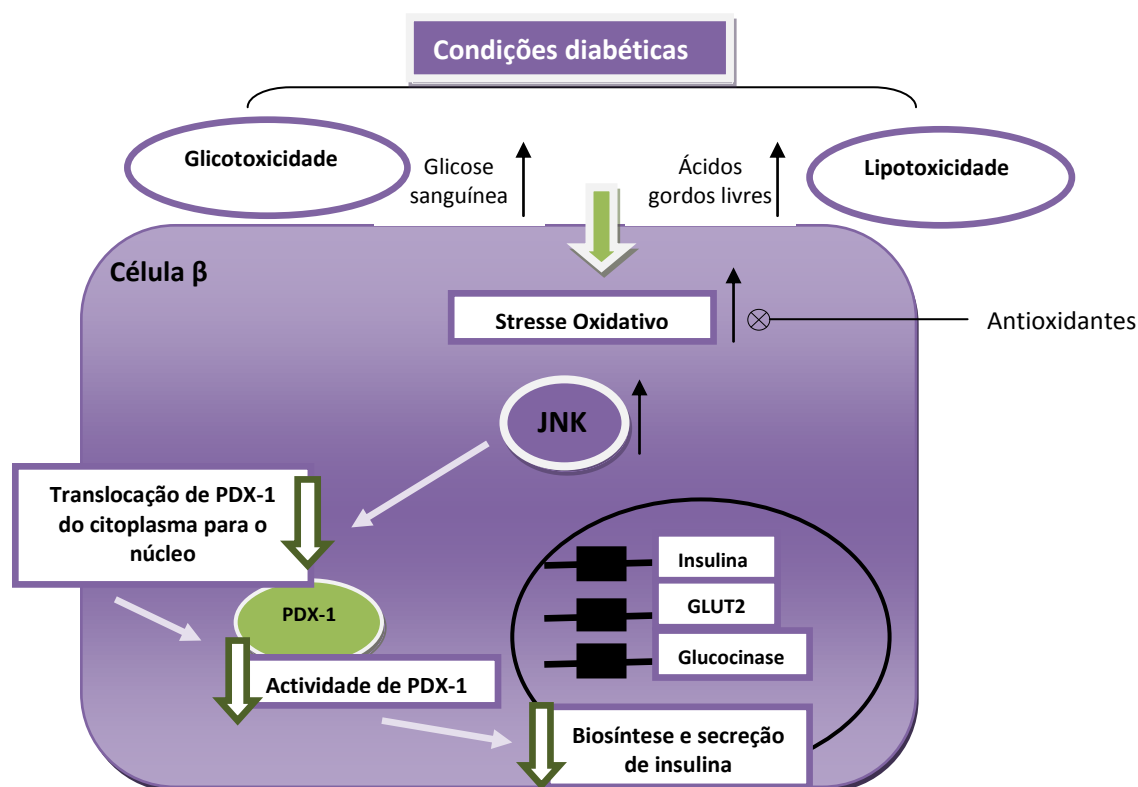


Figura 19 – Envolvimento do stresse oxidativo e da via de sinalização JNK na disfunção das células β (adaptado de Kaneto e col., 2006). O aumento do stresse oxidativo permite uma activação da via JNK que suprime a translocação do PDX-1 do citoplasma para o núcleo e, conseqüentemente, a diminuição da biosíntese e secreção da insulina.

Capítulo III - Modelos Experimentais (animais) de obesidade e DMT2: o rato *Zucker Diabetic Fatty (ZDF)*

Permanecem ainda por esclarecer alguns mecanismos ou eventos que originam a DMT2, e as suas maiores complicações, como a disfunção das células β . Contribuindo para este facto encontram-se vários impedimentos para a investigação da diabetes no ser humano. Neles podem incluir-se a heterogeneidade genética, a variabilidade na esperança de vida, a ampla diversidade de estilos de vida, a inacessibilidade a tecidos e órgãos e, naturalmente, questões de ordem ética. De maneira a contornar estes obstáculos, surgem os modelos animais que tentam simular as doenças humanas, como a diabetes.

Embora exista uma variedade de modelos animais, os mais utilizados são os ratos (ou ratinhos), não só pelo seu tamanho e fácil manuseamento, mas principalmente pelo curto ciclo de reprodução. Estes modelos proporcionam a oportunidade de avaliar o início, o desenvolvimento e o progresso da doença, contribuindo para a compreensão dos mecanismos moleculares que caracterizam a DMT2.

A complexidade dos modelos animais na DMT2 torna difícil a sua escolha para um determinado estudo. Em alguns animais a resistência à insulina é predominante, enquanto que em outros a destruição das células β é prevalente. Adicionalmente, também são utilizados alguns modelos em que a intolerância à glicose é uma parte ampla do fenótipo da adiposidade, hipertensão ou dislipidemia.

Por norma, para o estudo da obesidade como motor da diabetes, são utilizados os animais com um fenótipo de insulino-resistência, como os ratos *Zucker Fatty (ZF)*, *Zucker Diabetic Fatty (ZDF)*, e os ratinhos ob/ob, db/db, KK e KK-A^y (Le Roith e Gavrilova, 2006).

Contudo, nos ratos ZF, nos ratos corpulentos (cp) e nos ratinhos ob/ob e KK, a função e massa das células β são mantidas, de modo que estes apenas apresentam uma hiperglicemia moderada ao longo de toda a vida. Contrariamente, surgem as espécies que apresentam células β pancreáticas lábeis, que permitem apenas uma hipersecreção de insulina transitória, com obesidade. Este animal simula a evolução da doença semelhante ao do homem e, como resultado de uma predisposição genética, sofre uma apoptose das células β , uma insulino-resistência e o desenvolvimento de hiperglicemia. Como exemplos deste modelo animal, inclui-se o rato *Zucker diabetic fatty (ZDF)*, e o rato da areia (*Psammomys obesus*) e o ratinho db/db (Shafrir e col., 1999).

1 – Ratos *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF)

Normalmente, os ratos ZDF têm as seguintes designações: ZDF/DRT-*fa/fa* e ZDF/Gmi-*fa/fa*. O primeiro grupo de ratos diabéticos foi identificado a partir de uma colônia denominada de ZDF/DRT-*fa/fa*, pela Faculdade de Medicina da Universidade de Indiana. A outra nomenclatura identifica uma colônia proveniente dos ZDF/Gmi-*fa/fa* e produzida pela *Genetic Models de Indianapolis* (Dolan e col., 1997).

O fenótipo destes ratos é definido por cabeça preta, olhos pretos e uma risca preta ao longo do seu comprimento. Todo o resto do seu pêlo é branco (Fig. 20).

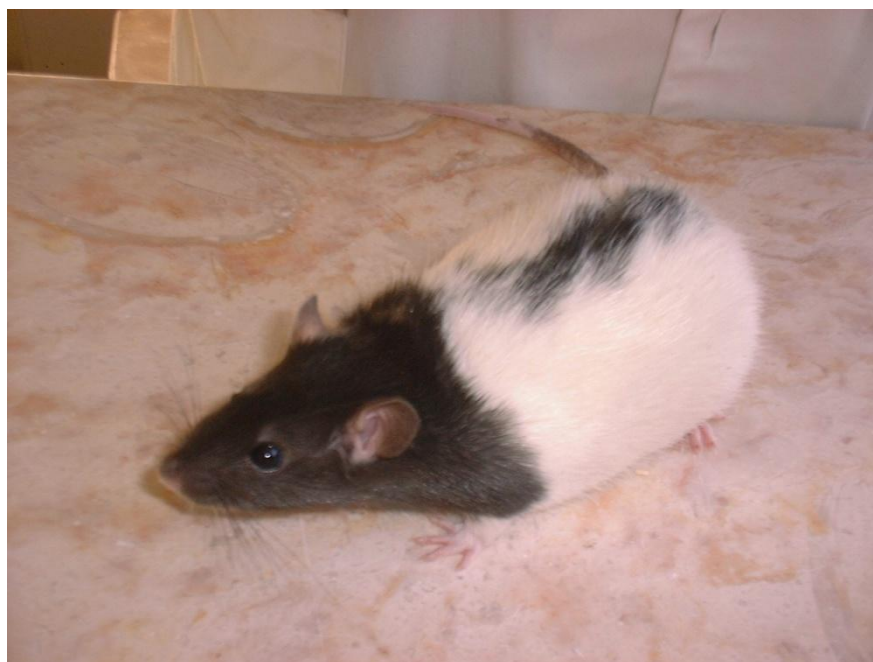


Figura 20 – Fotografia de rato ZDF/Gmi-*fa/fa* com 6 semanas de vida.

Este modelo animal, através de uma mutação genética, simula uma diabetes tipo 2 de um adulto humano e suas complicações, incluindo a pré-diabetes, a diabetes e numa fase mais tardia, uma diabetes avançada. De forma semelhante aos humanos, os ratos ZDF iniciam a doença com um estado de hiperglicemia baixo/moderado, desenvolvendo depois

uma fase de resistência à insulina e intolerância à glicose. Ao longo do tempo, os machos homocigóticos recessivos (*fa/fa*) desenvolvem obesidade, hiperlipidemia, hiperglicemia e DMT2. Neste modelo, a inflamação e o stresse oxidativo parecem ser cruciais para o desenvolvimento da diabetes (Masiello, 2006).

Como controlo são geralmente utilizados os ratos ZDF (+/+). Estes genótipos magros, (*fa/+*) e (+/+), permanecem normoglicêmicos e não sofrem alterações ao longo do tempo (Fig. 21) (Liao e col., 1997).

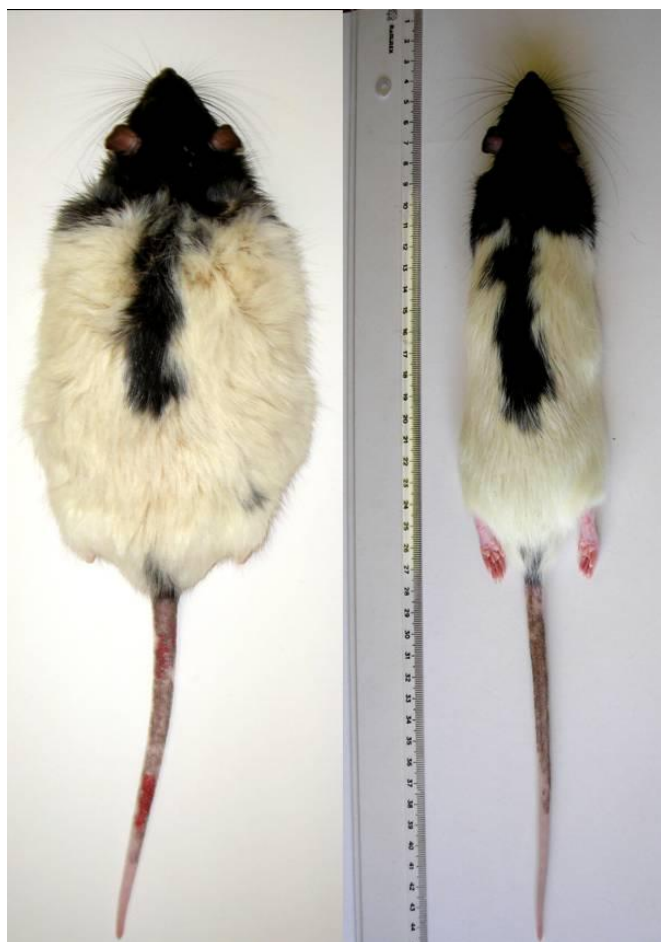


Figura 21 – Fotografia de ratos ZDF (Gmi *fa/fa*) e de ZDF (Gmi *+/+*) com 14 semanas de vida. São evidentes as diferenças no tamanho e peso destes ratos.

A diminuição da tolerância à glicose dos ratos ZDF (*fa/fa*) é o resultado de uma mutação no gene *fa*, ou seja, no receptor de leptina, associado à obesidade e, consequentemente, a uma resistência à insulina. Assim, a leptina tem a sua acção diminuída, apresentando valores sanguíneos elevados (Phillips e Liu, 1996).

A leptina (do grego leptos = magro) é uma proteína secretada por adipócitos e actua no sistema nervoso central de forma a promover a redução da ingestão de alimentos e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e incrementar o metabolismo de glicose e de gorduras (Phillips e Liu, 1996).

Nos ratos ZDF, a hiperglicemia é inicialmente manifestada perto das 7 semanas de idade, tornando-se diabéticos por volta das 12 semanas. Entre as 7 e as 10 semanas os níveis sanguíneos de insulina são elevados; contudo, estes níveis diminuem assim que as células β pancreáticas reduzem a resposta ao estímulo da glicose. A perda da resposta à glicose está associada à diminuição dos transportadores de GLUT2 nas células β dos ilhéus. Numa fase mais tardia, estes ratos iniciam uma perda de massa das células β .

Adicionalmente, os ratos ZDF (*fa/fa*) também desenvolvem retinopatias microvasculares, neuropatias, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Masiello, 2006).

Capítulo IV - Terapêutica actual da DMT2: O papel das incretinas

O tratamento da DMT2 inclui sobretudo o controlo da glicemia e a correcção “fisiológica” da resistência à insulina e das anomalias verificadas na sua secreção. Além da alteração dos estilos de vida, base inicial do tratamento, a terapêutica farmacológica é uma parte importante do tratamento, incluindo fármacos capazes de diminuir a resistência à insulina, tais como a metformina (MET) e as tiazolidinedionas (TZD) e fármacos secretagogos de insulina (ou mesmo insulina, em estadios mais avançados).

O tratamento medicamentoso na DMT2 deve ser iniciado quando as recomendações nutricionais e de actividade física se revelam manifestamente ineficazes para manter os níveis de HbA1c inferiores a 7,0%, mesmo em doentes sem queixas, com boa qualidade de vida, e aderentes às orientações nutricionais e de actividade física (Nathan e col., 2009).

Em doentes com DMT2, o risco de complicações está associado ao estado hiperglicémico prévio e qualquer redução nos níveis da HbA1c promove diminuição no risco de complicações. Verifica-se então que regimes de tratamento capazes de promover a redução dos níveis da HbA1c para valores próximos ou inferiores a 7% resultam numa redução significativa do risco de complicações microvasculares e de morte associada à diabetes ou associada a qualquer outra causa (Fig. 22) (Stratton e col., 2000).

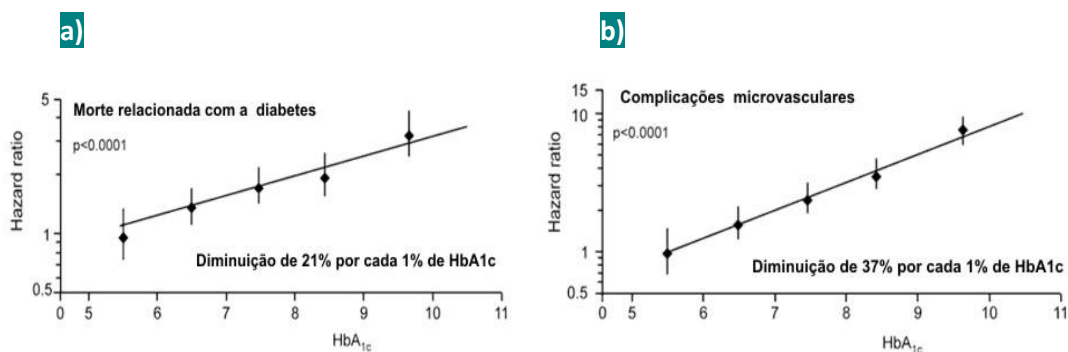


Figura 22 - **a)** Relação estabelecida entre a diminuição da HbA1c e morte associada à DMT2. **b)** Relação entre a diminuição de HbA1c e as complicações microvasculares (Adaptado de Stratton e col., 2000).

As recomendações actuais, propostas na última actualização do Consenso da Associação Europeia para o Estudo da Diabetes 2009 (EASD), justificam a selecção do tratamento adequado tendo por base a sua capacidade para alcançar e manter os objectivos glicémicos (Nathan e col., 2009).

Ao longo deste capítulo será feita referência aos diferentes tipos de antidiabéticos considerando a classe terapêutica em que se inserem, o mecanismo de acção, os principais efeitos fisiopatológicos, as reacções adversas e a eficácia.

1 - Fármacos utilizados no tratamento da DMT2 e sua eficácia terapêutica

1.1 - Necessidade de um tratamento faseado para monitorização da DMT2

Para que se possa compreender a lógica que preside à terapêutica instituída para o tratamento da DMT2 é necessário compreender a fisiopatologia desta síndrome (abordada no capítulo I e II). Trata-se de uma doença progressiva, definida por uma fase de insulino-resistência à qual está associada uma função anómala das células β pancreáticas, caracterizando-se a DMT2 por apresentar um estadio de hiperinsulinemia, ao qual se segue a insulinopenia relativa, acompanhada por uma deterioração do controlo da glicemia. Esta perda progressiva da capacidade secretora de insulina por parte do pâncreas aparece, como já referido, anos antes do diagnóstico.

Sendo, a disfunção das células β pancreáticas progressiva e continuada ao longo da vida do doente, parece pois racional que o tratamento específico da DMT2 seja também faseado e progressivo (Fig. 23).

Numa fase inicial, e no momento do diagnóstico, são recomendadas modificações no estilo de vida às quais podem, ou não, ser associados antidiabéticos, geralmente em monoterapia. Assim que se evidencia a insuficiência deste tratamento para manter o controlo da glicemia passa-se para um regime terapêutico em que se associam dois antidiabéticos orais. Como a doença progride, numa terceira fase, as terapias combinadas de dois fármacos podem deixar de ser efectivas, e aí a terapia tripla com agentes orais ou insulina é necessária.

Em seguida, e de uma forma breve, descreve-se as principais classes de antidiabéticos.

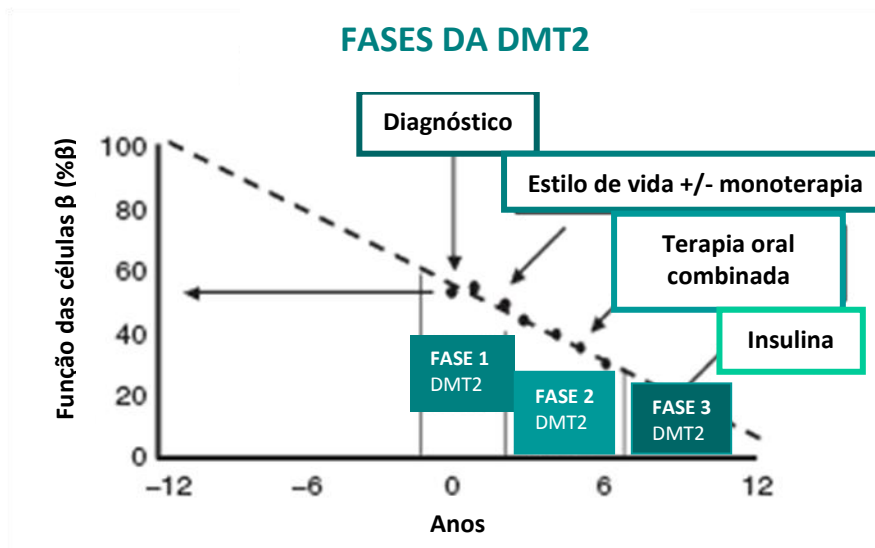


Figura 23 – Representação esquemática das fases de tratamento da diabetes tipo 2 (adaptado de Cefalu e col., 2007).

1.1.1 - Sensibilizadores da insulina

a) Metformina (MET)

Permanecem ainda desconhecidos os mecanismos exactos através dos quais a metformina exerce a sua acção. Contudo, esta parece aumentar a sensibilidade hepática à insulina, o que tem como resultado a diminuição da glicose hepática através da supressão da gluconeogénese e glicogenólise (Goodarzi e Bryer-Ash, 2005). A metformina aumenta, ainda que de uma forma modesta, a entrada de glicose a nível periférico, a oxigenação dos ácidos gordos (Bailey, 2005). Os efeitos da metformina parecem, pelo menos em parte, mediados pela proteína cinase activada pela adenosina monofosfato (AMPK); contudo, ainda não é claro se esta via representa o alvo único e específico deste fármaco.

A administração deste sensibilizador de insulina a indivíduos obesos aumentou os níveis de “glucagon-like peptide-1” (GLP-1), podendo esse efeito dever-se à estimulação directa da secreção de GLP-1 ou à redução da secreção dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (Mannucci e col., 2001; Lenhard e col., 2004).

A metformina melhora a acção da insulina, diminuindo os riscos cardiovasculares e a HbA1c, e permite ao doente a perda de peso, ou pelo menos a sua manutenção. Uma vez que este fármaco não exerce a sua acção por aumento da secreção de insulina, o número de episódios de hipoglicemia induzidos pela sua utilização em monoterapia é baixo. Porém, apresenta como efeito adverso a intolerância gastrointestinal, normalmente manifestada por náuseas, dor abdominal e diarreia (Cefalu, 2007).

b) Tiazolidinedionas (TZD)

Em 1997 foi comercializada a primeira tiazolidinediona (TZD) para o tratamento da DM2, acompanhada de alguma controvérsia, explicada pela toxicidade hepática do fármaco. Actualmente encontram-se comercializadas dois tipos de TZD, a *Rosiglitazona* e a *Pioglitazona*, ambas utilizadas numa fase mais tardia do tratamento da diabetes tipo 2. Seria de esperar que estes agentes, ao serem sensibilizadores da insulina, aumentassem directamente a sensibilidade da insulina no músculo, o que na verdade não acontece, uma vez que o primeiro efeito das TZDs é a alteração da transcrição de um gene (Cefalu, 2007), através da ligação ao “*peroxisome proliferated activated receptor-γ*” (PPAR- γ), expresso no tecido adiposo, células β pancreáticas, endotélio e macrófagos (Nathanson e col., 2009). Com esta ligação, os genes que modulam o metabolismo dos ácidos gordos livres encontram-se afectados, havendo uma redução, de aproximadamente 20 a 40%, nos ácidos gordos livres circulantes devido a um aumento de sinalização do receptor da insulina. Esta classe de agentes antidiabéticos melhora a função das células β ao diminuir a lipotoxicidade nas mesmas; todavia, o aparecimento de edemas e o aumento do peso em diabéticos submetidos a tratamento com tiazolidinedionas, parecem ser limitações à sua utilização (Sheehan e col., 2003).

1.1.2 - Secretagogos

c) Sulfonilureas

A classe de agentes antidiabéticos mais antiga (1950), e soberana do mercado por muitos anos, é denominada de sulfonilureas, sendo geralmente classificadas de 1ª, 2ª e 3ª geração. Recentemente é utilizada apenas em fases mais tardias da doença.

A actividade deste fármaco identifica-se com a conexão com o receptor sulfonilurea-1 (SUR-1), associado a canais de K⁺, nas células β pancreáticas (Virally e col., 2007). A comunicação do ligando-receptor resulta no fecho dos canais de K⁺, assim como na diminuição do seu efluxo, despolarização da membrana e consequente aumento do influxo de Ca⁺⁺ que, por sua vez, leva à exocitose dos grânulos de insulina.

Apesar da diminuição absoluta de HbA1c durante o primeiro ano de tratamento da diabetes tipo 2, as sulfonilureas apresentam como efeitos secundários hipoglicemia (número de casos difere consoante o tipo utilizado) e aumento de peso (\pm 2kg) (Lebovitz e col., 1992).

d) Secretagogos não-sulfonilureia

A *Repaglinida* e *Nateglinida* são dois agentes secretagogos de insulina, não considerados sulfonilureias. A *Repaglinida* é um derivado do ácido benzóico, introduzido em 1998. A *Nateglinida* foi inserida no mercado três anos mais tarde e é um derivado do aminoácido D-fenilalanina. Ao contrário das sulfonilureias, estes dois fármacos estimulam a libertação da primeira fase de insulina, de uma maneira dependente de glicose. Esta explosão rápida de insulina despoletada por uma refeição tem bastantes benefícios, como a rápida supressão da neoglicogénese, aumento da sensibilidade de insulina e, consequentemente, uma maior captação da carga de glicose. A estimulação rápida e curta de libertação de insulina reduz o risco de hipoglicemia e limita a exposição à hiperinsulinemia (Davies, 2002).

e) Inibidores α -glucosidase

Os inibidores de α -glucosidase são agentes que atrasam a absorção de glicose pelo tracto gastrintestinal.

Actualmente, a *Ascarbose* e o *Miglitol* são os dois inibidores da absorção de glicose comercializados. Ambos são inibidores competitivos da ligação de oligossacarídeos à enzima α -glucosidase (Cefalu, 2007). Encontrada no intestino delgado, esta enzima cliva oligossacarídeos em monossacarídeos, para poderem depois ser absorvidos. Os inibidores da enzima ao dificultarem a ligação e a degradação dos oligossacarídeos atrasam a absorção dos hidratos de carbono ingeridos, regulando os níveis de glicose pós-prandial, diminuindo-os, e apenas moderando a glicose plasmática em jejum e a HbA1c (Van de Laar e col., 2005).

Apesar de inferiores em relação a outros agentes, devido ao baixo controlo glicémico e distúrbios gastrintestinais, os inibidores da α -glucosidase não causam hipoglicemia ou aumento da massa corporal (Sheehan e col., 2003).

f) Insulina

Inversamente à diabetes tipo 1, onde a insulina é inexistente, na DMT2 a secreção de insulina pelas células do pâncreas é normal ou apenas insuficiente, pelo menos em estadios mais moderados. A falha nas células β é progressiva, como já referido, podendo tornar-se necessária a administração de insulina exógena na fase mais tardia da doença, de modo a controlar adequadamente a hiperglicemia (UKPDS, 1998).

O objectivo da terapia com insulina exógena é o de mimetizar a insulina endógena, segregada de forma normal e fisiológica em indivíduos não diabéticos. Originalmente, este tratamento tinha uma acção muito rápida e de curta duração, reduzindo a produção hepática de glicose e aumentando a captação periférica (Nathanson e col., 2009). A limitação da administração intravenosa de insulina é a dificuldade em otimizar o controlo glicémico, podendo o doente necessitar de múltiplas injeções diárias. No sentido de ultrapassar esta barreira, vias alternativas na administração da insulina têm sido estudadas, e incluem as vias nasal, oral, dérmica e pulmonar (Cefalu, 2007). Até então, a via pulmonar tem mostrado os melhores resultados na melhoria do controlo glicémico em DMT2 (Rosenstock e col., 2005).

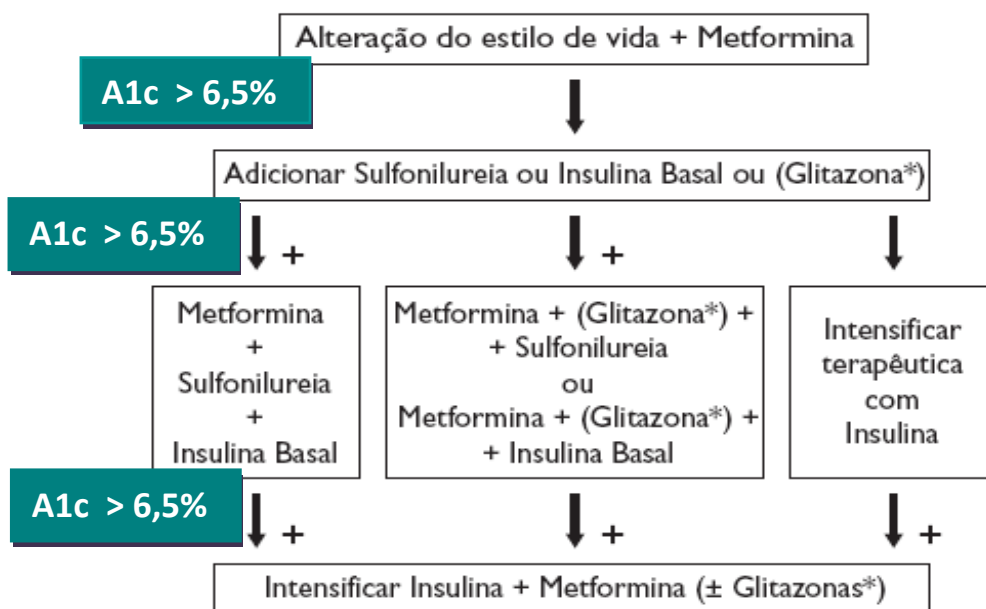
A terapêutica instituída para controlar os níveis de glicemia em diabéticos tipo 2 tem sofrido alterações. Através da combinação de todos os agentes antidiabéticos anteriormente mencionados, existe um número aceitável de opções para o tratamento da DMT2 (Tabela 3). Contudo, o principal problema reside na escolha do fármaco a usar para diferentes fases da doença. Como consequência de resultados pouco conclusivos de alguns artigos, e numa tentativa de resolução do problema, a ADA (2006) e a EASD (2006) publicam um algoritmo para a gestão do tratamento da DMT2 (Fig. 24) (Nathan e col., 2006).

Tabela 3 – Principais características dos agentes antihiperlipicémiacos disponíveis.

Intervenções	Redução de HA1c (%)	Modo de acção	Vantagens	Desvantagens
Metformina	1,5	Diminui a produção hepática de glicose	Efeito neutro no peso; barata	Efeitos gastrintestinais; acidose láctica (raro)
Sulfonilureias	1,5	Estimulam a secreção de insulina	Baixo custo	Aumento de peso; hipoglicemia
Glitazonas	0,5-1,5	Melhoram a sensibilidade à insulina	Melhoram o perfil lipídico e podem reduzir o risco de enfarte do miocárdio (Pioglitazona)	Retenção de fluidos; aumento do peso; preço elevado
Inibidores de α-glucosidases	0,5-0,8	Atrasam a absorção intestinal de glicose	Efeito neutro no peso	Efeitos gastrintestinais; múltiplas doses; preço
Meglitinidas	1-1,5	Estimulam a secreção de insulina	Duração acção curta; menor risco de hipoglicemia	Necessitam de ser tomadas com a refeição; preço elevado
Insulina	1,5-2,5	Estimula a captação periférica de glicose e diminui a produção hepática de glicose	Sem dose limite; barata; melhora o perfil lipídico	Injecções; monitorização; hipoglicemia; aumento de peso

(adaptado de Duarte e col., 2007)

Algoritmo para o Tratamento da DM tipo 2 (SPD 07)



* Ponderar risco para Ins. Cardíaca. A rosiglitazona mas provavelmente não a pioglitazona pode estar associada a um aumento de risco de enfarte do miocárdio.

Nota: Embora se possam utilizar três ADO em associação, deve-se preferir o início e intensificação da terapêutica com insulina com base na sua eficácia e menor custo.

Figura 24 – Algoritmo para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 recomendado pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia (adaptado de Duarte e col., 2007).

No entanto, a terapia deve ter em conta a fisiopatologia da diabetes de cada doente, individualmente, num dado momento da doença em termos de eficácia e segurança, assim como as limitações de cada fármaco, que inclui o aparecimento de episódios de hipoglicemia, o aumento do peso corporal e a estimulação do apetite (Fig. 25).

Uma anomalia primordial na DMT2 é a disfunção das células β , para o qual as TZDs são o único fármaco com capacidade de prevenção deste declínio progressivo da função celular pancreática, funcionando também como incentivo na pesquisa de um novo alvo terapêutico (Turner e col., 1999).

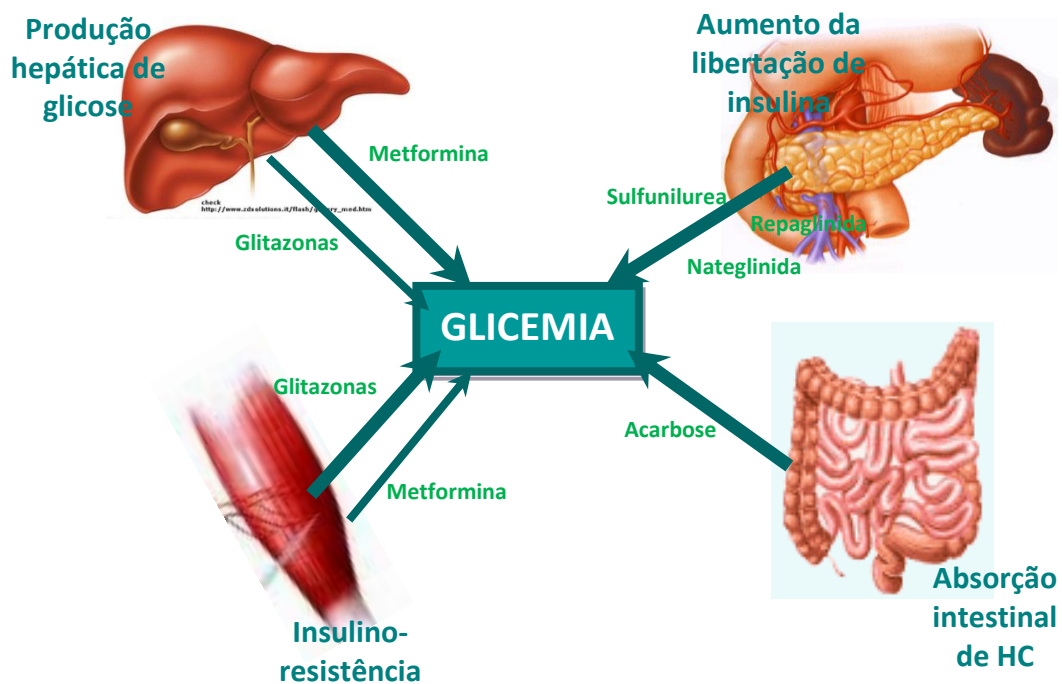


Figura 25 - Esquema representativo do mecanismo de ação dos antidiabéticos orais.

2- Incretinas

2.1 – “Conceito incretina”

O tracto gastrintestinal (GI) contém uma infinidade de peptídeos reguladores que transmitem informações não só para o intestino e órgãos associados como também para outros sistemas, como o sistema nervoso central e o cardiovascular.

Já no início do séc. XX se faziam experiências com extractos da mucosa do intestino delgado para tratamento da diabetes mellitus, tendo por base a ideia de que as hormonas gastrintestinais estimulavam a função endócrina do pâncreas (Geelhoed-Duijvestijn e col., 2007).

Historicamente, Bayliss e Starling, em 1905, examinaram os efeitos do extracto bruto intestinal na secreção pancreática exócrina, e relataram a existência de uma "secretina", o primeiro peptídeo regulador a ser identificado, introduzindo o conceito de hormona para descrever o seu modo de acção (Creutzfeldt e col., 2005). Pouco tempo depois, Moore e col. (1906), descobriram um estimulante químico para o pâncreas produzido pelo duodeno.

Em 1930, La Barre estudou os efeitos da administração de "secretina" impura, através de preparações intravenosas, sobre os valores da glicemia, e identificou estes peptídeos como incretinas. A palavra incretina (do inglês, *incretins*) provém da junção de parte das palavras *INtestin seCRETion INSulin*, e que ficou associado à própria síntese intestinal de hormonas semelhantes à insulina. No fundo, descreve um factor intestinal que reduz os valores da glicose sanguínea sem influenciar a secreção pancreática exócrina (La Barre, 1932). Contudo, seriam necessários mais de 30 anos, antes que estas conclusões prescientes mostrassem ter importantes implicações para a regulação da glicemia.

Na verdade, McIntyre e col. foram os primeiros a demonstrar o “**efeito incretina**”, em 1964. Este foi compreendido através da administração oral de glicose, que provocava um aumento mais significativo na secreção de insulina do que a mesma quantidade de glicose por via intravenosa, apesar de uma glicemia mais elevada depois da glicose oral do que após a glicose oral (McIntyre e col., 1964). Desta forma, a administração intravenosa resultou numa maior secreção de insulina, confirmando a existência de uma ligação entre o intestino e o pâncreas endócrino. Presumiu-se, assim, que determinadas hormonas gastrintestinais deveriam ter uma acção aditiva sobre a secreção de insulina.

Para que uma determinada hormona seja incluída no grupo das incretinas tem que cumprir estes 2 critérios essenciais (Ranganath e col., 2008):

- ser libertada em resposta à ingestão oral de glicose;
- ser capaz de alcançar uma concentração fisiológica *in vivo* que provoque a libertação de insulina.

O renascimento do termo incretinas foi em grande parte devido a Creutzfeld, que enfatizou a relação glicose-insulina-intestino no que se refere ao efeito incretina, uma característica que é de profunda importância para a sua aplicação clínica (Creutzfeldt, 1979).

Em 1986, Nauck e col. estudaram o efeito incretina (resposta da insulina à glicose oral vs. intravenosa), administrando 25, 50 e 100 g de glicose por via oral ou intravenosa aos indivíduos do estudo e medindo as concentrações de peptídeo C, que é usado como marcador da produção endógena de insulina. Esses investigadores constataram que o grau de secreção de incretinas dependia da quantidade de glicose ingerida e que as incretinas eram responsáveis por aproximadamente 80% da resposta de insulina depois da ingestão de 50 g de glicose (Chacra, 2006).

A pesquisa de hormonas incretínicas foi perseguida por uma série de investigadores, mas a identificação da primeira incretina resultou de uma forma inesperada. Quando John Brown, da Universidade de British Columbia, Vancouver, Canadá, tentava isolar uma hormona envolvida na regulação da secreção gástrica de ácido de extractos intestinais suínos: uma *enterogastrona*. Em colaboração com outros investigadores, identificou e isolou uma hormona composta por 42 aminoácidos, à qual deu a designação de “*gastric inhibitory polypeptide*” (GIP), também chamado “*glucose-dependent insulintropic polypeptide*” (Brown, 1971). Posteriormente, ficou demonstrado que esta substância estimulava a secreção de insulina numa relação glicose-dependente, portanto, era uma incretina (Brown, 1976).

Uns tempos mais tarde foi isolada uma segunda incretina a partir de estudos genéticos da próglucagina, que mostrou sequências codificantes de moléculas descritas como “*glucagon-related molecules*” (Lund, 2005). Foi identificado o “*glucagon-like peptide-1*” (GLP-1), e por cumprir os requisitos de incretina foi, como tal, assim chamado (Fig. 26).

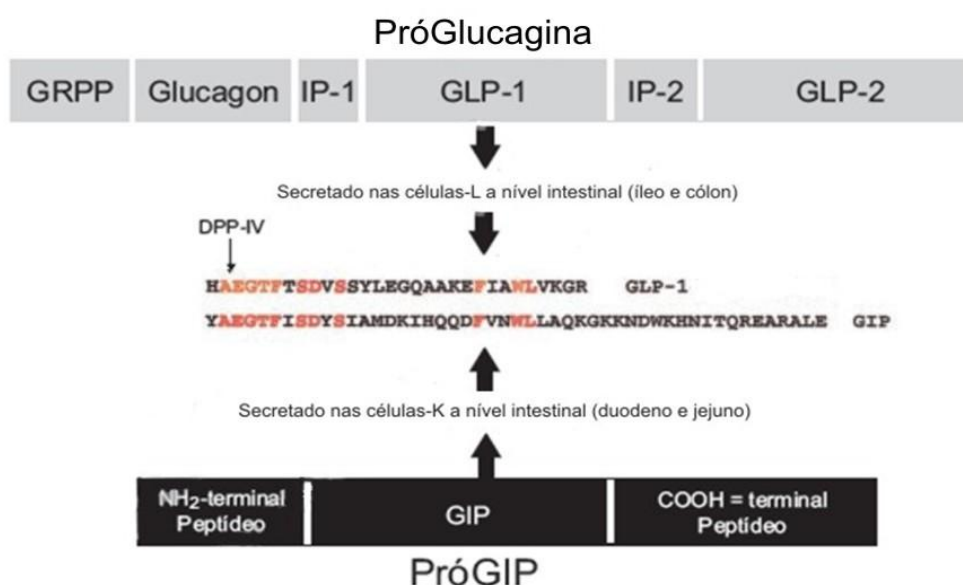


Figura 26 - GLP-1 e GIP: Homologia da sequência (as áreas a vermelho) (adaptado de Drucket e col., 2003). GLP-1: *glucagon-like peptide-1*; GIP: *gastric inhibitory polypeptide*; GRPP: peptídeo pancreático relacionado com glicentina; GLP-2: *glucagon-like peptide-2*; IP-1: peptídeo-1 interveniente; IP-2: peptídeo-2 interveniente.

O GIP é segregado nas células-K (enterocromafins), localizadas principalmente na mucosa duodenal e na parte proximal do jejuno, enquanto que as células-L produzem GLP-1 e estão localizadas mais distalmente (íleo e cólon) (Drucker, 2006). Durante a refeição, ambas as incretinas descritas (GIP e GLP-1) são libertadas na circulação e estimulam a secreção de insulina (McIntosh, 2008).

Os efeitos metabólicos, hormonais e neuronais sobre o pâncreas endócrino são referidos como “eixo entero-insular” (Fig.27). Apesar de o GIP e o GLP-1 serem as incretinas mais importantes produzidas a nível intestinal, o hipotálamo também produz uma incretina, o peptídeo “*pituitary adenylate cyclase-activating*” (PACAP) (Geelhoed-Duijvestijn, 2007).

Aproximadamente 30 a 60% do peptídeo C e 80 a 90% da resposta insulínica, após uma carga oral de glicose, são regulados por hormonas incretínicas, dependendo da quantidade de glicose. Por exemplo, o GIP induz cerca de 60% desse efeito incretina (Geelhoed-Duijvestijn, 2007). A acção incretínica sobre a célula β pancreática envolve uma série de eventos que potenciam a acção da glicose, e essa é uma característica importante protectora contra o desenvolvimento de hipoglicemia.

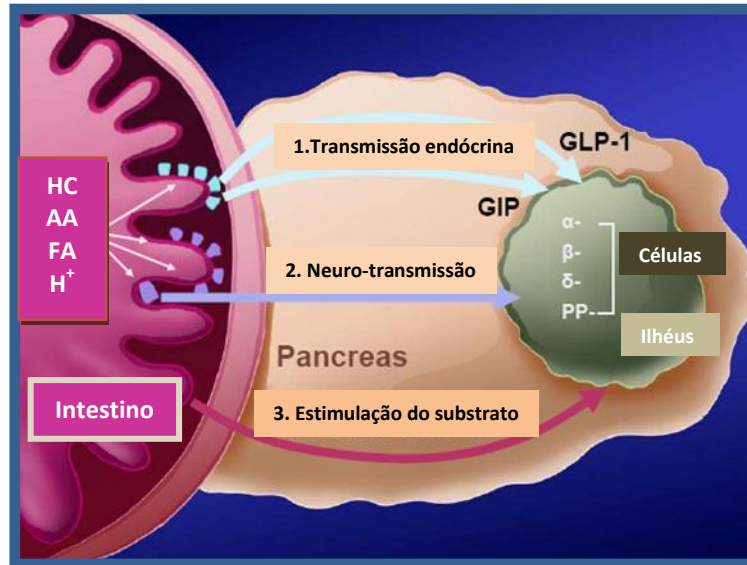


Figura 27 – Eixo “entero-insular”. Numa fase pós-prandial, a secreção de insulina é directamente estimulada por substratos, por neuro-transmissão (através de nervos entero-pancreáticos activados pela distensão intestinal), e por uma forte estimulação endócrina, monitorizada por incretinas (adaptado de Geelhoed-Duijvestijn, 2007). HC: Hidratos de carbono; AA: aminoácidos; FA: ácidos gordos; H⁺: hidrogénio proveniente da produção de ácido gástrico.

Uma nova propriedade destas incretinas, e que as tornam atraentes como potenciais agentes terapêuticos, é que a secreção de insulina associada cessa quando a euglicemia é alcançada, minimizando assim os riscos de hipoglicemia (Creutzfeldt e col., 1988).

O GIP e GLP-1 interagem com os seus próprios receptores específicos, membros de uma família de receptores da proteína G, que desencadeiam uma resposta intracelular, estimulando a adenilciclase e activando uma série de proteínas cinases. Estes peptídeos ligam-se a, pelo menos, seis receptores específicos de GIP e GLP-1 e são rapidamente metabolizados ($t_{1/2} \approx 2$ minutos) pela enzima omnipresente dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) em metabolitos inactivos, eliminados por via renal (Fig. 28) (Deacon e col., 1995).

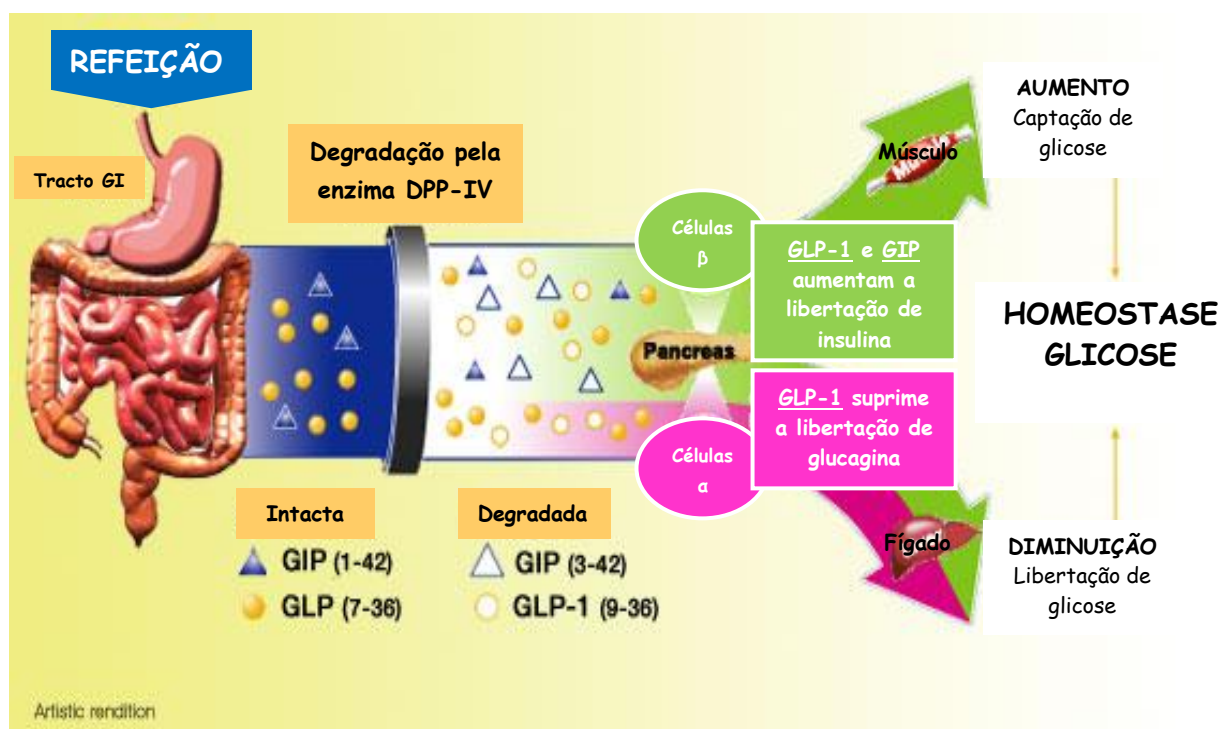


Figura 28 – Esquema representativo da secreção e inativação de GLP-1 (7-36) amida e GIP (1-42) (adaptado de Drucker e col., 2007). Depois de uma refeição, o GIP (1-42) e a GLP-1 (7-36) NH₂ são libertadas pelo intestino e rapidamente aumentam a secreção de insulina estimulada pela glicose (acção incretina). *In vivo*, a DPP-IV converte estas incretinas nos seus metabolitos inactivos GIP (3-42) e GLP-1 (9-36).

No que respeita ao seu mecanismo de acção, ambas as hormonas potenciam a resposta da glicose sobre as células através do encerramento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), resultando numa despolarização da membrana e influxo de iões cálcio, que facilitam o movimento e a exocitose dos grânulos contendo insulina, resultando na sua secreção endógena (Seino e col., 2005). Além da resposta por parte da célula β ao GIP e GLP-1, é agora claro que estes exercem uma notável variedade de acções que contribuem para o controle metabólico e outras funções fisiológicas (Fig. 29) (Drucker e col., 2007; Drucker e col., 2006).

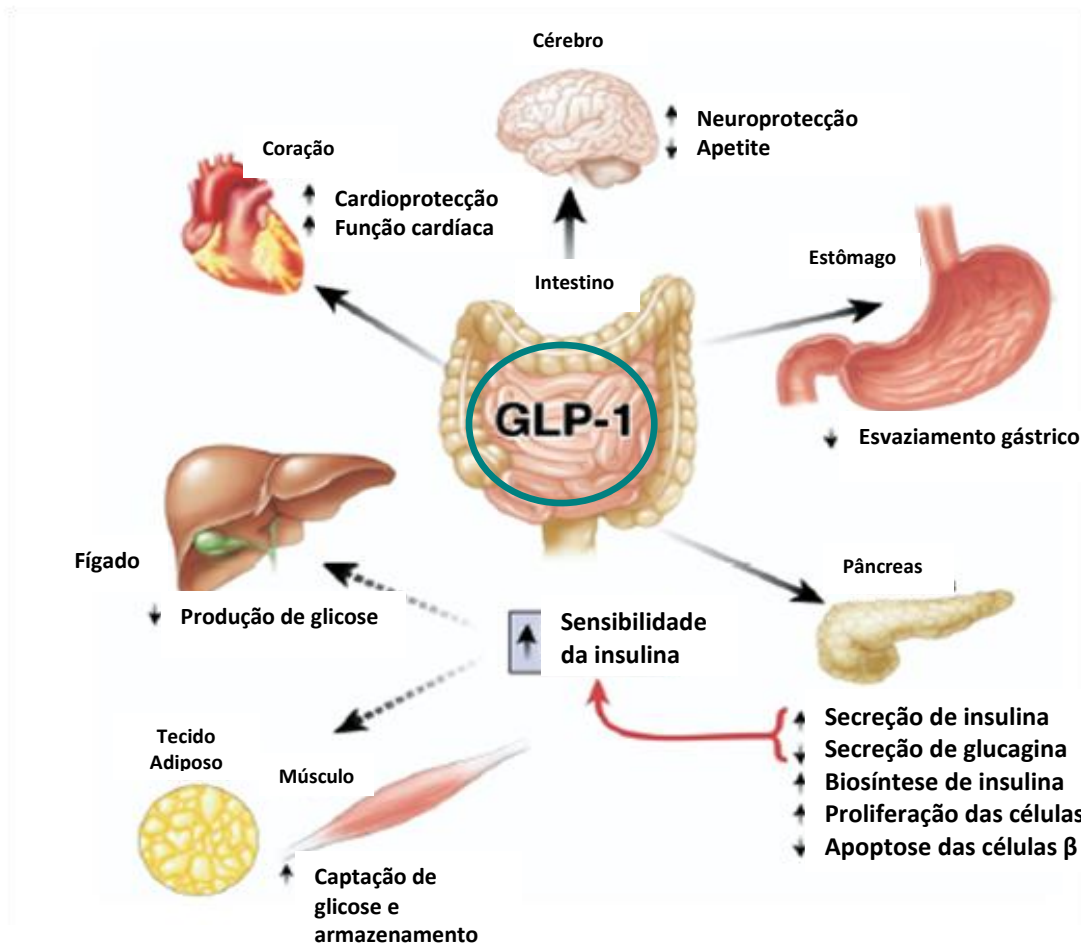


Figura 29 – A acção da GLP-1 nos tecidos periféricos (adaptado de Drucker e col., 2007). Os efeitos maioritários da GLP-1 são mediados pela interacção directa com os seus receptores em tecidos específicos. Contudo, no fígado, gordura e músculo a GLP-1 tem acção indirecta.

2.2 - Incretinas na DMT2

2.2.1 - Diminuição do efeito incretina na DMT2

A secreção de GLP-1 é reduzida em indivíduos obesos não diabéticos, sugerindo que a secreção de incretinas está alterada nos estádios iniciais da diabetes (Ranganath e col., 1996).

Nos doentes com DMT2, o efeito incretina apresenta-se diminuído ou ausente, o que contribui para a deficiência de secreção de insulina característica da doença (Nauck e col., 2004). Alguns autores referem que o efeito incretina é responsável por cerca de 60% da secreção de insulina pós-prandial, o qual se encontra diminuído na DMT2 (Gallwitz e col., 2005). Nestes doentes, o GIP tem uma secreção normal, mas o seu efeito insulínico encontra-se marcadamente reduzido, enquanto o GLP-1 tem a sua secreção reduzida mas a acção insulínica preservada, significando, desta forma, que ainda estimula eficazmente a secreção de insulina (Nauck e col., 2004). A causa para as propriedades divergentes do GIP e GLP-1 relativamente ao efeito incretina alterado na DMT2 não é totalmente entendida.

A secreção endógena de GIP na DMT2 é normal e a administração exógena de GIP não altera a resposta à insulina. Pelo contrário, a secreção endógena de GLP-1 na DMT2 está diminuída e a sua administração induz a secreção de insulina. A descoberta de que os doentes com DMT2 têm baixas concentrações de GLP-1, mas a resposta de secreção de insulina preservada, sustenta o potencial terapêutico dos tratamentos com GLP-1 (Chacra, 2006). Dessa forma, o GIP tem baixo potencial como terapia farmacológica, mas, em contrapartida, o GLP-1 tem um potencial terapêutico promissor como uma ferramenta farmacológica para o tratamento da DMT2, o que já foi proposto na década de 1990, altura em que se reviu a caracterização do efeito incretina (Holst, 1999).

Em contraste com outros agentes insulínicos, como por exemplo as sulfonilureias ou as glinidas, o efeito insulínico do GLP-1 depende das reais concentrações de glicose, proporcionando a possibilidade de normalizar os seus valores sem o risco de hipoglicemias, facto bastante relevante numa perspectiva terapêutica. Além disto, o GLP-1 tem uma variedade de efeitos fisiológicos adicionais que podem ser vantajosos na terapêutica da DMT2.

Tanto a secreção reduzida do GLP-1 como a actividade alterada do GIP contribuem para a resposta incretínica diminuída na DMT2. Alguns investigadores sugerem que cada um destes aspectos contribui para o desenvolvimento inicial da diabetes (Geelhoed-Duijvestijn, 2007).

O estudo UKPDS sugeriu que na altura do diagnóstico de DMT2 o doente apenas tem cerca de 50% da função das células β , diminuindo ainda mais nas fases seguintes. Actualmente, existe um interesse considerável na possibilidade que as incretinas possam manter a massa de células β , ainda mais quando a própria DMT2 está associada a uma perda da massa de células β .

A administração de GLP-1 em ambiente experimental, em roedores, bem como *in vitro*, demonstrou um aumento da massa de células β após utilização a longo prazo, devido a uma estimulação da neogénese dos ilhéus pancreáticos a partir de precursores celulares, por um lado, e a uma inibição da apoptose das células β , por outro.

Os efeitos sobre a massa de células β podem ser detectados indirectamente, a partir do aumento da capacidade de secreção de insulina nos indivíduos a receber GLP-1. No entanto, esse aumento não pode ser directamente quantificado a não ser por técnicas cirúrgicas invasivas. Em ilhéus isolados incubadas com o GLP-1, *in vitro*, a secreção de insulina glicose-dependente e a morfologia celular estão significativamente melhoradas. A razão para a expansão da massa de células β pelo GLP-1 é devido à inibição de vias apoptóticas e estimulação das vias sinalizadoras que levam a uma proliferação das células β . Os níveis RNAm de Bcl-2 e caspase 3, como marcadores de actividade apoptótica, estão diminuídos nos ilhéus pancreáticos incubados com o GLP-1.

A nível do sistema nervoso central, o GLP-1 actua como um neurotransmissor a nível do hipotálamo e estimula directamente a saciedade. A aplicação directa a nível intracerebroventricular de GLP-1 leva a uma diminuição da ingestão alimentar em roedores.

Periféricamente, várias funções gastrintestinais são influenciadas directa e indirectamente pelo GLP-1. O esvaziamento gástrico é retardado, e há evidências que o GLP-1 inibe a secreção gástrica ácida. Nos humanos, uma infusão contínua de GLP-1 por via subcutânea por mais de seis semanas leva a uma significativa perda de peso devido à redução da ingestão calórica atribuível ao aumento da sensação de saciedade (Drucker e col., 2007).

2.2.2 - Potencial terapêutico de GLP-1

Tanto o GIP como o GLP-1 mostraram estimular a secreção de insulina em indivíduos não obesos não diabéticos, mas, inesperadamente, os doentes com DMT2 responderam a GLP-1, mas são resistentes ao GIP. A causa subjacente a esta resistência humana na DMT2 ainda está por resolver. É devido a esta resistência por parte do GIP que a maioria dos estudos clínicos centraram-se sobre o potencial terapêutico de GLP-1.

As múltiplas acções do GLP-1 podem constituir um novo princípio terapêutico para o tratamento da DMT2, melhorando a situação metabólica pós-prandial e reduzindo o risco de eventos hipoglicémicos.

As incretinas, e particularmente o GLP-1, apresentam uma série de acções biológicas que favorecem o controlo da diabetes, tais como a capacidade de estimular a secreção de insulina de modo dependente da glicose, inibir a produção de glucagina, diminuir o apetite, retardar o esvaziamento gástrico e, pelo menos em modelos experimentais, ter a capacidade de preservar/aumentar a massa de células β pancreáticas (Tabela 4) (Gallwitz e col., 2005).

Tabela 4 – Efeitos do GLP-1 na diabetes mellitus tipo 2.

Efeitos da GLP-1 na DMT2	
1	Melhoria do efeito incretina
2	Estimular a secreção de insulina de modo dependente da glicose
3	Melhoria da hiperglicemia, em jejum e pós-prandial e menor risco de hipoglicemia
4	Melhoria da deficiência relativa de insulina e do defeito secretor
5	Redução da secreção de glucagina
6	Retardamento do esvaziamento gástrico e diminuição do apetite
7	Diminuição do peso relativo
8	Efeito regenerativo das células β pancreáticas (neogénese e inibição apoptose)

(adaptado de Gallwitz, 2005)

2.3 - Incretinomiméticos

A procura de novas e efectivas terapias para a diabetes tipo 2 levou à identificação de um novo alvo terapêutico, as hormonas incretina. Surgiram, assim, os Miméticos de incretina que contribuem para a homeostase da glicose.

Inicialmente, estudaram-se os efeitos do GLP-1 exógeno em pacientes com DMT2, mas a sua rápida inactivação pela DPP-IV, e a impraticabilidade de infusão contínua, levou à chegada de estratégias farmacológicas para contornar estas limitações, modificando a GLP-1 nativa de modo a combater a sua semi-vida reduzida. Partindo da substituição de alguns aminoácidos responsáveis pela elevada afinidade da hormona pela DPP-IV, surge um agonista da GLP-1, o *Exenatido*. Derivado de exendina-4, que é um peptídeo natural encontrado na glândula salivar do lagarto *Heloderma suspectum* (Monstro de Gila), apresenta cerca de 50% de homologia na sequência de aminoácidos com o GLP-1. A exendina-4 aparece na circulação sanguínea deste animal quando há um processo de deglutição, sendo resistente à acção da DPP-IV nos mamíferos. Trata-se de um agonista total dos receptores GLP-1, que é eliminado a nível renal, exclusivamente por filtração glomerular e com uma semi vida de 30 minutos, quando administrado por i.v. (Holst e col., 2008). Os seus efeitos são conseguidos pela ligação ao receptor da GLP-1, mesmo aquando utilizado com outros agentes antidiabéticos. Normalmente, é recomendado numa fase inicial da doença ou como alternativa à falha de um seguro e continuo controlo glicémico.

Outro incretinomimético é o *Liraglutido*. Este é baseado na estrutura do GLP-1 humano, mas modificado, permitindo que a molécula se ligue à albumina, impedindo assim a eliminação renal e degradação pela DPP-IV. Esta molécula apresenta uma semi-vida de 11 a 13 horas depois da administração subcutânea, sendo lentamente absorvida e adequada para uma injeção diária (Agerso e col., 1992).

Os estudos clínicos utilizando *Exenatido* e *Liraglutido* demonstraram efeitos sustentados na HbA1c, na redução do peso corporal, na supressão da síntese de glucagina, no atraso do esvaziamento gástrico e numa melhor função das células β em doentes com DMT2. As náuseas e vómitos, assim como a hipoglicemia, são alguns efeitos adversos destas drogas (Tabela 5) (Buse e col., 2007).

Tabela 5 – Principais características do *Exenatido*.

Intervenção	Redução de A1c (%)	Modo de acção principal	Vantagens	Desvantagens
<i>Exenatido</i>	0,5-1,0	Estimula a secreção de insulina e suprime a glucagina; atrasa o esvaziamento gástrico; reduz a ingestão calórica	Perda de peso	Necessidade de injeções; efeitos gastrointestinais; preço; experiência limitada

(adaptado de Duarte e col., 2007)

2.4 – Inibidores da DPP-IV - Gliptinas

Como já foi mencionado, o que inviabiliza o uso terapêutico do GLP-1 é o tempo de semi-vida plasmática extremamente curto (≈ 2 minutos), devido à sua rápida clivagem e inactivação pela DPP-IV (Cefalu, 2007). A prevenção da degradação das incretinas pela inibição da enzima DPP-IV surge, assim, como uma nova estratégia terapêutica para aumentar a acção de GLP-1 e GIP endógenos.

A DPP-IV é responsável pela clivagem, bastante rápida, a nível do penúltimo aminoácido alanina da molécula de GLP-1, resultando na sua inactivação, processo já descrito em 1995, por Deacon e col. (Fig. 30).



Figura 30 – Molécula de GLP-1 e local de clivagem a nível do penúltimo aminoácido – alanina. A imagem é uma representação esquemática da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (adaptado de Gallwitz 2005).

A DPP-IV é uma enzima que tanto se encontra à superfície celular como em circulação no sangue e em outros fluidos corporais, sendo denominada também por CD26 (antígeno de activação de linfócitos T). É composta por 766 aminoácidos, e encontra-se distribuída por todo o corpo (Zerilli e col., 2007; Miller e col., 2006).

A DPP-IV está envolvida em determinados processos sinalizadores intracelulares, funcionando como uma proteína envolvida em determinadas respostas celulares. Tais respostas não parecem ser afectadas pela acção dos inibidores da DPP-IV. Estudos recentes dão conta de um envolvimento no metabolismo do peptídeo YY, associado a uma diminuição da motilidade gástrica (diminuição do esvaziamento gástrico), aumento da absorção de água e electrólitos a nível do cólon, e alteração de funções mesmo a nível pancreático, quer na parte exócrina quer na parte endócrina, nomeadamente no que se refere à secreção de insulina. Esta enzima também desempenha um papel importante a nível do metabolismo do neuropeptídeo Y, que está envolvido na regulação da ingestão alimentar e da obesidade. Finalmente, a enzima DPP-IV apresenta uma série de efeitos no metabolismo e activação de muitos outros peptídeos reguladores, incluindo: GIP, endorfinas, enterostatina, peptídeo libertador de gastrina (GRP) e factor de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1).

As substâncias inibidoras da DPP-IV também se denominam de “gliptinas”, e apresentam como característica principal o prolongamento da duração de acção do GLP-1 produzido no organismo. A prova clínica da sua utilização surgiu por Ahren e col. (2004), quando demonstram um significativo efeito redutor da hiperglicemia pós-prandial, da redução da glicemia em jejum e dos valores de HbA1c após a administração oral de sitagliptina, durante 4 semanas, num estudo em doentes com DMT2.

A *Sitagliptina* e a *Vidaglitina* são dois inibidores da DPP-IV actualmente comercializados em Portugal. São fármacos activos por via oral, de baixo peso molecular, que inibem de forma reversível e competitiva a enzima, podendo atingir até 90% de inibição da actividade da DPP-IV plasmática, até 24 horas *in vivo*. Estudos recentes demonstram a elevada competência destes agentes anti-hiperglicémicos no aumento de níveis plasmáticos de GLP-1 e GIP biologicamente activos, e consequentemente, no aumento da estimulação de insulina e inibição da secreção de glucagina, dependente de glicose, assim como na promoção da proliferação das células β , neogenese e inibição da sua apoptose.

A eficácia dos inibidores de DPP-4 é dependente da capacidade secretória da incretina endógena, que, por sua vez, é influenciada pelos níveis plasmáticos de glicose, excluindo assim a possibilidade deste agente poder provocar hipoglicemia. Adicionalmente, estudos a longo prazo com os inibidores da DPP-IV no desenvolvimento clínico têm revelado um bom perfil de segurança, tolerância e sem efeitos adversos imunes (Tabela 6) (Stein e col., 2007; Miller e col., 2006).

Os inibidores da DPP-IV encerram, actualmente, grandes expectativas, sobretudo pelo seu possível interesse na prevenção da deterioração da função das células β pancreáticas, principalmente em estadios iniciais da doença.

Tabela 6 – Principais características dos inibidores de DPP-IV.

Intervenção	Redução de A1c (%)	Modo de acção principal	Vantagens	Desvantagens
<i>Sitagliptina</i> <i>Vidagliptina</i>	0,5-0,8	Estimulam a secreção de insulina	Baixo risco de hipoglicemia; efeito neutro no peso	Experiência limitada; preço

(adaptado de Duarte e col., 2007)

2.5 – Sitagliptina

Em Novembro de 2007, o INFARMED aprovou a comercialização da sitagliptina, um inibidor selectivo da DPP-IV, que mostrou reduzir os níveis de glicose no sangue, quer nos períodos pós-prandiais, quer em jejum. Este fármaco actua de forma diferente dos outros antidiabéticos já disponíveis no mercado, sendo activo por via oral (Drucker e col., 2003; Ahren e col., 2004).

A molécula de Sitagliptina, com peso molecular de 523.32Da, corresponde quimicamente a *7-[(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorophenyl) butyl]-5,6,7,8-tetrahydro-3-(trifluormethyl)-1,2,4-triazolo[4,3-a] pyrazine phosphate (1:1)monohydrate* (Fig.31) (Kenji e col., 2008).

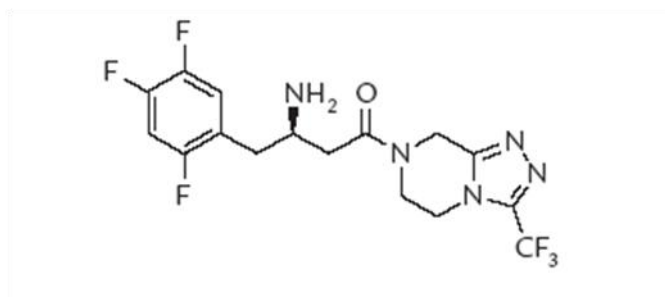


Figura 31 – Estrutura química de sitagliptina (adaptado de Kenji e col., 2008).

A sitagliptina é um inibidor de elevada selectividade da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), bastante eficaz no tratamento da DM2 (Herman e col., 2007). Naturalmente, encontra-se em concentrações elevadas nos rins, intestinos e medula óssea, células T e B, e ainda em tecidos como o fígado, o pâncreas, a placenta e células epiteliais, entre outros (Miller e col., 2006). Apesar da afinidade da DPP-IV para a GLP-1 e GIP, esta enzima circulante no plasma cliva outros peptídeos, como o polipeptídeo activador da adenilato ciclase hipofisária (PACAP), o peptídeo libertador de gastrina (GRP) e outros implicados na regulação da homeostase da glicose, podendo exercer efeitos adicionais favoráveis para o tratamento (Gallwitz, 2007).

Ao inibir a DPP-IV, seria de esperar que a sitagliptina despertasse efeitos adversos na inibição de enzimas semelhantes a esta, como a fibroblast-activating proteín- α (FAP- α), DPP-II, DPP-VIII e DPP-IX, cujas inibições estão associadas a efeitos tóxicos detectados em animais, como a trombocitopenia e a anemia. Porém, a elevada selectividade da sitagliptina para a DPP-IV, em relação a outras proteases, explica a ausência de efeitos colaterais (Miller e col., 2006).

É atribuído à sitagliptina o prolongamento dos efeitos positivos da GLP-1, aumentando os níveis na circulação desta incretina activa. Como a GLP-1 é libertada de uma maneira dependente de glicose, não é esperado que os inibidores de DPP-IV provoquem hipoglicemia, tornando este fármaco um possível tratamento de sucesso, juntamente com um regime de dose apropriada e bons perfis de eficácia e segurança (Miller e col., 2006).

2.5.1 – Mecanismo de acção

A sitagliptina tem como mecanismo alvo a inibição da enzima proteolítica ubíqua DPP-IV. Como referido anteriormente, esta é uma protease de superfície celular e, por vezes, sob forma solúvel no sangue, responsável pela clivagem da GLP-1 e da GIP, definida pela quebra das ligações peptídicas, ao nível do aminoácido alanina ou prolina, que se encontram na posição 2 da extremidade amina da cadeia peptídica (Gallwitz, 2007).

Depois de libertadas pelo intestino, a GLP-1 e GIP resistentes à clivagem da DPP-IV, activam os seus receptores nas células β pancreáticas, conduzindo ao aumento de cAMP e cálcio intracelular, com subsequente secreção de insulina dependente de glicose. Este progresso de função deve-se também à estimulação da proliferação e resistência à apoptose das células β , provocada pela activação destes receptores (Zerilli e col., 2007).

A sitagliptina apresenta uma biodisponibilidade de 87% e pode ser tomada com ou sem alimentos. A sua metabolização hepática é mínima e grande parte é eliminada por via renal inalterada. O tempo de semi-vida é de aproximadamente 12 horas.

Das funções adicionais das incretinas fazem parte a inibição da secreção da glucagina pelas células α pancreáticas, a diminuição da produção da glicose hepática, o esvaziamento gástrico e o aumento da captação de glicose utilizada em mecanismos neuronais (Drucker e col., 2006; Barnett, 2006).

2.5.2 – Estabilidade e segurança

O tratamento da DMT2 com sitagliptina aparenta ser seguro e estável. Quando administrada em monoterapia ou em combinação com metformina ou tiazolidinediona, a sitagliptina melhora o controlo glicémico.

Este agente tem por mecanismo o aumento de incretinas activas, que apenas são secretadas, dependendo dos níveis sanguíneos de glicose, não provocando hipoglicemia e/ou qualquer alteração no peso (Miller e col., 2006). Contrariamente à sitagliptina, as sulfonilureas e outros antihiperlicémicos, aumentam a secreção de insulina, directamente ou indirectamente, mesmo quando os níveis de glicose se encontram diminuídos, podendo provocar hipoglicemia, tanto em indivíduos saudáveis ou em diabéticos do tipo 2.

A inibição da DPP-IV está associada a alguns casos de nasofaringite, infecção respiratória e enxaqueca, mesmo não sendo consequências severas.

Em relação à dose deste agente, esta deve ser ajustada ao doente, em caso de disfunção renal severa ou moderada. Recentemente foram publicados alguns casos de reacções de hipersensibilidade com esta droga (Merck and Co, Inc, 2007; Green e col., 2008). Porém, a terapia de 100 mg diárias de sitagliptina resulta num aumento expressivo dos níveis de GLP-1 activos, inibindo perto de 90% da enzima DPP-IV (Miller e col., 2006). Resulta também numa diminuição significativa da HbA1c, de glicose plasmática em jejum e de glicose pós-prandial até 2 h, quando comparado com estudos placebo, de duração de 18 e 24 semanas. Melhoras ao nível de marcadores de funções das células β , como HOMA- β (*homeostase model assessment- β*), razão insulina proinsulina e resposta das células β são também exemplos da extensibilidade da eficácia da sitagliptina (Merck Sharp and Dohme, 2008).

2.5.3 – Lugar na terapêutica da DMT2

A DMT2 e as suas complicações representam uma grande preocupação de saúde pública mundial. Apesar dos benefícios de um bom controlo glicémico terem sido documentados, ainda é difícil atingir e manter níveis desejáveis de HbA1c. Uma possível explicação para esta inabilidade dos fármacos tradicionais é a incapacidade de impedir a perda progressiva das células β e da sua função.

Os estudos clínicos com miméticos de incretinas colocam estes agentes, bem como os inibidores da DPP-IV, como novas e interessantes alternativas para o tratamento da DMT2. Os múltiplos mecanismos de acção incluem: secreção de insulina dependente da glicemia, supressão da hiper glucagonemia, retardamento do esvaziamento gástrico e inibição da ingestão calórica. Para além disso, existe uma melhoria da principal morbidade médica subjacente: a obesidade. A redução de peso (miméticos de incretinas ou terapêutica combinada com inibidores DPP-IV), em combinação com o potencial de preservação ou mesmo recuperação da função das células β , constituem uma ampliação do espectro clínico das incretinas.

O mecanismo de acção dos inibidores da DPP-IV é essencialmente estabilizar o GLP-1 endógeno através da inibição da enzima que o degrada. Desta forma, parece tratar-se de

uma classe de fármacos que será mais ideal nas fases iniciais da diabetes, quando o doente ainda preserva uma população de células β capaz de responder ao estímulo do GLP-1, e, ao mesmo tempo, um nível de HbA1c compatível com a expectativa de atingir as metas de um bom controlo após a redução esperada com o uso dos fármacos desta classe terapêutica. A sitagliptina como novo anti-hiperglicémico, reflecte esta função e preserva ou reverte o declínio da função das células β e, conseqüentemente, um possível progresso na secreção de insulina. Por outro lado, em função do seu benefício na redução dos níveis de glucagina, os inibidores da DPP-IV também podem ser utilizados em fases mais avançadas da doença, em associação com outros antidiabéticos orais (actual indicação terapêutica).

Recentemente, tanto a ADA quanto a EASD publicaram um consenso indicando a metformina como o fármaco de eleição para o tratamento inicial. Há já alusão quer aos miméticos de incretinas, quer aos inibidores da DPP-IV, sendo a sua referência colocada como uma terapêutica de segunda linha, mas podendo ser escolhas apropriadas para alguns doentes (Nathan e col., 2009).

Os inibidores da DPP-IV constituem, em Portugal, uma classe inovadora de agentes orais para o tratamento da DMT2. A sua tolerabilidade e segurança são importantes vantagens para o seu uso, embora ainda sejam necessários estudos de longo prazo.

2.5.4 – Utilização em monoterapia ou em associação com outros antidiabéticos

Nos últimos anos, vários estudos têm tentado centrar-se na eficácia e segurança dos inibidores da DPP-IV nas fases mais precoces da DMT2, tanto em doentes em fase de diagnóstico como em doentes com diabetes avançada, tanto em monoterapia como em combinação com outros fármacos (tanto *versus* placebo como *versus* outros agentes antidiabéticos).

A sitagliptina em monoterapia promoveu uma diminuição média de 0,94% dos níveis de HbA1c quando usada em monoterapia (Aschner e col., 2006), podendo este resultado ser utilizado de uma forma cumulativa com a adição de outros antidiabéticos orais. Em associação com a metformina (Charbonnel e col., 2006) ou com a pioglitazona (Rosenstock e col., 2006), a redução da HbA1c é potenciada e existe um efeito semelhante ao das sulfonilureias na redução da HbA1c mas sem aumento do número de hipoglicemias (Nauck e col., 2007).

Considerando a boa tolerância e utilidade dos inibidores de DPP-4, que não provocam hipoglicemia, aumento de peso ou interação com este agente, e provocam a estimulação da sobrevivência das células β , é possível arguir a combinação da metformina com a sitagliptina, na fase inicial de tratamento ou em diabéticos que têm dificuldade controlar a glicemia somente com metformina.

A eficácia e segurança da sitagliptina quando comparada com uma sulfonilurea, a glipizida, em doentes com DMT2, mostra uma diminuição de HbA1c mais razoável, diminuindo o risco de hipoglicemia e aumento de peso, ao contrario das sulfonilureas, onde é bastante comum a hipoglicemia. Quando combinados estes dois fármacos é atingido um bom controlo glicémico.

As tiazolidinedionas diminuem a HbA1c mas aumentam significativamente o peso. Em combinação com o inibidor da DPP-IV, o tratamento torna-se mais eficaz que com as tiazolidinedionas sozinhas, pois melhora o controlo glicémico, diminui o risco de hipoglicemia e influenciam ambas a disfunção das células β (Penforis e col., 2008).

De um modo geral, a maioria dos ensaios clínicos envolvendo a sitagliptina em combinação com outros antidiabéticos orais indica que os inibidores da DPP-IV produzem uma melhoria dos parâmetros glicémicos, de uma forma incremental e por vezes aditiva.

Em Portugal foi autorizada uma combinação de dose fixa (50/850 mg e 50/1000 mg sitagliptina/metformina) pelo interesse cumulativo da sua utilização.

Em doentes com DMT2 as associações terapêuticas que envolvem a sitagliptina com outros fármacos apresentam as seguintes indicações (Januvia, 2007):

- associação com a metformina quando a dieta e o exercício, associados a metformina em monoterapia, não proporcionam um adequado controlo da glicemia.
- associação com uma sulfonilureia quando a dieta e o exercício, associados a uma dose máxima tolerada de sulfonilureia em monoterapia, não proporcionam um adequado controlo da glicemia e quando a metformina é inapropriada devido a contra-indicação ou intolerância.
- associação com uma sulfonilureia e metformina quando a dieta e o exercício, associados a uma terapêutica dupla com estes fármacos, não proporcionam o adequado controlo da glicemia.
- associação com o agonista do PPAR γ quando a dieta e o exercício, associados ao agonista do PPAR γ isoladamente, não proporcionam um adequado controlo da glicemia.

Parte II

DEFINIÇÃO E JUSTIFICAÇÃO DOS OBJECTIVOS

A diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) é uma enfermidade metabólica complexa, de natureza poligénica, caracterizada por uma hiperglicemia resultante de uma inadequada actividade da insulina, que é desencadeada quando a secreção da insulina por parte do pâncreas não pode compensar a resistência à mesma nos tecidos periféricos. A sua incidência e prevalência contínua em crescimento no Mundo inteiro. De acordo com a OMS, em todo o Mundo, o número de diabéticos, que em 1997 se situava nos 135 milhões, ultrapassará em 2030 os 300 milhões.

A DMT2 é responsável por uma significativa redução da esperança e da qualidade de vida dos doentes e um encargo significativo para a sociedade, devido aos custos com os cuidados de saúde que implica. Actualmente, o seu diagnóstico ocorre já em muitos indivíduos com menos de 15 anos de vida, sublinhando-se o facto de que a prevenção da DMT2 deve começar na infância. O combate ao sedentarismo é, sem dúvida, da maior importância pela influência que pode exercer sobre o aparecimento desta doença. Os benefícios para a saúde resultantes de uma dieta e prática do exercício físico regular são múltiplos e de tal modo diversificados que poderá afirmar-se que nenhum sistema orgânico escapa à sua influência. Contudo, a evolução natural da DMT2 torna esta medida insuficiente para o tratamento da doença. E, desta forma, a estratégia passa a ser a de acompanhar as mudanças de estilo de vida com medidas farmacológicas.

Actualmente, existe uma vasta classe de fármacos, com diversos mecanismos de acção que tentam o mesmo objectivo, que passa essencialmente pelo controlo da glicemia dentro de valores normais. Contudo, a diabetes é uma doença metabólica bastante complexa e muitas vezes os fármacos apresentam algumas limitações e efeitos adversos.

Em 2007 surge a sitagliptina, que pertence a uma nova classe de antidiabéticos, os moduladores de incretinas. Este fármaco inibe a dipeptidil peptidase-IV, uma enzima responsável pela inactivação/degradação de duas incretinas, o GLP-1 e o GIP. Através deste mecanismo de acção, alguns estudos mostram que a sitagliptina consegue uma diminuição significativa de HbA1c, de glicose plasmática em jejum e de glicose pós-prandial até 2 h, assim como melhorias ao nível de marcadores da função das células β . Contudo, o seu recente aparecimento faz também com que ainda haja muito por desvendar, e a avaliação do efeito da sitagliptina nas diferentes fases da diabetes não tem sido suficientemente estudada.

Por ser tecnicamente complicado e eticamente não aceitável a realização destes estudos em humanos diabéticos, a utilização de um modelo experimental animal adequado pode constituir uma alternativa de extrema pertinência e utilidade.

Deste modo, os objectivos gerais do presente trabalho foram:

- **Caracterização do modelo animal experimental de DMT2 e sua evolução, com avaliação do seu perfil bioquímico, inflamatório e equilíbrio oxidativo;**
- **Avaliação do efeito da sitagliptina na prevenção e progressão da doença, tendo em conta os parâmetros usados para caracterizar o modelo;**
- **Avaliação do melhor momento para iniciar a terapêutica com sitagliptina, tendo em conta 3 fases distintas da DMT2.**

Objectivos específicos

Para a concretização daqueles objectivos gerais, iniciámos os estudos pela caracterização do modelo animal de DMT2. Considerando a dificuldade da abordagem experimental da DMT2 há necessidade de encontrar um modelo que se aproxime o mais possível da realidade clínica, razão pela qual escolhemos os ratos *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF) que, como será explicado, consegue reproduzir os diferentes estadios da diabetes humana.

Com base no seu ainda recente aparecimento e pela carência de estudos, principalmente a longo prazo, e por aparentemente ser uma promessa na terapêutica da diabetes, o fármaco escolhido para o estudo foi a sitagliptina (um inibidor da DPP-IV). Para a avaliação dos efeitos da sitagliptina foram escolhidos os 3 grupos de ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*) com administração de sitagliptina a diferentes tempos *versus* o grupo sem fármaco, assim como os tempos de sacrifício, comparando-se com os controlos ZDF (+/+) em idênticas condições experimentais.

Nos grupos com e sem sitagliptina, para ratos ZDF (*fa/fa*) e (+/+), e no que diz respeito à avaliação basal, foram realizadas as seguintes tarefas, enquanto objectivos específicos:

- Determinação de peso, perímetro abdominal e comida ingerida;
- Caracterização do perfil glicémico (glicose e HbA1c), da insulinemia e do HOMA-IR;
- Avaliação das pressões arteriais e da frequência cardíaca;
- Determinação de alguns indicadores de trofismo de alguns órgãos;
- Caracterização do perfil lipídico;
- Avaliação da função pancreática e renal;
- Determinação da agregação plaquetar.

Relativamente a estes parâmetros, foi avaliado o efeito da sitagliptina, durante 6, 12 e 18 semanas, em diferentes tempos de estudo.

Constatando-se que o stresse oxidativo aparece associado à DMT2 e às complicações micro e macrovascular a ela associadas, subsistem, contudo, ainda algumas dúvidas quanto à natureza e magnitude dos mecanismos de stresse oxidativo subjacentes às complicações diabéticas. Em princípio, tudo indica que uma hiperglicemia crónica pode contribuir para a formação de espécies reactivas de oxigénio e de produtos avançados de glicação (AGEs), que não só induzem lesões a nível celular como também diminuem a capacidade protectora antioxidante. Desta forma, tentámos avaliar quais as alterações no equilíbrio oxidante/antioxidante neste modelo experimental e qual a influência da sitagliptina nas defesas antioxidantes, lesões vasculares e destruição dos ilhéus de Langerhans.

Neste contexto, avaliámos:

- Concentração sérica de malondialdeído (via TBARs);
- Concentração de malondialdeído em alguns órgãos (rim, fígado, coração, pâncreas e músculo);
- Concentração sérica de 3-Nitrotirosina (3-NT);
- Avaliação do estado antioxidante total em soro (TAS).

Sabendo que o processo inflamatório se encontra associado à insulino-resistência, desempenhando dessa forma um papel importante no desenvolvimento da DMT2, originando num estadio último a destruição das células β pancreáticas, tentámos avaliar alguns parâmetros do processo inflamatório, assim como aferir a influência da sitagliptina a esse nível. Para tal, foram realizadas as seguintes avaliações em soro:

- Proteína C reactiva de alta sensibilidade (PCR);
- Interleucina 6 (IL-6);
- Interleucina 1 β (IL-1 β)
- Factor de necrose tumoral alfa (TNF- α);
- Adiponectina (adipocitocina anti-inflamatória).

Como objectivo mais ambicioso, pretende-se que este estudo possa servir como ponto de partida para uma inovação na terapêutica da DMT2, não apenas enquanto medida de correcção/controlo da hiperglicemia, mas, e sobretudo, enquanto forma de regressão do curso normal da doença, o que os fármacos antidiabéticos já existentes antes do aparecimento dos moduladores das incretinas (como a sitagliptina) nunca conseguiram atingir.

Parte III

MATERIAL E MÉTODOS

1 – Animais e dietas: “Desenho” do estudo

1.1 – Animais e Dieta

Foram utilizados ratos *Zucker Diabetic Fatty* diabéticos (ZDF/Gmi *fa/fa*) e controlo (ZDF/Gmi *+/+*), anteriormente caracterizados e procedentes dos Laboratórios Charles-River (Barcelona, Espanha). À chegada ao Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, os animais tinham seis semanas de vida e um peso médio de $165,90 \pm 2,46$ no caso dos ZDF (*fa/fa*) e $137,30 \pm 1,96$ nos animais ZDF (*+/+*).

Durante duas semanas estes animais foram mantidos em período de quarentena, numa sala com temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humidade (60%) e ciclo de luz (12h diurno/nocturno) controladas e com acesso a água e comida, de forma a promover uma adaptação às condições de estabulação e tratadores.

Os animais foram alimentados com uma dieta “standard” de manutenção de animais de laboratório (AO4 Panlab, Barcelona, Espanha), com a composição expressa na seguinte tabela:

Tabela 7 - Composição centesimal da dieta AO4 Panlab.

Composição centesimal	(%)
Proteína bruta	16,1
Lipídeos	3,1
Fibras	3,9
Minerais	5,1

Através de dados anteriores e do consumo alimentar recomendado pelos laboratórios fornecedores dos animais, concluiu-se que um aporte diário de 10/100g de peso corporal seria o suficiente para garantir as necessidades alimentares diárias, sem restrição. Assim, com o objectivo de confirmar esta informação, a ração foi diariamente quantificada ao longo de todo o tratamento. Através da diferença da comida inicialmente colocada e retirada, calculou-se uma média semanal para cada grupo de animais.

1.2 – Preparação do Fármaco

A sitagliptina (JANUVIA, ®Merck, Portugal) foi o fármaco administrado aos ratos ao longo do estudo. Esta gliptina foi dissolvida em sumo de laranja (veículo) de modo a garantir uma administração diária de 10 mg/Kg de peso. A administração foi feita por recurso a canula esofágica, de forma a garantir que era ingerido o volume exacto.

1.3 – “Desenho” do estudo

Após o período de quarentena, foram escolhidos, ao acaso, quatro grupos de ratos ZDF (*fa/fa*) e quatro grupos de ratos ZDF (+/+). Um grupo de animais permanece desde o T_0 (8 semanas de idade) até ao T_f (26 semanas de idade e 18 de estudo) sem tratamento, funcionando como controlo. Os restantes três grupos iniciaram o tratamento com sitagliptina na dose de 10 mg/kg/dia em diferentes períodos, correspondendo a diferentes fases da progressão da diabetes. O protocolo encontra-se representado na figura 32.

Grupos do tempo zero (T_0) sem fármaco

Escolhidos totalmente ao acaso, 13 ratos ZDF (*fa/fa*) e 11 ratos ZDF (+/+) foram seleccionados para este grupo. Funcionando como grupos controlo, a estes animais não foi administrado o fármaco, permitindo o seu desenvolvimento natural. Após as duas semanas de quarentena, mais precisamente no tempo zero (8 semanas de idade), 3 ratos ZDF (*fa/fa*) e 3 ZDF (+/+) foram sacrificados. No tempo doze (2 de cada estirpe) e no tempo dezoito (8 ratos diabéticos e 6 controlos) foram sacrificados, com anterior colheita de sangue e posterior recolha de alguns órgãos.

Grupos do tempo zero (T₀) com sitagliptina

Com oito semanas de idade, logo assim que terminou a fase de adaptação, 8 ratos ZDF (*fa/fa*) iniciaram a fase de tratamento com a administração diária de sitagliptina (10 mg/Kg/dia) em sumo de laranja. Ao chegar às 20 semanas de vida, e doze de tratamento (T₁₂), 4 destes ratos foram sacrificados, tendo-lhes sido retirado sangue e órgãos, para a caracterização de parâmetros bioquímicos, de inflamação e de stresse oxidativo. Os 4 ratos restantes alcançaram uma diabetes avançada, atingindo as dezoito semanas de tratamento (26 de vida), sendo de seguida sacrificados com o mesmo objectivo que os anteriores.

Como modelo de comparação, também 6 ratos ZDF (+/+) iniciaram o tratamento no tempo zero, com o sacrifício de 2 ao tempo doze e dos restantes 4 ao tempo dezoito (final).

Grupos do tempo seis (T₆) com sitagliptina

Depois de seis semanas desde o início do tratamento, dois novos grupos iniciaram a administração diária de sitagliptina, um grupo de 8 ratos ZDF (*fa/fa*) e outro grupo com 6 ZDF (+/+). Estes ratos que iniciaram o tratamento com fármaco às 14 semanas de vida foram sacrificados às 20 e 26 semanas de idade, tempo doze e tempo dezoito de tratamento, respectivamente.

O sacrifício dos 4 ratos ZDF (*fa/fa*) e 2 ratos ZDF (+/+) ao tempo doze, e dos restantes 4 ratos de cada estirpe ao tempo dezoito, tiveram o objectivo de colheita de sangue e recolha de órgãos para análises posteriores.

Grupos do tempo doze (T₁₂) com sitagliptina

Apenas ao tempo doze de tratamento, os últimos dois grupos de ratos iniciaram a administração de fármaco. Já com 20 semanas de vida, 8 ratos ZDF (*fa/fa*) e 6 ZDF (+/+) começaram a experimentar a sitagliptina. No tempo final (tempo 18), a este conjunto de ratos, foi-lhes retirado o sangue e posteriormente alguns órgãos.

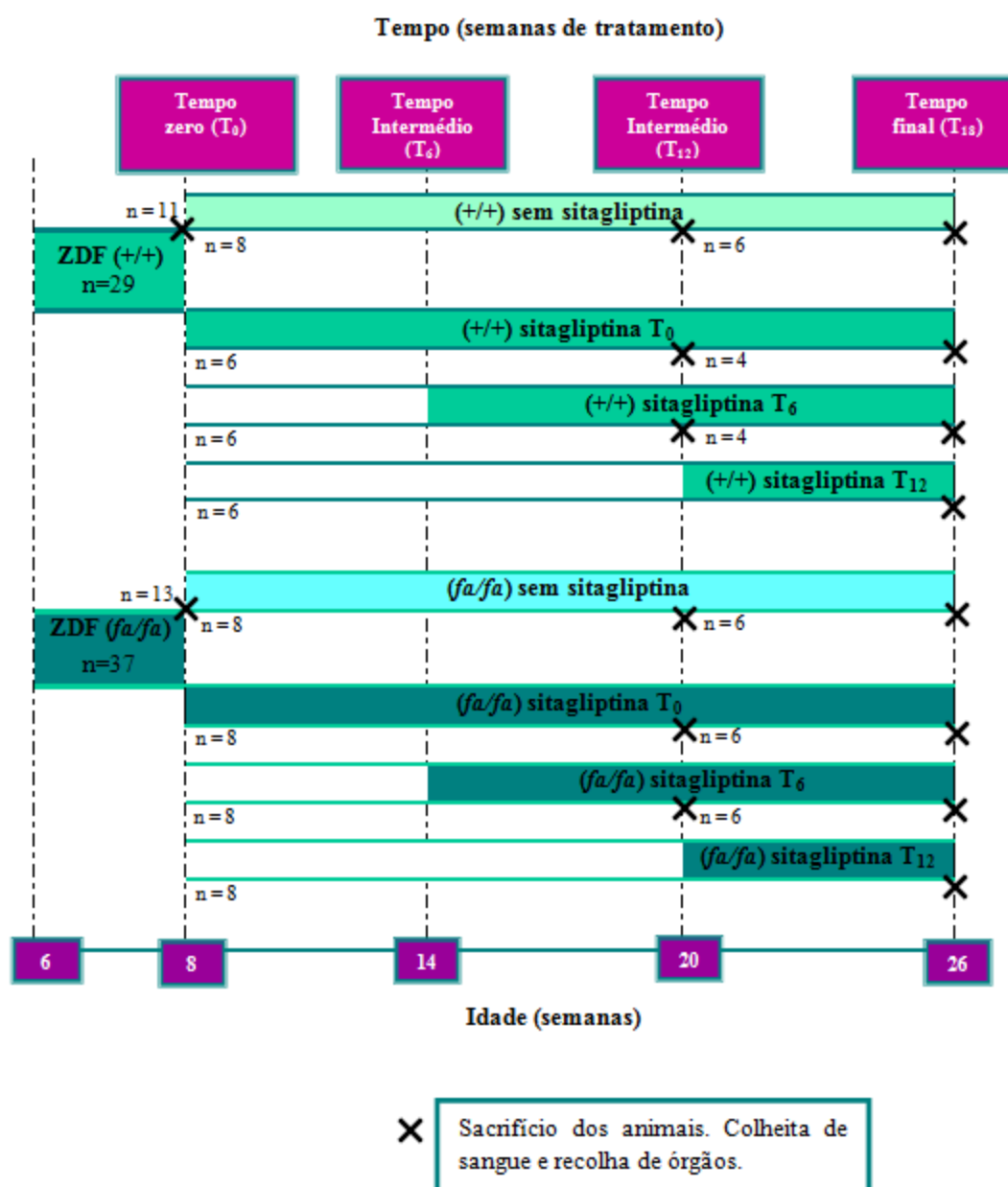


Figura 32 - Diagrama ilustrativo dos grupos de ratos em estudo: distribuição dos animais por grupos, duração do protocolo de tratamento e momentos de sacrifício dos animais em que se procedeu às diferentes determinações experimentais.

1.4 – Determinação do peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente, desde a sua chegada e durante todo o período experimental, numa balança analítica (KERN CB 6 K1, Alemanha). Aquando do sacrifício, os animais foram pesados no dia antes, de modo a que o jejum não interferi-se com o peso corporal.

1.5 – Avaliação do perímetro abdominal

Ao longo do estudo foram medidos os perímetros abdominais de cada rato e novamente foi feita uma média por grupo. A avaliação dos perímetros abdominais foi iniciada na semana 11 de idade dos ratos.

1.6 – Avaliação da variação dos níveis de glicemia

Foram avaliadas as oscilações de glicose de todos os grupos de ratos, ao longo do estudo. As medições de glicose foram iniciadas na semana 11 de idade dos ratos.

A glicemia era medida através de uma gota de sangue da veia caudal do rato e determinada com a ajuda do sistema One Touch Ultra (LifeScan, Jonhson and Jonhson, Portugal). Para os animais dos diferentes grupos, a glicemia era medida em jejum de 12 horas e posteriormente era feita uma média de cada grupo.

1.7 – Pressão arterial

1.7.1 – Medição da pressão arterial sistólica, diastólica e média e da frequência cardíaca

Todos os grupos de animais foram sujeitos à avaliação da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), assim como da frequência cardíaca ao tempo final, com 18 semanas de tratamento (T₁₈).

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas na cauda do rato, onde existe a artéria do rato com elasticidade semelhante à da aorta. Através do método oscilométrico (“*tail cuff*”) e utilizando um esfigmomanómetro (modelo LE 5001 Pressure Meter, Letica, Barcelona, Espanha) e uma gaiola de contenção, os ratos foram sujeitos a esta avaliação.

Tentou-se ao máximo uma supressão do stresse associado à manutenção do animal em condições de mobilidade diminuída, e efectuou-se um número elevado de medições consecutivas, de modo a rejeitar alguns valores fora do intervalo real.

1.5.2 – Cálculo da pressão diferencial

A pressão diferencial, que define o comportamento oscilatório da pressão arterial relativamente ao seu valor médio, foi calculada da seguinte forma: $PD = (P_{\text{sistólica}} - P_{\text{diastólica}})$.

1.8 – Sacrifício dos animais, colheita de sangue e órgãos

O tempo inicial (T_0), o tempo intermédio (T_{12}) e o tempo final (T_{18}) foram definidos como os tempos para o sacrifício dos animais. Para permitir a obtenção de sangue, os ratos foram anestesiados com 2 ml/kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/ml de cloridrato de cetamina (Ketalar®) em clorpromazina a 2,5% (Largactil®). O sangue foi recolhido da veia jugular, bastante visível, após pequena incisão, em seringas de 5ml com agulhas passadas em heparina (B Braun Melsungen AG, Alemanha).

Após colheita, o sangue foi distribuído para diferentes tubos, consoante as determinações analíticas pretendidas. Para a obtenção de soro, foi utilizado um tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer®; SST™II Advance), outro para a obtenção de plasma com Heparina-Lítio (Sarstedt, Monovette®) e, por fim, para a análise em hemogramas, o sangue foi colocado em tubos com K3-EDTA.

Em seguida, procedeu-se ao sacrifício dos animais e recolha de órgãos. Aos animais foram removidos o fígado, o pâncreas, o músculo, o coração e os rins. Estes órgãos foram colocados em caixas de Petri com uma solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4; 4°C) constituída por: CaCl_2 (2,5mM), D-glucose (11mM), KCl (4,8mM), NaCl (118mM), Na_2EDTA (0,03mM), MgSO_4 (1,2mM), KH_2PO_4 (1,2mM), NaHCO_3 (24mM) e ácido ascórbico (0,06mM).

Depois de limpos e pesados, os órgãos foram congelados a -80°C guardados em alíquotas com uma solução de Krebs-Henseleit ou formol tamponado, para posterior análise bioquímica e histopatológica, respectivamente.

2 – Avaliação dos parâmetros metabólicos

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados a partir das diferentes amostras de sangue total, plasma e soro recolhidas. O quadro seguinte mostra as determinações efectuadas, com respectivo tipo de amostra e metodologia:

Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos avaliados.

Parâmetros Avaliados	Amostra	Método
Glicemia		
Colesterol total	Soro	Analizador Automático Roche
Col-HDL		Hitachi 717
Triglicerídeos		
Insulina	Plasma	ELISA
Hemoglobina Glicosilada	Sangue total em He-Li	Imunoaglutinação Analizador DCA 2000+
Hemograma	Sangue total em EDTA	Analizador automático Roche Hitachi 717
Agregação plaquetar	Sangue total em EDTA	Analizador automático Roche Hitachi 717

2.1 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Partindo do soro, a glicemia, o colesterol total (col-total), o colesterol-HDL (col-HDL), o colesterol-LDL (col-LDL) e os triglicéridos foram doseados, utilizando um analisador automático (Roche Hitachi 717 analyser, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA).

2.1.1-Glicose

O doseamento da glicose foi efectuado com a ajuda de um *kit*, baseado num teste colorimétrico enzimático: A glicose, na presença de oxigénio atmosférico, é oxidada em gluconolactona, pela enzima glicose-oxidase (GOD). Esta reacção resulta também na formação de peróxido de hidrogénio, que na presença da peroxidase (POD), origina a 4-aminofenazona e fenol em 4-(p-benzoquinonamonoimino)-fenazona. Através da análise fotométrica, é quantificada a intensidade cromática do corante vermelho formado, que é directamente proporcional à concentração de glicose.

2.1.2 - Col-total, Col-HDL, Col-LDL e TG

Novamente a partir do soro, as determinações do Col-Total e TG foram efectuadas com Cholesterol RTU®reagent (bioMérieux ®SA) e o kit TG PAP 1000 (bioMérieux ®SA), respectivamente. Estes métodos de natureza colorimétrica, baseiam-se na aplicação de algumas enzimas, cujo intensidade de coloração do composto final da cadeia enzimática é directamente proporcional à quantidade de colesterol e TG na amostra. Seguindo a mesma linha, também o doseamento de col-HDL e col-LDL é de natureza colorimétrica.

2.1.3 - Insulina

A insulina foi doseada por ensaio ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (Merckodia, Uppsala, Suécia), baseando-se na técnica de Sandwich directa, com dois anticorpos diferentes. Durante a incubação, a insulina da amostra reage com os anticorpos anti-insulina, que se encontram associados ao poço. Depois de uma lavagem e posterior limpeza de anticorpos livres, o último anticorpo, com uma enzima conjugada liga-se à insulina. Esta enzima detecta-se por reacção com o 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina (TMB). O ponto final da reacção obtém-se por ácido sulfúrico 1M, originando um composto corado, quantificado espectrofotometricamente.

2.1.4 – Cálculo do HOMA-IR

Para determinar o grau de insulino-resistência nos ratos ZDF (*fa/fa*) e no seu controlo ZDF (+/+) calculou-se o HOMA-IR, utilizando-se os valores de insulina obtidos no momento do sacrifício e de glicose obtidos na semana do sacrifício, após 12h de jejum. O HOMA-IR, ou cálculo do índice de resistência à insulina, foi calculado pela fórmula de Mathews e col. (1985):

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = (\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glicose (mmol/L)}) / 22,5$$

2.1.5 – Hemoglobina glicosilada

A hemoglobina glicosilada (HbA1c) é formada pela glicação não enzimática do terminal N da cadeia β da hemoglobina A. Como o nível de HbA1c é proporcional ao nível de glicose plasmática durante um período de dois meses, é aceitável caracterizar esta como um indicador da concentração média diária de glicose no sangue nos últimos meses.

Por diferenças existentes no doseamento da fracção A1c da hemoglobina de rato quando comparada com a de humano, tornou-se necessário a utilização de um método de imunoaglutinação, caracterizado pela utilização de um anticorpo monoclonal específico da HbA1c de rato.

A hemoglobina glicosilada (HbA1c) foi doseada em sangue total, utilizando o analisador DCA 2000+ (Bayer, Diagnostic, Alemanha). A percentagem de HbA1c na amostra é calculada pela seguinte equação:

$$\%HbA1c = \frac{[HbA1c]}{[Hemoglobina\ total]} \times 100$$

A hemoglobina total é quantificada por oxidação da mesma, através de um ferricianeto de potássio e resultando numa metahemoglobina. Esta forma complexos com o tiocianato, dando origem a uma espécie corada medida a 531nm.

No caso da quantificação da HbA1c é utilizada uma técnica de inibição da aglutinação em látex. Uma substância aglutinadora (um polímero sintético que contém múltiplas cópias da porção imunoreactiva da HbA1c) provoca a aglutinação do látex revestido com o anticorpo monoclonal específico da HbA1c do rato. Esta reacção de aglutinação origina uma maior dispersão da luz, a qual é medida como um aumento da capacidade de absorção a 531nm. A HbA1c nas amostras de sangue total compete pelo número limitado de locais de ligação de anticorpos em látex, provocando uma inibição da aglutinação e uma menor dispersão da luz. A menor dispersão é medida como uma redução da capacidade de absorvância a 531nm. A concentração de HbA1c é, então, quantificada utilizando uma curva de calibração da capacidade de absorção *versus* concentração de HbA1c.

Desta forma, já nos é possível calcular a percentagem de HbA1c utilizando a equação acima descrita.

2.1.6 – Hemograma

O sangue foi colhido para seringas contendo K3-EDTA e os parâmetros hematológicos foram seguidamente obtidos num contador Coulter Counter® (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EUA).

As determinações foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Em todos os ratos deste estudo foram avaliados diversos indicadores hematológicos, a diferentes níveis:

- **Plaquetar:** O número de plaquetas (PLT).
- **Eritrocitário:** O hematócrito (HCT), o número de glóbulos vermelhos (GV), o coeficiente de variação eritrocitária (CVE), a concentração de hemoglobina (HGB) e o volume corpuscular médio (VCM).

2.1.7 – Medição da Agregação Plaquetar

A avaliação da agregação plaquetar em sangue total foi realizada num lumiagregómetro, pelo método da impedância eléctrica, que se baseia na detecção de alterações da resistência eléctrica entre dois eléctrodos submersos na amostra. Este método de quantificação da agregação plaquetar tem como grandes vantagens, em relação aos métodos turbidimétricos tradicionais utilizados em plasma rico em plaquetas (PRP), o facto de evitar passos intermédios de separação do PRP e de representar melhor as condições fisiológicas. Os passos intermédios podem eliminar sub-populações de plaquetas, designadamente as mais reactivas que são activadas como consequência do processo de isolamento. Por outro lado, as interações entre as plaquetas com outros constituintes do sangue são permitidas por este método, o que o torna mais representativo da função plaquetar e da actividade de inibidores *in vivo*.

A medição da agregação plaquetar foi realizada em colaboração com o Laboratório de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Foi avaliada a impedância

eléctrica num lumiagregómetro Chrono-Log Corp. (Havertown, E.U.A.). Uma amostra de 0,5 ml de sangue total colhido para tubos contendo 20 U/ml de heparina como anticoagulante foi misturada com 0,5 ml de NaCl a 0,9% e agitou-se com um magnete. A solução permaneceu em agitação durante 5 minutos a 37°C, imediatamente antes da adição dos agentes estimulantes da agregação plaquetar. Foram utilizados como indutores de agregação plaquetar o ADP e o colagénio, nas concentrações de 1 µM e de 5 µg/ml, respectivamente.

Os valores da agregação plaquetar máxima correspondem à amplitude da curva do gráfico da variação da impedância ao longo do tempo.

2.2 – Avaliação da função renal

Para avaliação da função renal foram quantificados os seguintes parâmetros séricos: creatinina e ureia. As concentrações destes parâmetros foram avaliadas em todos os grupos, controlos e diabéticos em estudo, através de métodos e aparelhos (Roche Hitachi 717 analyzer, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA) padronizados para análises clínicas. O sangue foi recolhido em seringas sem anticoagulante para recolha do soro através de centrifugação a 1200 ×g (15 minutos, a 4°C).

2.2.1 – Creatinina

Para a determinação da creatinina foi utilizado um “kit” comercial (*Crea*, Roche) que tem por base um teste cinético colorimétrico. Em solução alcalina, a creatinina presente no soro juntamente com o picrato formam um complexo amarelo-alaranjado. A intensidade cromática é directamente proporcional à concentração de creatinina e pode consequentemente ser inferida fotometricamente. O analisador (Hitachi 717) calcula automaticamente a concentração de creatinina em cada amostra.

2.2.2 - Ureia

O teste utilizado para a determinação da ureia em soro consiste numa análise (“*kit*” comercial, *Urea/Bun*, Roche) que tem por base um método cinético enzimático. A ureia é hidrolisada a dióxido de carbono e amoníaco, por acção da urease. Em consequência, o amoníaco formado reage com α -oxoglutarato e NADH, e sob acção da enzima glutamato-desidrogenase (GLDH) origina glutamato e NAD^+ . A diminuição da concentração de NADH em resultado do consumo deste agente, como consequência da sua utilização na reacção, é medida cineticamente. O ensaio é realizado num analisador automático (Hitachi 717) que determina a concentração da ureia em cada amostra.

2.3 – Avaliação da função pancreática

De forma a analisar a função pancreática, quantificámos os níveis séricos da α -amilase. Esta enzima é maioritariamente produzida no pâncreas e participa na absorção de glicose pelo intestino. O teste utilizado para a determinação quantitativa da α -amilase sérica consiste num ensaio de cor que emprega 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotrídeo (CNP_{G3}) como substrato. Este substrato reage directamente com a α -amilase e não exige a presença de enzimas auxiliares. A libertação de 2-cloro-4-nitrofenil (CNP) do substrato e o resultante aumento da absorvância a 410nm é directamente proporcional à actividade da enzima na amostra. O ensaio é realizado num analisador OLYMPUS, apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

3 – Avaliação do stresse oxidativo

3.1 – Avaliação da agressão oxidativa

3.1.1 – Doseamento de TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances)

A sensibilidade da medição de TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances) fez desta análise um método de quantificação e acompanhamento da peroxidação lipídica, característica do stresse oxidativo. É por meio desta avaliação, que nos chega informação importante a respeito da actividade de radicais livres em diferentes doenças e consequentemente, que medimos a actividade antioxidante de vários compostos.

Uma das consequências da decomposição dos peróxidos lipídicos é o malondialdeído (MDA). Este aldeído quando submetido a condições de pH ácido (3,5) e temperatura elevada (100°C), reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) originando um aducto (TBA-MDA) cromógeno (vermelho) que pode ser medido por espectrofotometria (532nm) ou por fluorimetria (λ de excitação 534 nm e λ de emissão 551nm).

Para a quantificação das concentrações de MDA nas amostras, utilizou-se 100 μ l de soro, assim como 100 μ l de tecidos (fígado, coração, pâncreas e rim) previamente recolhidos e homogenizados e uma curva de calibração.

A curva de calibração foi feita partindo de uma solução mãe de malondialdeído bis (dimetilacetal) comercial de concentração 83,5 μ mol/l, a partir da qual se preparam as soluções padrão de concentrações conhecidas (0,42; 0,83; 1,67; 2,5; 4,17; 8,3; 16,7 μ mol/l), em conjunto com um branco.

Em tubos de 10 ml colocaram-se 100 μ l de amostra, ou água destilada (para o branco) ou solução padrão (para amostras padrão). Independentemente do grupo, ainda foram adicionados 100 μ l de antioxidante Butil-hidroxitoluente (BHT) dissolvido em etanol; 100 μ l de catalizador tricloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dissolvido em água destilada; 1,5 ml de solução tampão de HCl-Glicina a pH = 3,5 e, por fim, 1,5 ml de reagente cromogénio, o ácido tiobarbitúrico (TBA). Todos os tubos foram colocados no escuro, a uma temperatura de 5°C, durante 60 minutos. Novamente durante 60 minutos, os tubos “tapados” com esferas de vidro, permaneceram em banho-maria, a 95-100 °C. Posteriormente ao banho, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo, onde se procedeu

à extracção com 2,5 ml de uma solução de n-butanol-piridina (15:1 v/v) e 0,5 ml de água destilada. Em seguida, centrifugaram-se a 1000g, durante 10 minutos, onde no fim, o sobrenadante foi recolhido e lida a absorvância a 532 nm.

3.1.2 – Medição da concentração plasmática de 3-nitrotirosina (3-NT)

A 3-nitrotirosina (3-NT) resulta da reacção do peroxinitrito com resíduos de tirosina, tornando-se um biomarcador do stresse oxidativo provocado por espécies reactivas de nitrogénio.

A concentração sérica da 3-NT foi quantificada nas amostras de soro e por intermédio de um *kit* de imunoensaio enzimático (*HyCult biotechnology b.v.*) baseado na técnica de ELISA. A quantidade de 3-NT na amostra liga-se, por um lado, ao anticorpo que reveste a placa, e por outro, a um segundo anticorpo composto por biotina (*tracer*), completando o método *sandwich*. A adição de um substrato promove o desenvolvimento de cor, lida espectrofotometricamente a 450 nm. Com o apoio de uma curva padrão de concentrações conhecidas (de 4 a 326 nM) quantificou-se a 3-NT presente no soro, que é directamente proporcional à cor.

3.2 - Defesas não enzimáticas contra o stresse oxidativo

3.2.1 – Quantificação do Estado Antioxidante Total (TAS)

O estado antioxidante total foi quantificado tanto no soro, como nos diferentes órgãos extraídos, congelados a -80°C aquando o sacrifício dos ratos, e mais tarde homogenizados.

O pâncreas, o fígado, o rim, o coração e o músculo foram homogenizados partindo apenas de 0,2g de tecido. Ao tecido foi adicionado 2ml de tampão fosfato a pH 7,4 e 10 µl de solução BHT em acetonitrilo, um antioxidante, estando assim, preparado para a homogeneização. Em seguida, centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, onde recolhemos o sobrenadante para sonicar durante 3 minutos. Depois de mais uma centrifugação a 4000 rpm, 4°C e durante 15 minutos, recolhemos novamente o sobrenadante, agora pronto para ser quantificado.

As amostras foram quantificadas utilizando um *kit* comercial *Total Antioxidant Status* (Randox Laboratories Ltd., UK) e medidas num analisador Hitachi 704.

Este ensaio é baseado num método colorimétrico, onde é formado a ferrilmioglobina, que resulta da reacção de metamioglobina, uma peroxidase, com o H_2O_2 . Por sua vez, a ferrilmioglobina, reage com o 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazoline sulfonato) (ATBS), formando um radical catiónico ($ABTs^+$), que através da sua coloração azul-esverdeada, é detectada espectrofotometricamente a 600 nm. Na presença de antioxidantes nas amostras, estas inibem a produção da coloração, numa razão proporcional à sua concentração.

4 – Avaliação do perfil inflamatório

Através do método micro ELISA em *sandwich*, utilizando kits comerciais (R&D systems, Minneapolis, USA), foram avaliados no soro alguns marcadores do perfil inflamatório, como a adiponectina, factor de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e Proteína C Reactiva (PCR).

O método micro ELISA em *sandwich* utiliza um anticorpo monoclonal específico de rato e específico para cada um dos elementos a dosear, a revestir a placa. São pipetados para os poços os padrões, os controlos ou as amostras, e a substância a ser doseada existente no soro liga-se a este primeiro anticorpo. Com o sentido de retirar todas as substâncias não ligadas é feita uma lavagem nos poços. Em seguida, um conjugado enzimático (conjugado de peroxidase) com um segundo anticorpo policlonal anti-citocina ou anti-PCR de rato é adicionado aos poços. Depois de uma segunda lavagem, é adicionada uma solução contendo um substrato de enzima presente no conjugado. A reacção enzimática produz um produto azul que passa a amarelo quando a solução de paragem (HCl) é adicionada aos poços. A intensidade da cor é medida a 450 nm num leitor de microplacas (LP400, Diagnostics Pasteur) e é proporcional à quantidade de substância a dosear. Tanto os valores de PCR como de citocinas são lidos a partir de uma curva de calibração elaborada para esse efeito.

4.1 – Adiponectina

A adiponectina secretada pelos adipócitos e fortemente relacionada com a sensibilidade da insulina em obesos foi quantificada utilizando um kit comercial cuja técnica se encontra acima descrita.

As determinações foram feitas em duplicado e foram utilizados 50 µl de amostra, soro diluído a 1:1500 de acordo com as indicações do fabricante.

4.2 – Interleucina-6 (IL-6)

As determinações desta citocina foram também efectuadas em duplicado, com 50 µl de amostra de soro diluído a 1:1 de acordo com as indicações do fabricante. À semelhança do anterior, o método utilizado na quantificação foi a técnica micro ELISA em *sandwich* acima descrito.

4.3 – Interleucina-1β (IL-1β)

As determinações foram feitas em duplicado tendo sido utilizados 50 µl de soro dos animais diluído a 1:1 de acordo com as indicações do fabricante. A leitura da absorvância foi feita a 450 nm utilizando como comprimento de onda de correcção os 550 nm.

4.4 – Factor de Necrose Tumoral (TNF-α)

A quantificação do TNF-α foi feita pela mesma técnica de ELISA em *sandwich* anteriormente referida. Também da mesma forma, as determinações foram feitas em duplicado, com amostras de soro de 50 µl diluído de 1:1.

4.5 – Proteína C Reactiva (PCR)

Este marcador de processos inflamatórios e infecciosos foi quantificado a partir de 50 µl de soro diluída a 1:4000, de acordo com as indicações do fabricante. Foi utilizado um kit comercial (Helica Biosystems, Inc. Fullerton, Calif., USA) para a determinação desta proteína, que emprega uma técnica quantitativa de micro ELISA em *sandwich*, semelhante aos anteriores.

Parte IV

RESULTADOS

Tendo em conta a diversidade de grupos em estudo (4 controlos, 3 deles com fármaco, e 4 diabéticos em idênticas condições) e de períodos de comparação (T_0 , T_{12} , T_{18}), a descrição e análise dos resultados será feita da seguinte forma:

1 – Nos parâmetros que pressupõem o estudo ao longo do tempo (p.ex: peso, perímetro abdominal, glicemia) a apresentação dos dados será separada por diversos gráficos, nos quais se pretende mostrar:

A – Comparação de ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)) sem fármaco;

B – Efeito da sitagliptina nos diferentes grupos controlo (ZDF (+/+));

C, D, E e F – Efeito da sitagliptina nos diferentes grupos diabéticos (ZDF (*fa/fa*)), nos diferentes tempos de administração T_0 , T_6 e T_{12} vs sem sitagliptina, respectivamente.

2 – Nos parâmetros apenas com avaliação pontual (no T_0 , T_{12} e T_{18}), a apresentação dos dados será feita da seguinte forma:

A – Comparação de ratos controlo (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)) nos 3 tempos em estudo (T_0 , T_i , T_f);

B – Efeito da sitagliptina no tempo intermédio (T_{12}) nos ratos controlo (ZDF (+/+)) e diabético (ZDF (*fa/fa*));

C – Efeito da sitagliptina no tempo final (T_{18}) nos ratos controlo (ZDF (+/+)) e diabético (ZDF (*fa/fa*)).

Serão comparados em termos estatísticos os ratos sem sitagliptina (controlo e diabéticos) nos três tempos de sacrifício, de forma a perceber a evolução dos parâmetros ao longo da progressão da diabetes. Serão também comparados os três grupos com sitagliptina vs o respectivo grupo sem fármaco, para os ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*).

1 – Evolução do peso corporal e do perímetro abdominal

1.1 – Peso Corporal

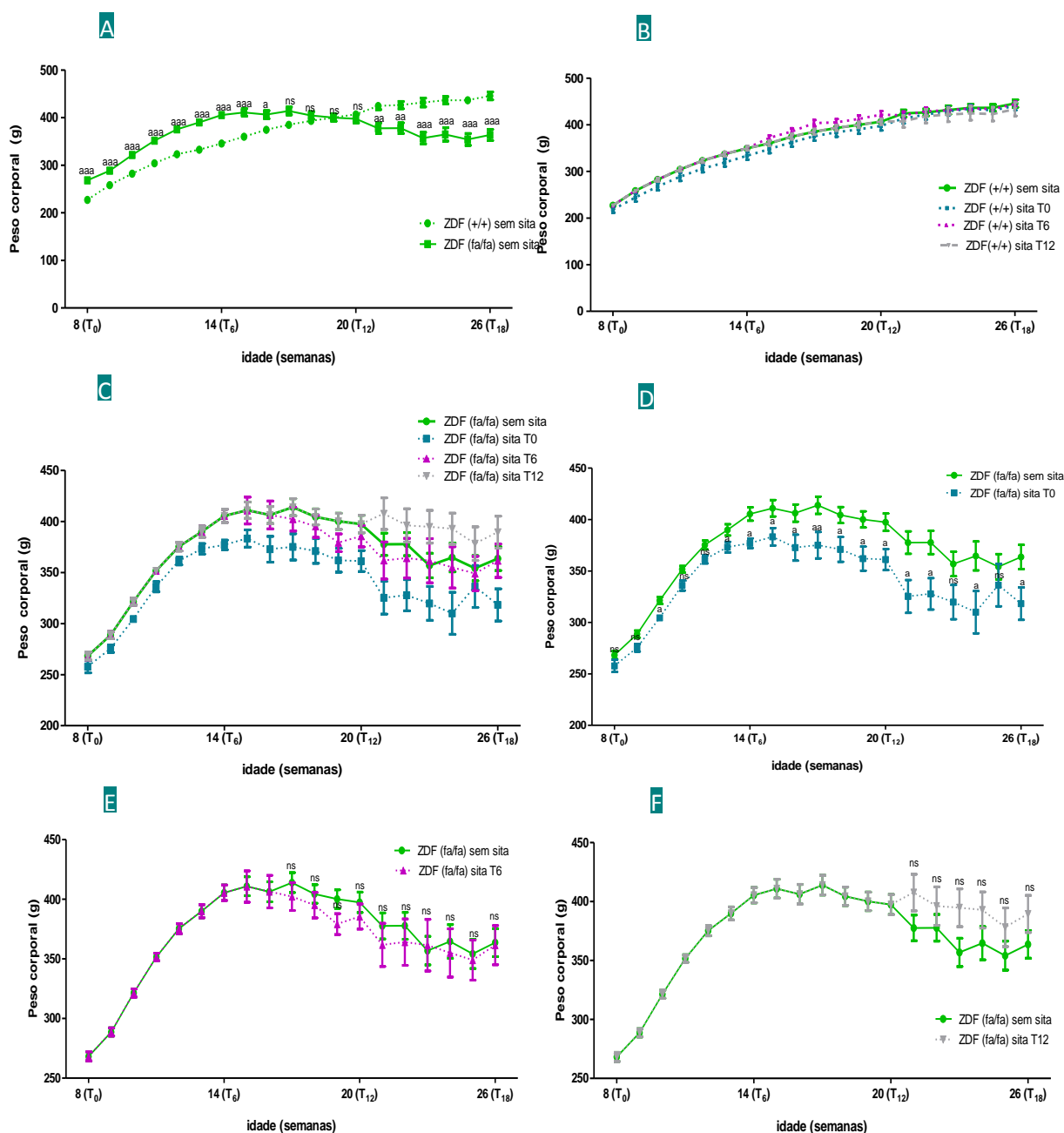


Figura 33 - Evolução do peso corporal dos grupos controlo (ZDF (+/+)) e dos grupos diabético (ZDF (fa/fa)) ao longo do estudo. Compara-se: **A** - controlo vs diabético (sem sita); **B** - todos os controlos com sita vs controlo sem sita; **C** - todos os ratos (fa/fa) com sita vs sem sita; **D** - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₀; **E** - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₆; **F** - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₁₂. Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+) ou (fa/fa) com sitagliptina vs. (fa/fa) sem sitagliptina. P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Analisando a figura 33A, representativa da evolução do peso corporal nos diabéticos ZDF (*fa/fa*) vs controlos ZDF (+/+) (ambos sem sitagliptina), verificámos que os ratos diabéticos mostram um peso superior aos seus controlos até à semana 17. De forma contrária ao controlo, o peso destes ratos (*fa/fa*) sofre um decréscimo e a partir da décima nona semana de idade torna-se inferior ao seu grupo de comparação (Fig. 33A).

Em relação ao efeito da sitagliptina nos ratos (+/+), a figura 33B mostra-nos que este fármaco parece não ter qualquer efeito no peso destes. Contudo, nos ratos ZDF (*fa/fa*) são evidentes algumas alterações (Fig. 33C). Ao compararmos o grupo ZDF (*fa/fa*) sem sita com o (*fa/fa*) sita T₀, o peso corporal deste grupo com administração de sitagliptina é bastante reduzido a partir da semana 13, o que se mantém até ao tempo final do estudo (Fig. 33D). Tendência semelhante, ainda que não significativa, foi observada no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₆ (Fig. 33E). Contrariando estes dois últimos grupos, o grupo de ratos *fa/fa* sita T₁₂ parece mostrar-nos que a sitagliptina tem uma tendência para manter o peso, quando administrado numa fase final da doença (Fig. 33F). Nestas condições, o declínio observado no grupo ZDF (*fa/fa*) sem fármaco foi prevenido entre a semana 20 e a 26 de idade, T₁₂ e T₁₈, respectivamente.

1.1 – Perímetro abdominal

Os ratos diabéticos iniciam o estudo (1ª medição efectuada na semana 11 de idade) com um perímetro abdominal bastante superior ao dos ratos do grupo controlo. Todavia, na semana 19 estes valores tendem a diminuir e a igualarem-se aos do grupo ZDF (+/+) (Fig. 34A).

Entre os diferentes grupos de ratos controlos (com e sem fármaco), os valores do perímetro abdominal tendem a ser bastante próximos, mostrando-se em concordância com o peso corporal (Fig. 34B). A mesma concordância com o peso foi observada entre os grupos de ratos diabéticos (Fig. 34C), visto que o grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₀, a partir da semana 16, mostre a tendência em diminuir, em relação ao grupo sem sita (Fig. 34D), o ZDF (*fa/fa*) sita T₆ exhibe valores de perímetro abdominal bastante próximos (Fig. 34E) e o ZDF (*fa/fa*) sita T₁₂ tende a aumentar a partir da semana 21 (Fig. 34F). Neste último caso, as diferenças encontradas nas semanas 24 e 25 atingiram significado estatístico ($P < 0,05$ vs ZDF (+/+) sem sita).

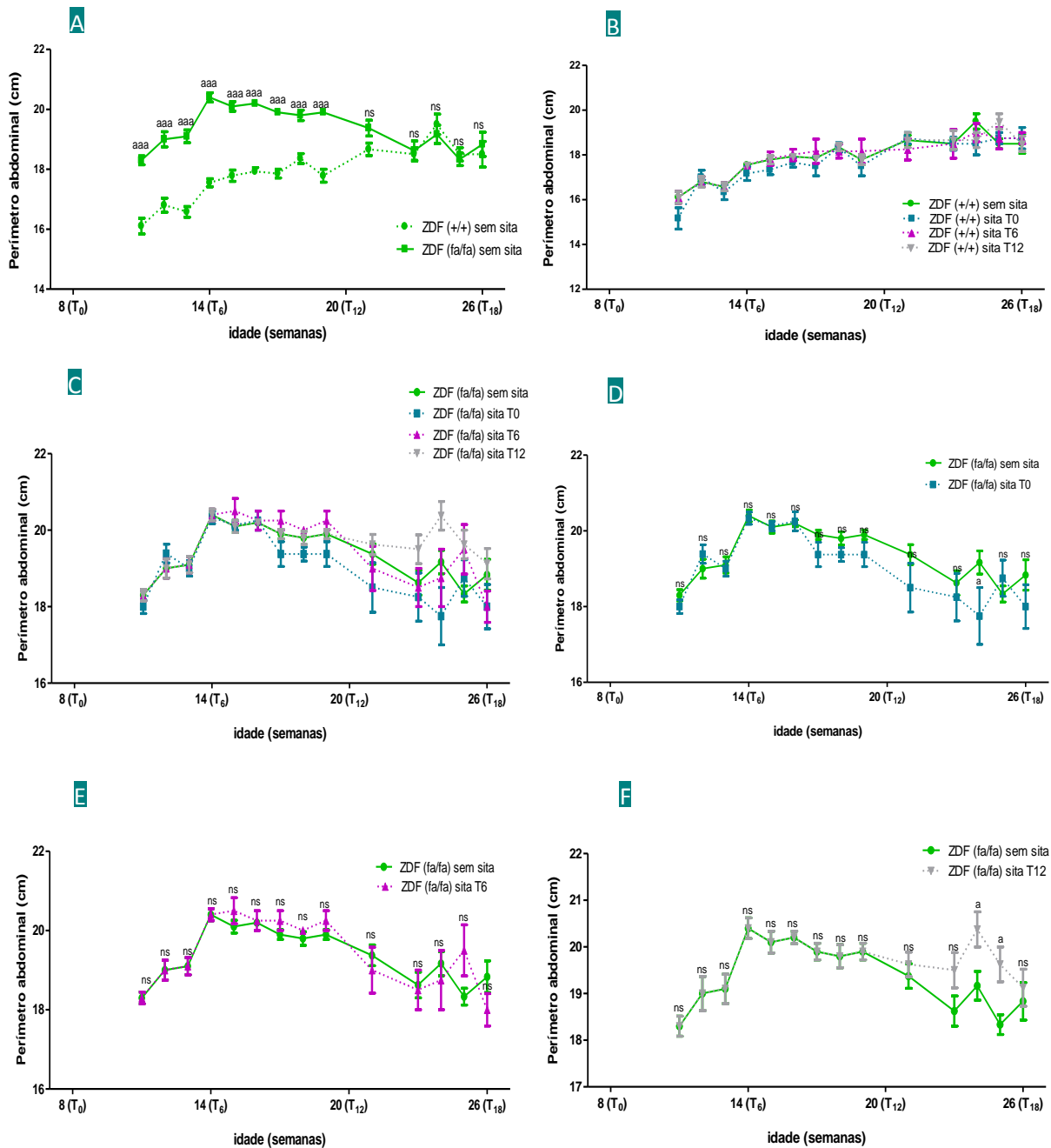


Figura 34 - Evolução do perímetro abdominal dos grupos controlo (ZDF (+/+)) e diabético (ZDF (fa/fa)) ao longo do estudo. Compara-se: **A** - controlo vs diabético (sem sita); **B** - todos os controlos com sita vs controlo sem sita; - todos os ratos (fa/fa) com sita vs sem sita; - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₀; - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₆; - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₁₂. Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+) ou (fa/fa) com sitagliptina vs. (fa/fa) sem sitagliptina. P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

2 – Monitorização da comida ingerida

Ao longo de toda a experiência, a ração de manutenção foi pesada diariamente, sendo os valores obtidos expressos em g/dia e apresentados na figura 35.

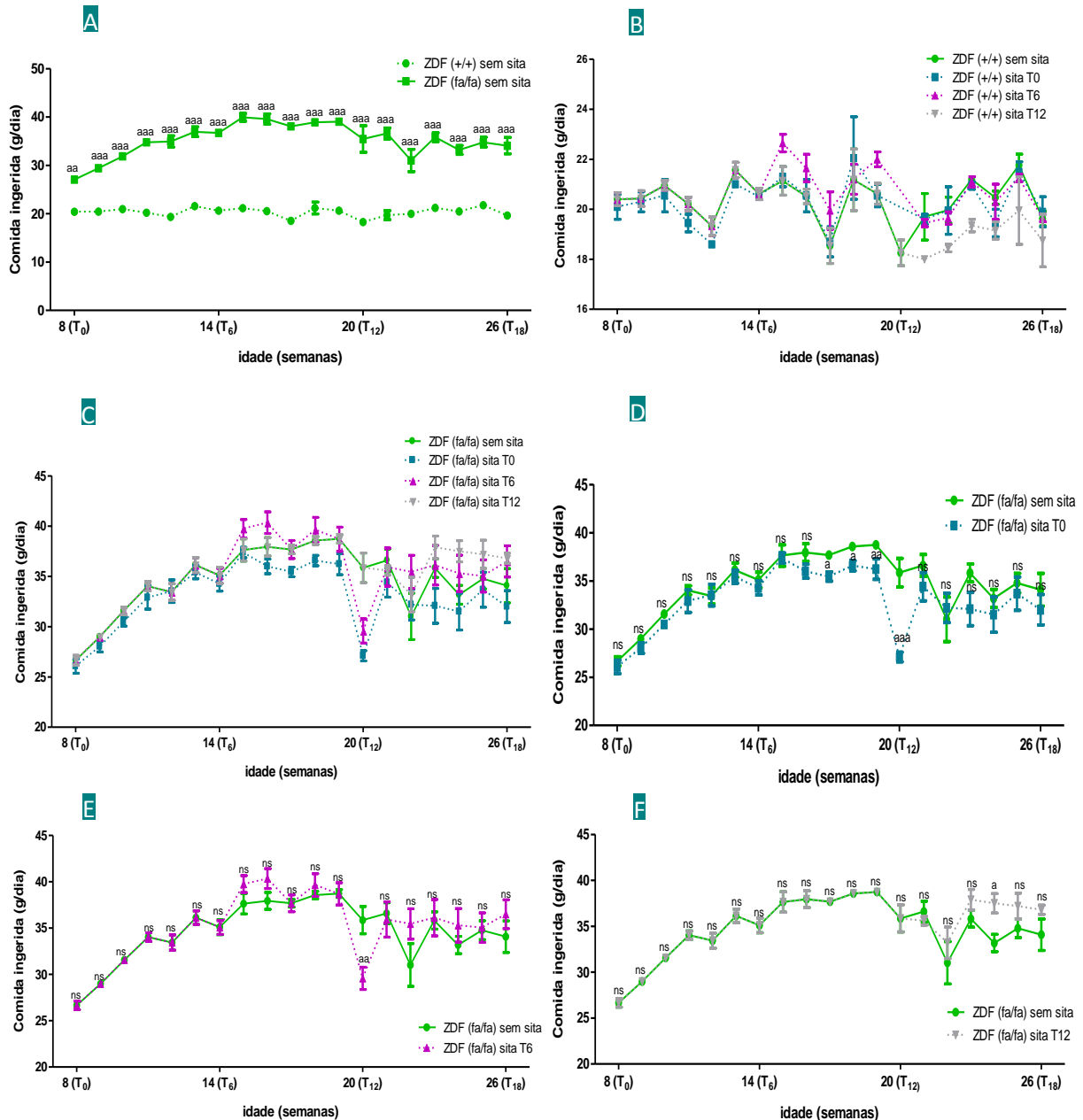


Figura 35 - Valor médio da quantidade de ração ingerida semanalmente (em g/dia) ao longo da experiência nos ratos ZDF (+/+) e (fa/fa) com e sem sitagliptina. Compara-se: **A** - controlo vs diabético (sem sita); **B** - todos os controlos com sita vs controlo sem sita; **C** - todos os ratos (fa/fa) com sita vs sem sita; **D** - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₀; **E** - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₆; **F** - grupo (fa/fa) sem sita vs (fa/fa) sita T₁₂. Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+) ou (fa/fa) com sitagliptina vs. (fa/fa) sem sitagliptina. P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

A quantidade de comida diária ingerida pelos ratos ZDF (*fa/fa*) foi significativamente superior aos grupos (+/+), mostrando ser um pouco diferente do percurso dos valores do peso corporal, numa fase final do estudo (Fig. 35A).

Nos 3 grupos controlo com sita, a quantidade de comida ingerida teve tendência a ser sempre bastante próxima daquela consumida pelo grupo sem sita, verificando-se apenas uma pequena descida da comida ingerida nos ratos (+/+) sita T₁₂, a partir das 20 semanas, ou seja, do início da administração de sitagliptina neste grupo (Fig. 35B).

Nos grupos ZDF (*fa/fa*) sita T₀, o consumo alimentar médio diminuiu significativamente a partir da 15^a semana em relação ao seu grupo de comparação. Esta diminuição durou apenas 6 semanas, pois na semana 21 o consumo volta aproximar-se do grupo sem sita (Fig. 35D). De forma semelhante, o consumo alimentar do grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₆ foi bastante próximo ao do grupo sem sita, havendo também uma diminuição, apesar de menos longa, entre a 19^a e a 21^a semana de idade (Fig. 35E). Esta diminuição do consumo, nestes dois grupos com sitagliptina é acompanhada também por uma diminuição do peso corporal, analisada anteriormente. O grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₁₂ contraria esta diminuição destes grupos de ratos diabéticos com sitagliptina, pois observa-se um aumento do consumo alimentar a partir da semana 23 (Fig. 35F), o que também está de acordo com o perfil encontrado para a evolução do peso corporal.

3 – Pressão arterial e trofismo cardíaco

3.1 – Indicadores de trofismo cardíaco

No tempo intermédio, e relativamente aos grupos controlo, observámos que os valores são bastante próximos para todos os parâmetros. Realçaremos apenas a tendência para uma diminuição da razão VE/massa corporal nos grupos ZDF (+/+) com sitagliptina e a diminuição da razão do VE/coração no grupo sita T₀, embora sem significado estatístico (Tabela 11).

No tempo final, estes ratos controlos também apresentam valores semelhantes entre grupos, na massa ventricular, na razão VE/massa corporal e VE/coração. O peso do coração é mais baixo nestes grupos com sita, com significado estatístico no grupo sita T₁₂. Da mesma forma, também a razão coração/massa corporal tende a diminuir (Tabela 9).

Tabela 9 – Parâmetros de trofismo cardíaco nos ratos controlo ZDF (+/+), no tempo intermédio (20 semanas) e tempo final (26 semanas).

Parâmetro	ZDF (+/+)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo intermédio (20 semanas)				
Coração (g)	1,39 ± 0,01	1,42 ± 0,03	1,48 ± 0,06	n. a.
VE (g)	0,68 ± 0,07	0,55 ± 0,009	0,71 ± 0,04	n. a.
Coração / Massa Corporal (x10 ⁻³)	3,56 ± 0,07	3,73 ± 0,32	3,39 ± 0,04	n. a.
VE / Massa Corporal (x10 ⁻³)	1,74 ± 0,21	1,45 ± 0,11	1,64 ± 0,14	n. a.
VE / Coração	0,49 ± 0,05	0,39 ± 0,003	0,48 ± 0,05	n. a.
Tempo final (26 semanas)				
Coração (g)	1,61 ± 0,04	1,47 ± 0,03	1,55 ± 0,03	1,40 ± 0,05*
VE (g)	0,68 ± 0,04	0,65 ± 0,07	0,68 ± 0,02	0,65 ± 0,03
Coração / Massa Corporal (x10 ⁻³)	3,59 ± 0,10	3,28 ± 0,04	3,48 ± 0,11	3,29 ± 0,05
VE / Massa Corporal (x10 ⁻³)	1,51 ± 0,09	1,45 ± 0,15	1,53 ± 0,03	1,52 ± 0,05
VE / Coração	0,42 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,02

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos ZDF (+/+) com sitagliptina vs grupo sem sita (+/+). n.a. – não aplicável.

A sitagliptina, ao tempo intermédio, parece ter diminuído todos os parâmetros cardíacos dos ratos diabéticos, para ambos os grupos com sita (T₀ e T₆) vs sem sita, ainda que as diferenças encontradas não tenham atingido significado estatístico para todos os parâmetros e grupos. Contudo, no tempo final, apenas alguns parâmetros e grupos aparecem diminuídos, como é o caso da massa cardíaca dos grupos sita T₀ e T₆ e o VE no grupo sita T₀. Nos outros grupos com sitagliptina, o inverso acontece e a massa ventricular mostrar uma tendência para aumentar em relação aos diabéticos sem sita (Tabela 10).

Ainda no tempo final, quando se comparam os grupos com e sem sitagliptina, relativamente aos valores da razão coração/massa corporal, verifica-se que nos grupos sita T₆ e T₁₂ tende a diminuir, enquanto no grupo sita T₀ os valores são aumentados. Os ratos diabéticos sem sita parecem ter a relação VE/massa corporal mais baixa que os grupos com sitagliptina (em especial dos grupos T₆ e T₁₂), embora sem significado estatístico, o que também acontece para a maioria das diferenças registadas (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros de trofismo cardíaco nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*), no tempo intermédio (20 semanas) e tempo final (26 semanas).

Parâmetro	ZDF (<i>fa/fa</i>)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo intermédio (20 semanas)				
Coração (g)	1,57 ± 0,22	1,31 ± 0,07	1,30 ± 0,02	n.a.
VE (g)	0,81 ± 0,20	0,60 ± 0,03	0,65 ± 0,04	n.a.
Coração / Massa Corporal (x10 ⁻³)	4,27 ± 0,62	3,48 ± 0,06*	3,34 ± 0,09**	n.a.
VE / Massa Corporal (x10 ⁻³)	2,21 ± 0,55	1,59 ± 0,06*	1,65 ± 0,10	n.a.
VE / Coração	0,51 ± 0,05	0,46 ± 0,01	0,50 ± 0,04	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
Coração (g)	1,30 ± 0,02	1,23 ± 0,08	1,23 ± 0,05	1,30 ± 0,06
VE (g)	0,52 ± 0,009	0,47 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,59 ± 0,03
Coração / Massa Corporal (x10 ⁻³)	3,62 ± 0,14	3,96 ± 0,30	3,54 ± 0,07	3,48 ± 0,16
VE / Massa Corporal (x10 ⁻³)	1,44 ± 0,07	1,51 ± 0,04	1,60 ± 0,11	1,58 ± 0,08
VE / Coração	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,46 ± 0,03

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos ZDF (*fa/fa*) com sitagliptina vs grupo sem sita (*fa/fa*). n.a. – não aplicável.

3.2 – Pressão arterial e frequência cardíaca

Numa fase final do estudo, mais precisamente na 25^a semana, foram determinadas as pressões arteriais em todos os grupos de animais, de forma a avaliar qual a influência da sitagliptina a este nível, nos ratos controlo ZDF (+/+) e diabético ZDF (*fa/fa*) (Fig. 36).

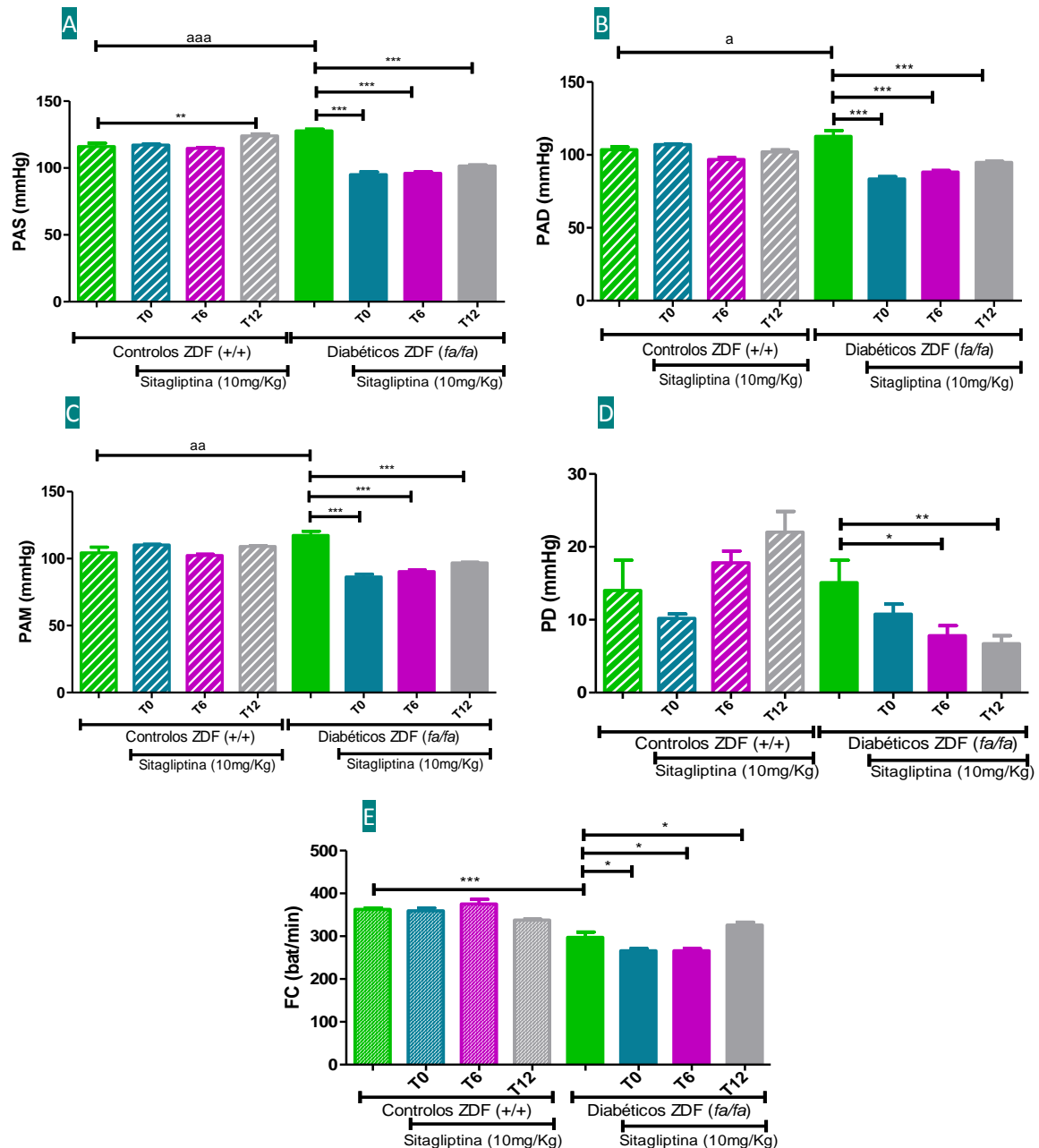


Figura 36 – Valores de pressão arterial e frequência cardíaca nos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*), no tempo final. Apresenta-se: **A** – pressão arterial sistólica; **B** – pressão arterial diastólica; **C** – pressão arterial média; **D** – pressão diferencial; **E** – frequência cardíaca. ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Ao compararmos a pressão arterial sistólica, diastólica e média dos ratos ZDF (+/+) vs (*fa/fa*), ambos sem sita, são-nos elucidadas as diferenças entre estes dois tipos de ratos. Como esperado, os valores das pressões dos ratos diabéticos são superiores aos controlos (Fig. 36A, B, C).

A pressão arterial sistólica nos 3 grupos controlo com sitagliptina foi bastante próxima da do grupo sem sita, havendo apenas um aumento, ligeiramente significativo, no grupo sita T₁₂ (Fig. 36A). Nas pressões arteriais diastólica e média, estes grupos controlo voltam a não mostrar alterações (Fig. 36B e C). No entanto, nos ratos diabéticos, o fármaco promove uma diminuição da PA (sistólica, diastólica e média) nos 3 grupos vs grupo sem sita (Fig. 36A, B e C).

Relativamente à pressão arterial diferencial, verificou-se um aumento tendencial no grupo ZDF (+/+) sita T₁₂ vs (+/+) sem sita e, uma vez mais, uma diminuição nos 3 grupos ZDF (*fa/fa*) com sita vs seu grupo sem sita, ainda que no grupo sita T₀ a diferença tenha sido apenas tendencial (Fig. 36D).

A frequência cardíaca dos ratos diabéticos (ZDF (*fa/fa*)) é bastante mais baixa, quando comparados com os grupos de controlo (ZDF (+/+)). Na verdade, os grupos diabéticos administrados com sitagliptina desde as primeiras semanas do estudo ((*fa/fa*) sita T₀ e T₆), mostram um batimento cardíaco ligeiramente mais baixo. O mesmo não acontece com o grupo (*fa/fa*) sita T₁₂, cujos níveis são ligeiramente mais altos que os do grupo (*fa/fa*) sem sita (Fig. 36E).

4 – Perfil glucídico

4.1 – Glicemia

Quando comparados os dois grupos ZDF (+/+) e (*fa/fa*) sem sita em estudo, verificámos que os controlos têm uma glicemia constante (cerca de 90 mg/dl) ao longo do estudo, enquanto que os diabéticos mostram uma hiperglicemia gradual, já significativamente superior no início do estudo (Fig. 37A).

Na avaliação relativa aos ratos ZDF (+/+) observámos valores de glicose muito próximos entre os grupos sita T₀, T₆ e o grupo sem sita. Contudo, no grupo (+/+) sita T₁₂ verificou-se, a partir da semana 22, uma ligeira diminuição dos níveis de glicose vs grupo sem sita (Fig. 37B).

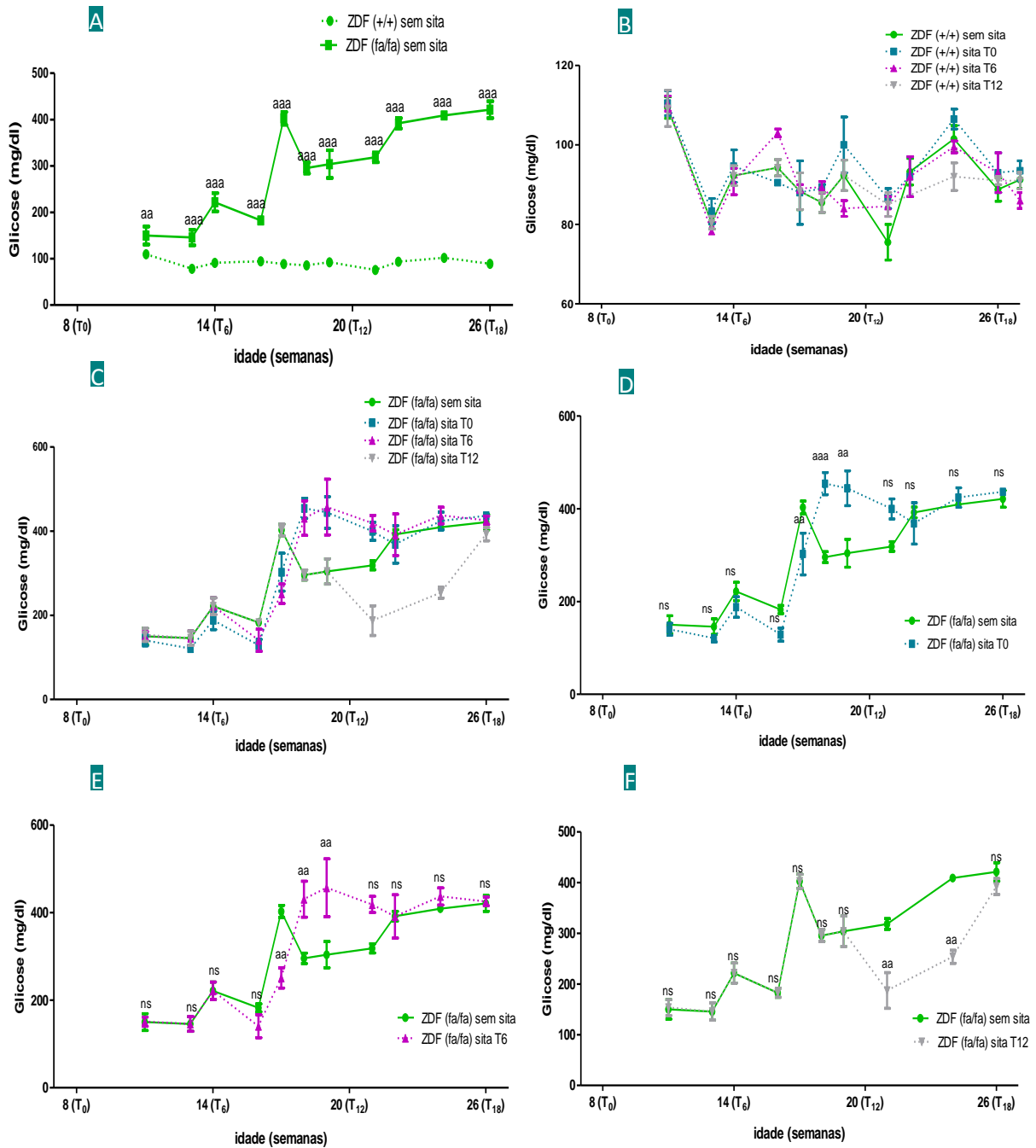


Figura 37 – Evolução da glicemia sérica (em jejum), ao longo do tempo, nos grupos controlo (ZDF (+/+)) e nos grupos diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). Compara-se: **A** - controlo vs diabético (sem sita); **B** – todos os controlos com sita vs controlo sem sita; **C** – todos os ratos (*fa/fa*) com sita vs sem sita; **D** – grupo (*fa/fa*) sem sita vs (*fa/fa*) sita T₀; **E** – grupo (*fa/fa*) sem sita vs (*fa/fa*) sita T₆; **F** – grupo (*fa/fa*) sem sita vs (*fa/fa*) sita T₁₂. Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+) ou (*fa/fa*) com sitagliptina vs. (*fa/fa*) sem sitagliptina. P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Nos ratos diabéticos sita T₀ e T₆, os níveis de glicose sérica são bastante próximos ao seu grupo de comparação, sem sita. Todavia, em ambos os grupos observa-se um pequeno distanciamento entre a semana 18 e a 20, com valores superiores aos do grupo sem sita (Figura 37C, D, E). O grupo sita T₁₂ parece ter sido o único grupo diabético em que a sitagliptina fez um bom controlo glicémico, pois verificou-se um decréscimo da glicemia a partir da semana 20, ou seja, a partir do início da sua administração de sitagliptina. Porém, na última semana do estudo, estes níveis de glicose voltam a aumentar e a aproximar-se do grupo sem sita (Fig. 37F).

4.2 – Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

Os níveis de HbA1c acompanham um pouco a glicemia dos ratos em estudo. Assim, não se observam alterações nos ratos controlo, tendo todos os grupos registado valores de HbA1c semelhantes aos do grupo sem sita (a rondar os 4%) e, como seria de esperar destes ratos saudáveis, apresentam valores muito mais baixos que os ratos diabéticos (Fig. 38).

Nos ratos ZDF (*fa/fa*) apenas o grupo sita T₁₂ promove uma diminuição significativa da HbA1c, *vs* grupo sem sita, apesar de ainda não suficiente para um bom controlo glicémico total (Fig. 38).

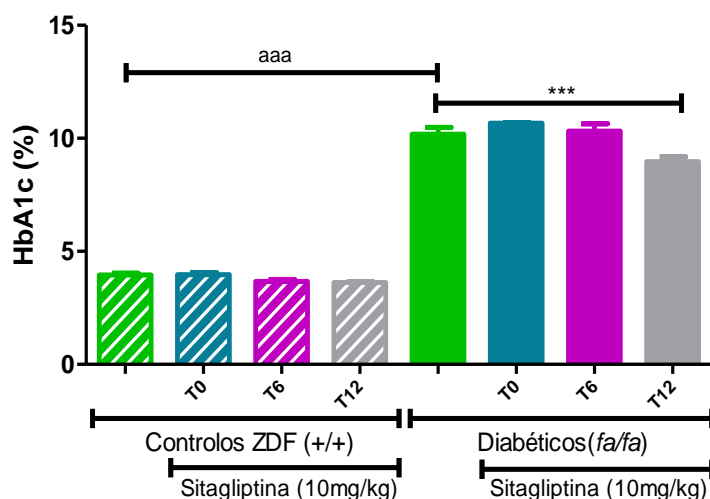


Figura 38 – Valores séricos de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) nos ratos controlo (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)), no tempo final (26 semanas). As diferenças significativas são representadas por ^a (*fa/fa*) *vs.* (+/+); * com sitagliptina *vs.* sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

4.3 – Insulina

A concentração sérica da insulina nos ratos ZDF (*fa/fa*) com 8 semanas de idade difere já significativamente da apresentada pelos ratos controlo (+/+) com a mesma idade, sendo que nestes ratos não diabéticos observam-se valores de insulinemia inferiores *vs* diabéticos sem sita. A hiperinsulinemia verificada nos ratos diabéticos viria a diminuir e, às 20 semanas de idade, observa-se uma insulinopenia que se mantém até ao final do estudo (Fig. 39A). No grupo controlo observou-se uma ligeira diminuição dos níveis de insulina às 20 semanas, não se registando depois, alterações ao longo do estudo (Fig. 39A). Ao contrário de estudos anteriores, não foram doseados os valores de insulina às 14 semanas.

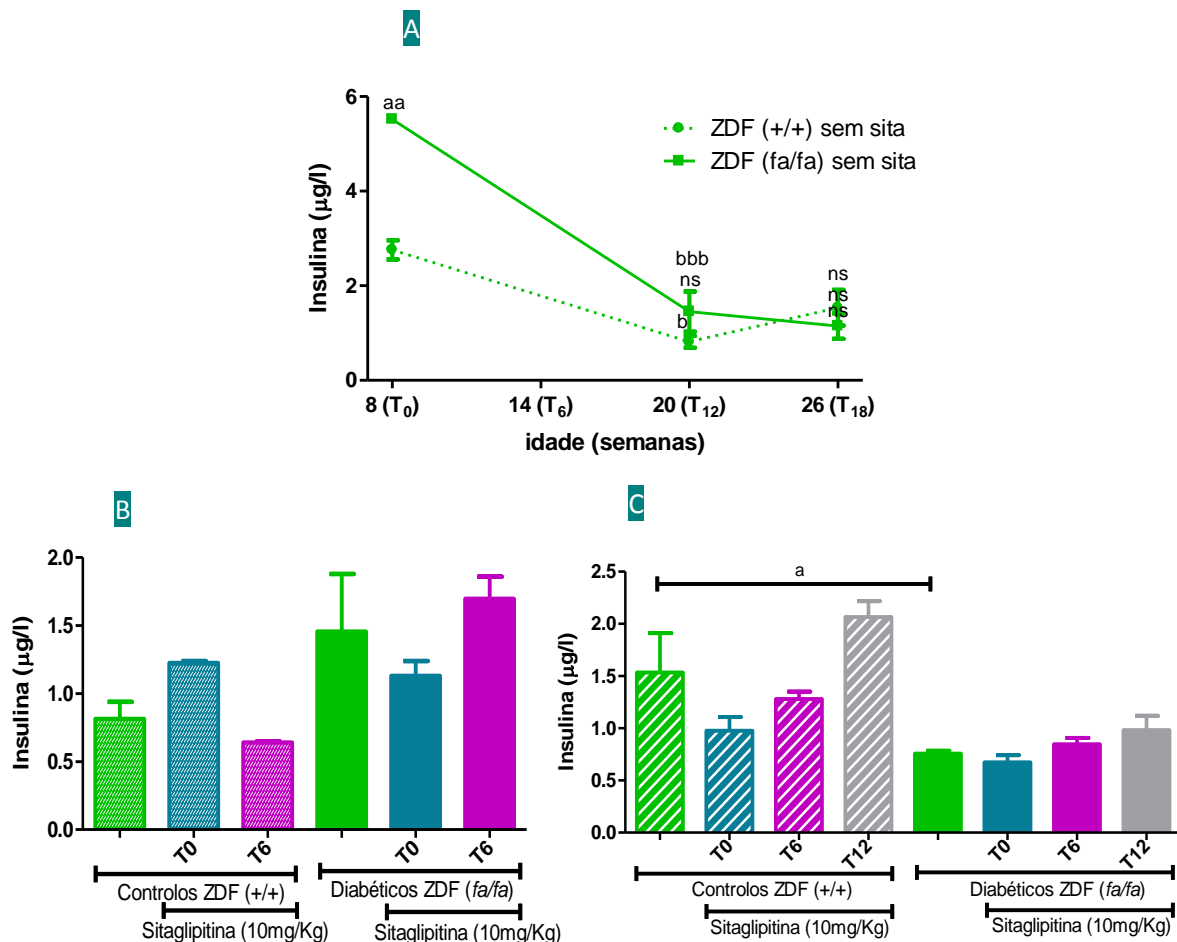


Figura 39 – Valores séricos de insulina nos ratos controlo (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) *vs.* (+/+); ^b T₁₂ *vs.* T₀ e T₁₈ *vs.* T₁₂; * com sitagliptina *vs.* sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Enquanto no tempo intermédio os níveis de insulina dos ratos diabéticos foram ainda superiores aos dos ratos controlo, no tempo final observou-se o perfil inverso, e os ratos ZDF (*fa/fa*) mostram valores ligeiramente inferiores em relação aos ratos (+/+) (Fig. 39A, B e C).

Quanto ao efeito da sitagliptina no tempo intermédio, apesar dos nossos resultados não apresentarem significado estatístico, no grupo diabético sita T₀ observa-se uma diminuição da insulina. Contudo, no mesmo grupo de sita mas controlo ZDF (+/+) sita T₀, vs controlo sem sita, os níveis de insulina aumentaram (Fig. 39B).

No tempo final, e nos grupos controlo, assim como verificado nos diabéticos, o grupo sita T₁₂ vs sem sita, foi o grupo de ratos com os valores de insulina sérica mais elevados, mesmo que sem significado estatístico (Fig. 39C).

4.4 – Resistência à insulina – HOMA-IR

A sensibilidade (resistência) destes animais à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR. Para o seu cálculo foram utilizados os níveis de glicose e insulina dos ratos ZDF (*fa/fa*) e seu grupo controlo (+/+) no tempo final (semana 26), após 12h em jejum (no caso da glicemia). Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 40.

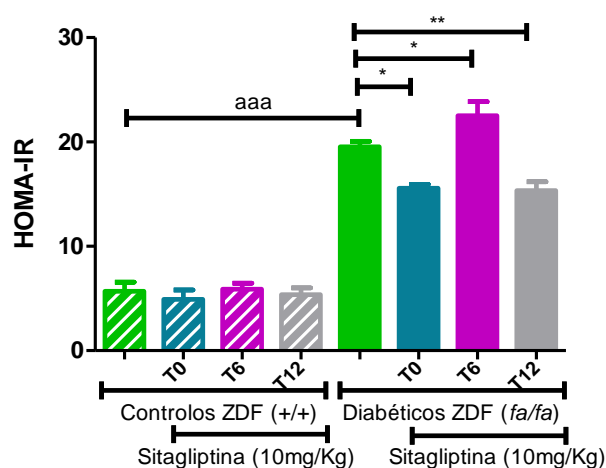


Figura 40 – Avaliação da Resistência à insulina através do índice de insulino-resistência (HOMA: $mmol/l \cdot \mu U/ml$) de ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*) no tempo final (26 semanas de idade). As diferenças significativas são representadas por ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Constatou-se que os valores de HOMA-IR dos ratos ZDF (*fa/fa*) eram bastante superiores aos seus controlos (+/+). Os resultados mostram que a sitagliptina não teve qualquer efeito nos ratos controlo, ao contrário do que acontece com os diabéticos. Nos grupos ZDF (*fa/fa*) T₀ e T₁₂, vs (*fa/fa*) sem sita, verificou-se uma diminuição acentuada da resistência à insulina, ainda que no grupo diabético sita T₆ se observe um ligeiro aumento do HOMA-IR (Fig. 40).

5 – Perfil lipídico

5.1 – Colesterol total

Os níveis de colesterol total foram medidos nos três tempos em estudo. Os resultados, expostos na figura 41A, mostram um valor de colesterol constante ao longo do tempo nos ratos ZDF (+/+) sem sita e um aumento progressivo nos ratos ZDF (*fa/fa*) sem sita, desde o T₀ até ao tempo final (T₁₈). Como seria de esperar em ratos diabéticos, os níveis séricos de colesterol total são muito mais elevados que nos ratos controlos (Fig. 41A).

A administração de sitagliptina nos ratos ZDF (+/+) não teve qualquer efeito ao nível do colesterol total, tanto no tempo intermédio como final (Fig. 41B e C). Contudo, nos ratos diabéticos com sita, no tempo intermédio, encontramos valores mais elevados de colesterol total, tanto no grupo que iniciou a administração no T₀ como no grupo que iniciou no T₆ (Fig. 41B). Todavia, no tempo final, verificou-se uma redução significativa do colesterol total no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₀ vs sem sita, sem alterações nos restantes 2 grupos (Fig. 41C).

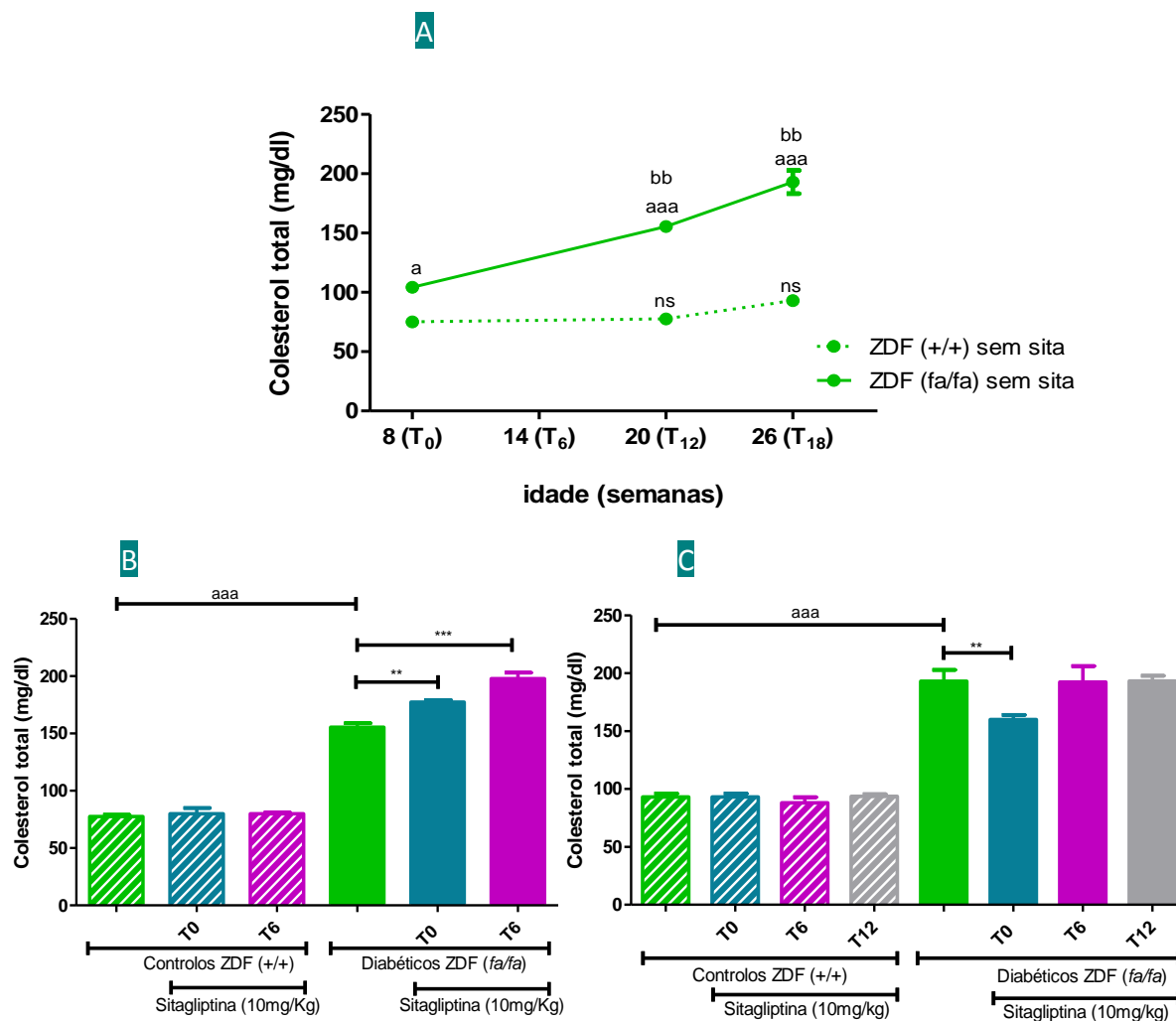


Figura 41 – Níveis séricos de Colesterol Total nos ratos ZDF (+/+) e (fa/fa). **A** – evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

5.2 – Triglicerídeos

Ao longo do estudo, os níveis de triglicerídeos (TG) nos ratos ZDF (+/+) permaneceram constantes. Estes ratos apresentam uma concentração de TG muito mais baixa que nos ratos diabéticos, que mostram uma ligeira diminuição no tempo intermédio, apesar de sem significado estatístico (Fig. 42A).

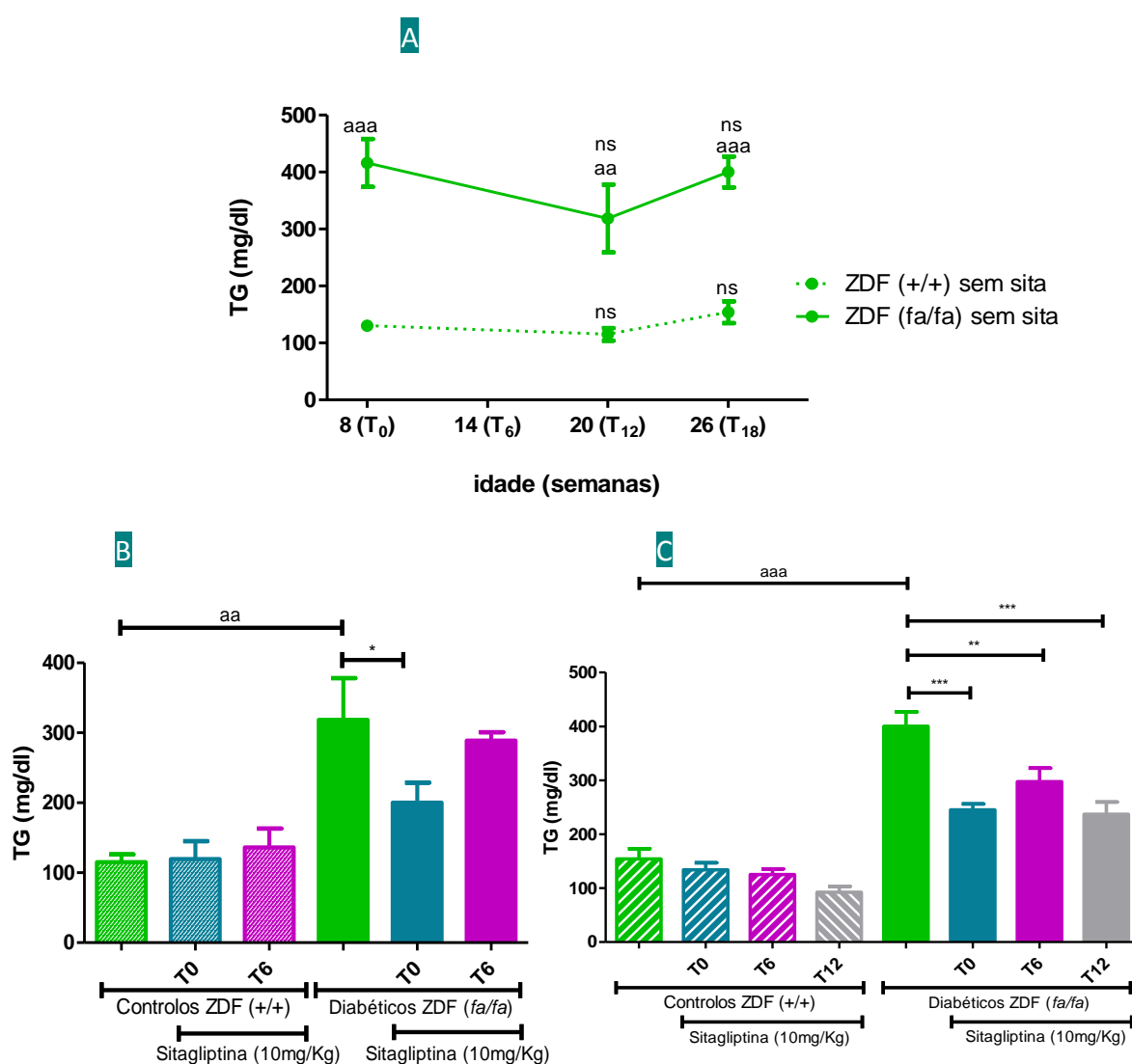


Figura 42 – Níveis séricos de Triglicerídeos nos ratos ZDF (+/+) e (fa/fa). **A** – evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Assim como verificado para o colesterol total, também os valores de TG permaneceram semelhantes entre grupos ZDF (+/+), nos dois tempos em estudo (Fig. 42B e C). Contudo, nos grupos ZDF (*fa/fa*) com sita, ocorreu uma redução, *vs* grupo sem sita (Fig. 42B e C), sendo muito mais significativa no tempo final, e para os três grupos com sita (Fig. 42C).

Assim, é possível afirmar que a sitagliptina parece contribuir para um bom perfil lipídico, pelo menos no que aos valores de TGs diz respeito.

5.3 – Colesterol - LDL

Analisando a figura 40, verifica-se que os níveis de colesterol-LDL no grupo (*fa/fa*), quando comparados com o grupo ZDF (+/+) são mais elevados e, contrariamente aos controlos, aumentam ao longo do estudo (Fig. 43A).

No tempo intermédio, os grupos controlo com sita não diferenciam do grupo sem sita. Mas o mesmo não aconteceu nos ratos ZDF (*fa/fa*) sita T₆, cujos valores de colesterol-LDL foram superiores *vs* ZDF (*fa/fa*) sem sita (Fig. 43B). No tempo final, verificou-se um perfil inverso, e os ratos (*fa/fa*) sita T₀ e T₆ a apresentarem um valor de colesterol-LDL diminuído em relação ao do grupo sem sita (Fig. 43C). Estes resultados no tempo final mostram um bom controlo lipídico por parte da sitagliptina, não só ao nível do colesterol-LDL, como também do colesterol total e dos triglicérideos, anteriormente analisados, particularmente no grupo T₀.

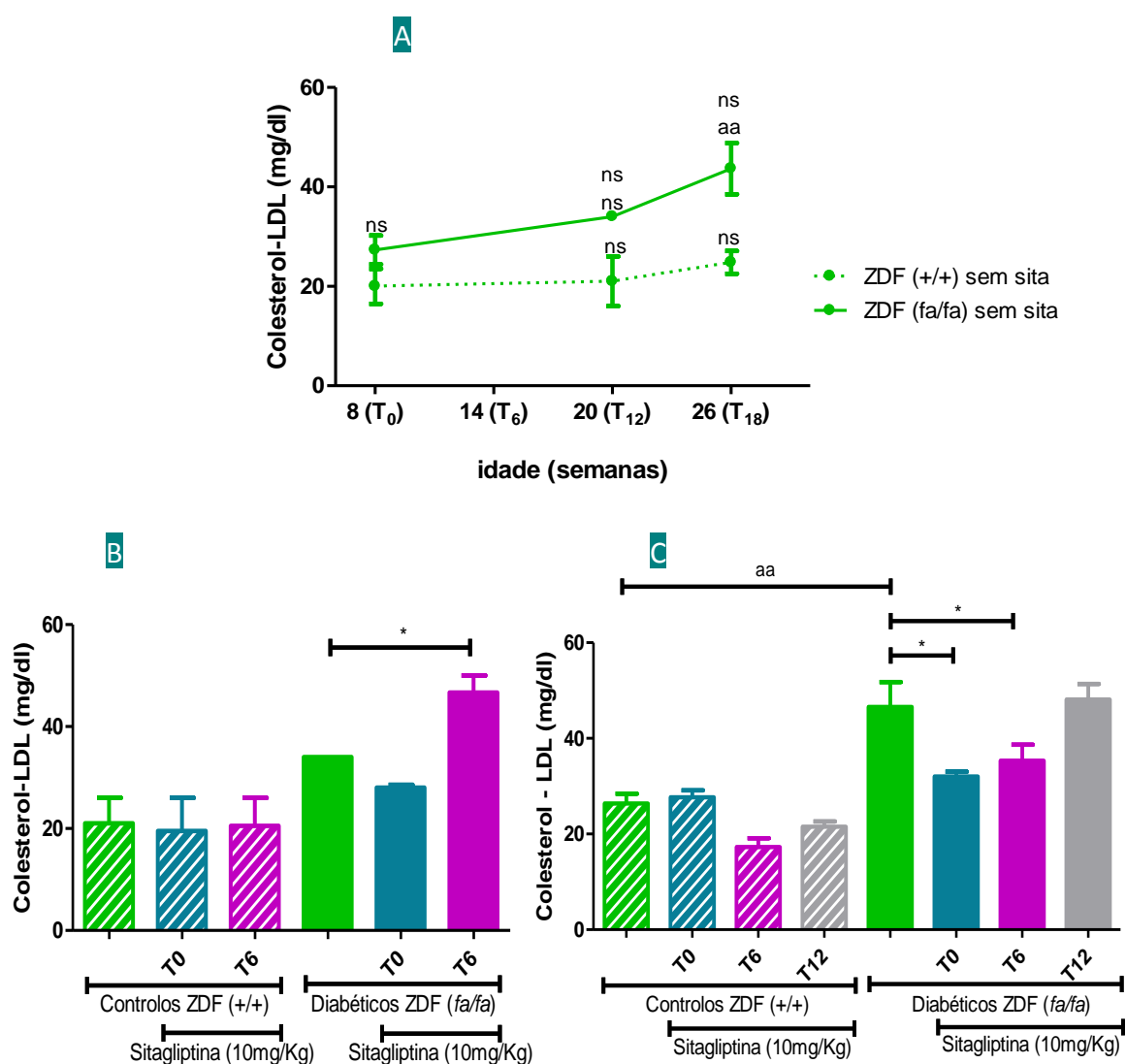


Figura 43 – Níveis séricos de Colesterol-LDL nos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*). **A** – evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

5.4 – Colesterol-HDL

Os resultados do colesterol-HDL, no grupo ZDF (*fa/fa*) sem sita mostram-nos um aumento nas primeiras 12 semanas de tratamento, mantendo-se depois praticamente constante até ao final do estudo. Estes ratos diabéticos apresentam valores superiores aos dos ratos controlo. Os grupos ZDF (+/+) além de terem valores muito mais baixos são também constantes ao longo do tempo (Fig. 44A).

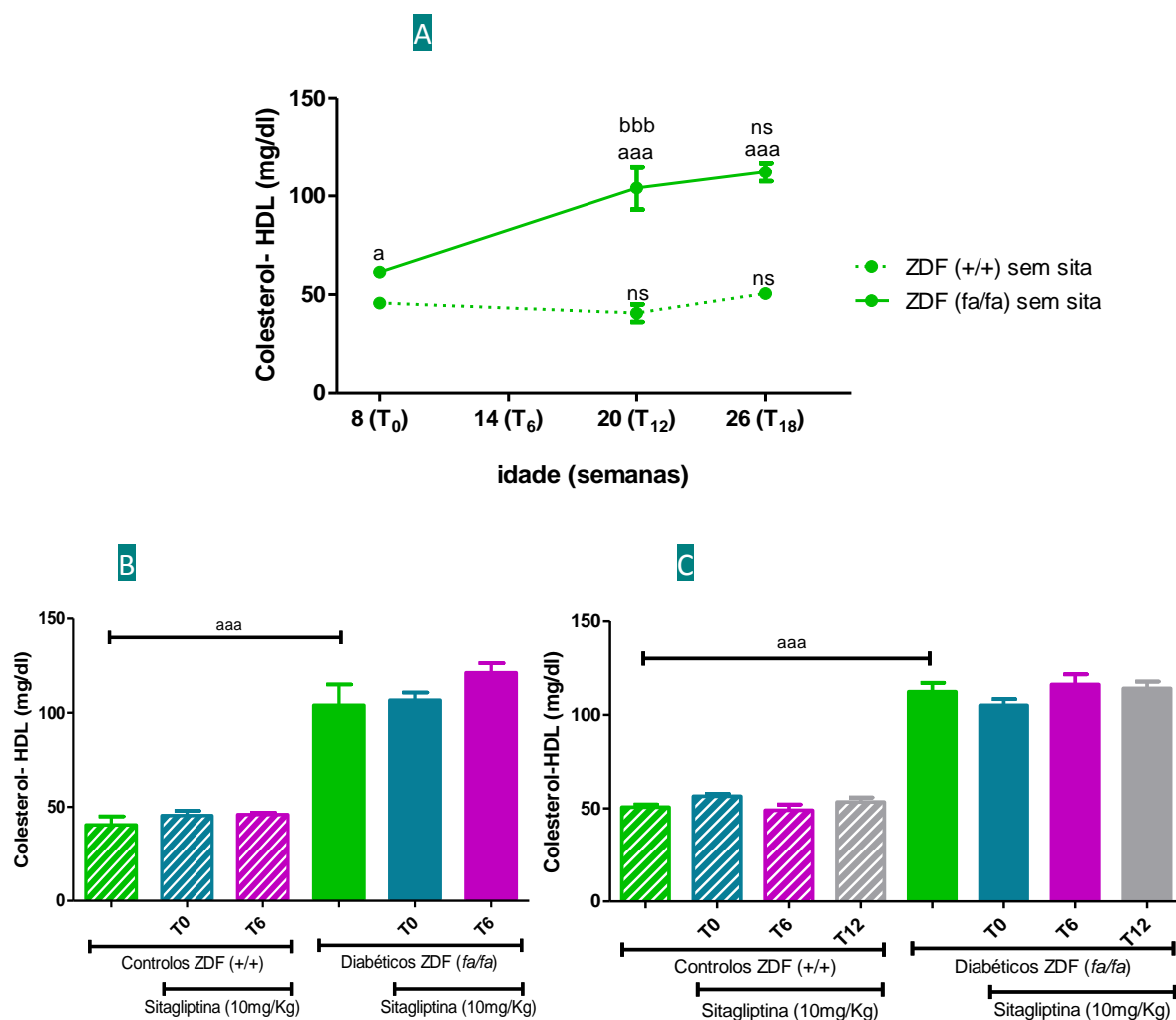


Figura 44 – Níveis séricos de Colesterol-HDL nos ratos ZDF (+/+) e (fa/fa). **A** – Evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – Níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – Níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Quanto ao efeito da sitagliptina nos níveis de colesterol-HDL, não se verificou qualquer efeito em nenhum dos grupos (ZDF (+/+) e (fa/fa)) e tempos (intermédio e final) em avaliação (Fig. 44B e C).

5.5 – Índices aterogénicos

A partir dos valores encontrados dos 4 parâmetros de perfil lipídico (colesterol total, TGs, Col-LDL e Col-HDL), para os grupos em estudo e nos diferentes tempos de apreciação, foram calculadas razões que constituem indicadores de risco aterogénico, designadamente: col-total/col-HDL, col-LDL/col-total e col-LDL/col-HDL. Os resultados encontrados estão expressos nas tabelas 11 (para os grupos controlo – ZDF (+/+)) e 12 (para os grupos diabéticos – ZDF (*fa/fa*)) no início do tratamento (semana 0) e após 12 e 18 semanas de estudo.

Tabela 11 – Índices aterogénicos dos ratos ZDF (+/+) com e sem sitagliptina às 8, 20 e 26 semanas de idade (no início do tratamento e após 12 e 18 semanas de tratamento).

Parâmetro	ZDF (+/+)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo inicial (8 semanas)				
Col-total/Col-HDL	1,65 ± 0,07	n.a.	n.a.	n.a.
Col-LDL/Col-total	0,27 ± 0,04	n.a.	n.a.	n.a.
Col-LDL/Col-HDL	0,43 ± 0,06	n.a.	n.a.	n.a.
Tempo intermédio (20 semanas)				
Col-total/Col-HDL	1,93 ± 0,18	1,76 ± 0,01	1,74 ± 0,06	n.a.
Col-LDL/Col-total	0,27 ± 0,06	0,24 ± 0,07	0,26 ± 0,07	n.a.
Col-LDL/Col-HDL	0,51 ± 0,07	0,42 ± 0,12	0,44 ± 0,01	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
Col-total/Col-HDL	1,82 ± 0,07	1,62 ± 0,02*	1,80 ± 0,02	1,77 ± 0,06
Col-LDL/Col-total	0,27 ± 0,03	0,19 ± 0,05*	0,20 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Col-LDL/Col-HDL	0,51 ± 0,06	0,43 ± 0,06	0,35 ± 0,02*	0,41 ± 0,03

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina vs grupo sem sita (+/+). n.a. – não aplicável.

No início do estudo não se registaram diferenças significativas entre os ratos controlo ZDF (+/+) e os ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*) na tabela 11 e 12. Todavia, no tempo intermédio verificou-se uma redução tendencial nos 3 índices para os grupos controlo sita T₀ e T₆ vs controlo sem sita (tabela 11). Estas diferenças acentuaram-se no tempo final, em especial para o grupo sita T₀ vs sem sita (tabela 11).

Em relação ao efeito da sitagliptina nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*), verificou-se no tempo intermédio um aumento, ainda que apenas tendencial, da razão col-total/col-HDL nos grupos sita T₀ e sita T₆ vs sem sita (Tabela 12). No tempo final, houve uma tendência generalizada para uma redução dos indicadores aterogénicos nos 2 grupos com sita T₀ e T₆ vs sem sita, ainda que apenas tenha atingido significado estatístico, a redução de col-total/col-HDL no sita T₀ (Tabela 12).

Tabela 12 – Índices aterogénicos dos ratos ZDF (*fa/fa*) com e sem sitagliptina às 8, 20 e 26 semanas de idade (no início do tratamento e após 12 e 18 semanas de tratamento).

Parâmetro	ZDF (<i>fa/fa</i>)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo inicial (8 semanas)				
Col-total/Col-HDL	1,70 ± 0,02	n.a.	n.a.	n.a.
Col-LDL/Col-total	0,26 ± 0,03	n.a.	n.a.	n.a.
Col-LDL/Col-HDL	0,45 ± 0,04	n.a.	n.a.	n.a.
Tempo intermédio (20 semanas)				
Col-total/Col-HDL	1,51 ± 0,13	1,69 ± 0,08	1,63 ± 0,03	n.a.
Col-LDL/Col-total	0,21 ± 0,005	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02	n.a.
Col-LDL/Col-HDL	0,33 ± 0,03	0,25 ± 0,07	0,35 ± 0,03	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
Col-total/Col-HDL	1,77 ± 0,06	1,53 ± 0,01**	1,65 ± 0,07	1,64 ± 0,02
Col-LDL/Col-total	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,002	0,25 ± 0,02
Col-LDL/Col-HDL	0,36 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,009	0,43 ± 0,03

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina vs grupo sem sita (*fa/fa*).

6 – Função renal

6.1 – Trofismo renal

O peso dos rins (esquerdo e direito) foi avaliado às 20 e 26 semanas de idade, assim como, também foi calculado a razão deste com a massa corporal de cada rato, de forma a compreender melhor o aumento dos órgãos. Tanto ao tempo intermédio, como ao tempo final, os 3 grupos controlo com sitagliptina mostram-se bastante próximos do grupo de comparação, ZDF (+/+) sem sita (Tabela 13).

Tabela 13 – Trofismo dos rins dos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*) com e sem sitagliptina às 20 e 26 semanas de idade (após 12 e 18 semanas de tratamento).

Parâmetro (g)	ZDF (+/+)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo intermédio (20 semanas)				
Rins (D+E)	2,39 ± 0,08	2,20 ± 0,08	2,63 ± 0,02	n.a.
Rins / Massa Corporal (*10 ³)	6,11 ± 0,15	5,75 ± 0,14	6,03 ± 0,14	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
Rins (D+E)	2,56 ± 0,04	2,65 ± 0,04	2,51 ± 0,07	2,45 ± 0,06
Rins / Massa Corporal (*10 ³)	5,71 ± 0,07	5,93 ± 0,16	5,63 ± 0,15	5,69 ± 0,18
Parâmetro (g)	ZDF (<i>fa/fa</i>)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo intermédio (20 semanas)				
Rins (D+E)	3,25 ± 0,26	2,77 ± 0,09*	2,96 ± 0,07	n.a.
Rins / Massa Corporal (*10 ³)	8,82 ± 0,73	7,40 ± 0,23**	7,58 ± 0,16*	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
Rins (D+E)	3,02 ± 0,09	3,01 ± 0,11	3,57 ± 0,18***	3,15 ± 0,05
Rins / Massa Corporal (*10 ³)	8,42 ± 0,42	9,63 ± 0,35*	10,29 ± 0,17***	8,42 ± 0,40

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina vs grupo sem sita (+/+) e (*fa/fa*).

Nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*), os dois grupos com sita T₀ e T₆ no tempo intermédio mostram uma diminuição no peso dos rins, que é depois confirmada com a também diminuição da razão rins/massa corporal (Tabela 13). No tempo final, verificou-se um perfil inverso nos mesmos grupos com sita, a apresentarem uma razão rins/massa corporal bastante mais elevada, principalmente no grupo (*fa/fa*) sita T₆ (Tabela 13).

6.2 – Creatinina

Na figura 45A é apresentado a evolução da creatinina sérica ao longo do estudo para os grupos ZDF (+/+) e ZDF (*fa/fa*) sem sita, observando-se um comportamento inverso entre estes dois grupos. Com efeito, enquanto no grupo ZDF (+/+), a creatinina aumenta de uma forma bastante linear ao longo do estudo, já com valores superiores aos do grupo ZDF (*fa/fa*) no tempo intermédio, no grupo diabético ocorreu uma redução, a partir do tempo intermédio, que é estatisticamente inferior ao controlo (+/+) no tempo final (Fig. 45A).

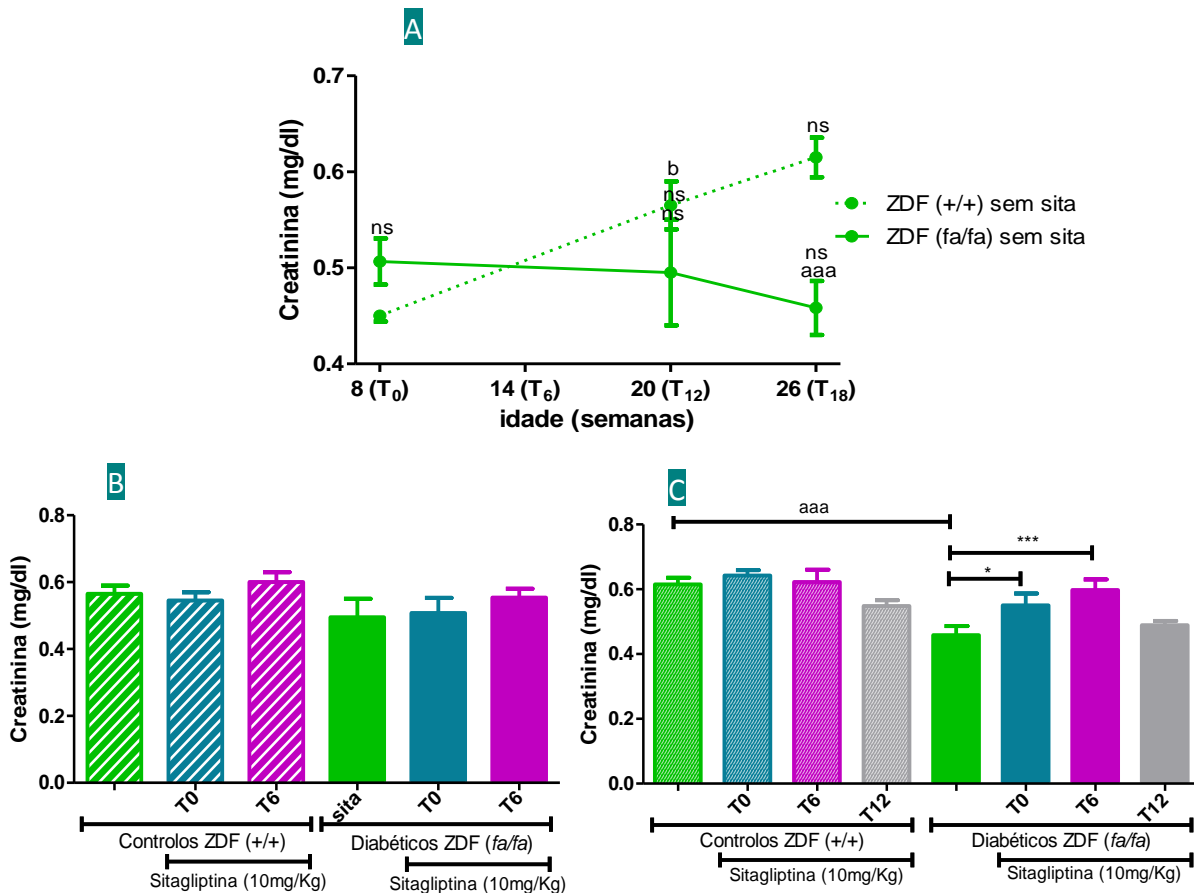


Figura 45 – Níveis séricos de Creatinina nos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*). **A** – evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

No tempo intermédio, a sitagliptina não tem qualquer efeito nem em ratos ZDF (+/+) nem em (*fa/fa*) (Fig. 45B). Contudo, no tempo final, verificou-se nos grupos diabéticos com sita T₀ e T₆ um aumento significativo, vs ZDF (*fa/fa*) sem sita (Fig. 45C).

6.3 – Ureia

Os níveis séricos de ureia dos ratos diabéticos (sem sita) mostram um perfil bastante semelhante aos níveis de creatinina, diminuindo numa fase mais avançada da doença, o que é, característico da diabetes (Fig. 46A). Os ratos controlo não mostram alterações destes valores ao longo do estudo, nem mesmo quando lhes é administrado a sitagliptina (Fig. 46A, B e C). No tempo final, apenas o grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₁₂, foi capaz de promover uma diminuição significativa, vs sem fármaco, para valores idênticos aos registados nos ratos controlo (Fig. 46C).

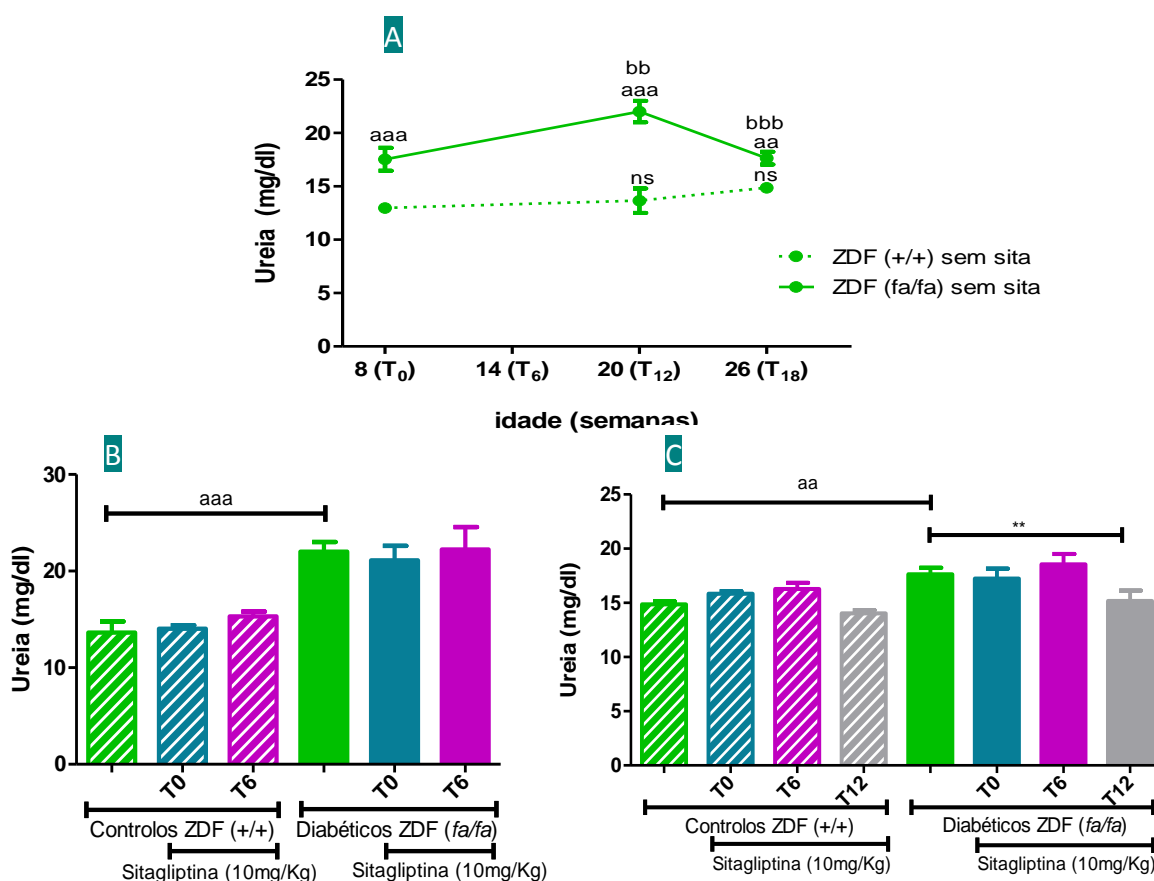


Figura 46 – Níveis séricos de Ureia nos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*). **A** – evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

7 – Função pancreática

7.1 – Trofismo do pâncreas

Na avaliação do trofismo do pâncreas e da influência da sitagliptina nos dois tipos de ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*), observámos que no tempo final os 3 grupos controlo com sita tinham a razão pâncreas/massa corporal superior, vs ZDF (+/+) sem sita, mostrando assim, um pequeno aumento do pâncreas, apenas com significado estatístico no grupo ZDF (+/+) sita T₀ (Tabela 14). No grupo ZDF (*fa/fa*) T₆ verificou-se um aumento significativo do peso do pâncreas, vs ZDF (*fa/fa*) sem sita (Tabela 14).

Tabela 14 – Trofismo do pâncreas dos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*) com e sem sitagliptina às 26 semanas de idade (após 18 semanas de tratamento).

Órgão (g)	ZDF (+/+)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo final (26 semanas)				
Pâncreas	0,87 ± 0,05	1,09 ± 0,09*	1,02 ± 0,08	0,92 ± 0,08
Pâncreas / Massa Corporal (*10 ³)	1,93 ± 0,10	2,44 ± 0,19**	2,28 ± 0,20	2,17 ± 0,16

Órgão (g)	ZDF (<i>fa/fa</i>)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo final (26 semanas)				
Pâncreas	0,79 ± 0,03	0,71 ± 0,06	0,99 ± 0,05*	0,76 ± 0,04
Pâncreas / Massa Corporal (*10 ³)	2,19 ± 0,04	2,25 ± 0,13	2,92 ± 0,10***	2,06 ± 0,10

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina vs grupo sem sita (+/+) e (*fa/fa*).

7.2 – α - amilase sérica

No tempo inicial, os níveis de alfa-amilase eram já inferiores no grupo ZDF (*fa/fa*) sem sita, vs ZDF (+/+), tendo sofrido uma diminuição a partir das 20 semanas de idade e mantendo-se até ao final do estudo. Os ratos controlo iniciaram e finalizaram o estudo com concentrações de alfa-amilase mais elevadas que os diabéticos, porém ao tempo intermédio verifica-se uma ligeira diminuição (Fig. 47A). O ligeiro decréscimo no grupo ZDF (*fa/fa*) nas últimas 6 semanas, poderá dever-se a um agravamento da doença nesta fase (Fig. 47A).

No tempo intermédio e final a sitagliptina aumentou os níveis desta enzima pancreática em todos os grupos em estudo (ratos controlo e nos ratos diabéticos) (Fig. 47B e C).

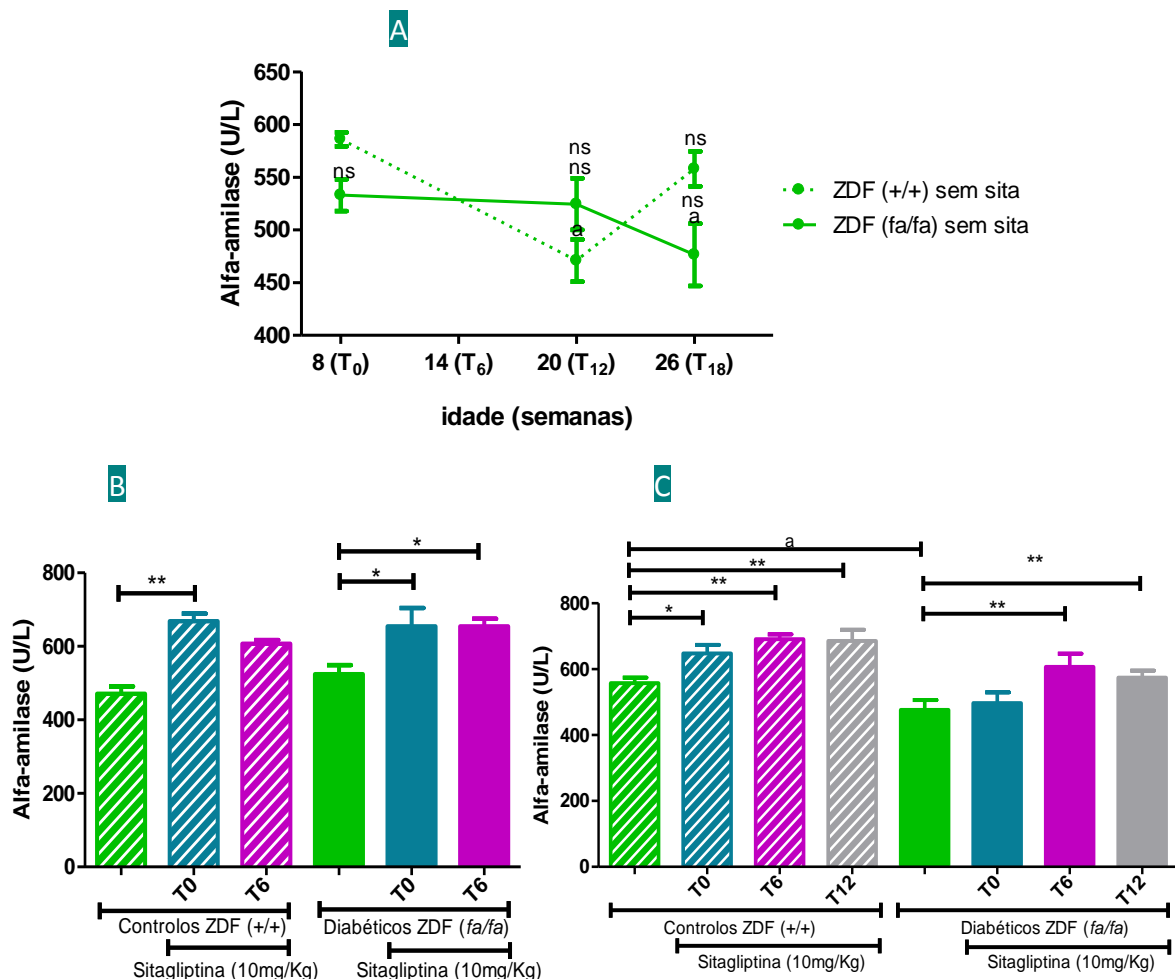


Figura 47 – Níveis séricos de alfa-amilase pancreática nos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*). **A** – evolução ao longo do período experimental dos ratos sem sita; **B** – níveis no tempo intermédio (semana 20); **C** – níveis no tempo final do estudo (semana 26). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

8 – Hemograma e agregação plaquetar

8.1 – Hemograma

No tempo inicial (8 semanas de idade), verificava-se já um aumento, ainda que tendencial, de alguns parâmetros hematológicos (GVs, HGB, HCT, CVE e PLT) no grupo ZDF (*fa/fa*) sem sita vs ZDF (+/+) (Tabelas 15 e 16). Esta tendência manteve-se no tempo intermédio e no tempo final, com exceção do PLT, que no tempo intermédio era superior no grupo ZDF (+/+), sendo idênticos no tempo final (Tabelas 15 e 16).

Os ratos controlo ZDF (+/+) sem sita, no tempo intermédio, quando comparados com os do tempo inicial, observa-se um ligeiro aumento de todos os parâmetros analisados no hemograma (Tabela 15). Ainda no tempo intermédio, não se verificaram diferenças entre os grupos ZDF (+/+) com sita e o grupo (+/+) sem sita. Semelhante padrão foi encontrado o tempo final (Tabela 15).

Com valores bastante semelhantes aos dos controlos, e da mesma forma que estes, também os diabéticos apresentam valores ligeiramente mais elevados no tempo intermédio, quando comparados com os do tempo inicial. Neste tempo intermédio, parâmetros como RBC (hemácias), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito) e PLT (plaquetas) aparecem aumentados nos grupos sita T₀ e T₆, em relação ao grupo sem sita, apesar de nem todos terem significado estatístico.

No tempo final, as alterações observadas ficaram mais esbatidas, não se registando diferenças significativas entre os 3 grupos com sita (T₀, T₆ e T₁₂) vs sem sita, e apenas se verificando uma redução significativa do número de plaquetas no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₁₂ (Tabela 16).

Tabela 15 – Parâmetros analisados no hemograma dos ratos controlos (ZDF (+/+)) com e sem sitagliptina às 8, 20 e 26 semanas de idade (no início do tratamento e após 12 e 18 semanas).

Parâmetro	ZDF (+/+)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo inicial (8 semanas)				
GVs (10⁶/μL)	6,37 ± 0,10	n.a.	n.a.	n.a.
HGB (g/dL)	12,10 ± 0,58	n.a.	n.a.	n.a.
HCT (%)	34,00 ± 0,51	n.a.	n.a.	n.a.
VCM (fL)	53,40 ± 0,17	n.a.	n.a.	n.a.
CVE (g/dL)	14,47 ± 0,19	n.a.	n.a.	n.a.
PLT (10³/μL)	790,30 ± 16,60	n.a.	n.a.	n.a.
Tempo intermédio (20 semanas)				
GVs (10⁶/μL)	7,40 ± 0,09	7,51 ± 0,07	7,70 ± 0,20	n.a.
HGB (g/dL)	13,25 ± 0,05	13,75 ± 0,15	13,65 ± 0,35	n.a.
HCT (%)	37,40 ± 0,40	38,25 ± 0,45	39,50 ± 1,00	n.a.
VCM (fL)	50,65 ± 0,05	50,90 ± 0,10	51,35 ± 0,05	n.a.
CVE (g/dL)	15,40 ± 0,20	15,40 ± 0,30	15,80 ± 0,00	n.a.
PLT (10³/μL)	950,00 ± 42,00	1030,00 ± 74,50	996,50 ± 10,50	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
GVs (10⁶/μL)	6,95 ± 0,11	6,87 ± 0,15	6,70 ± 0,17	6,98 ± 0,09
HGB (g/dL)	12,45 ± 0,27	12,48 ± 0,26	12,13 ± 0,36	12,57 ± 0,14
HCT (%)	34,77 ± 0,62	34,63 ± 0,75	33,88 ± 0,74	35,23 ± 0,34
VCM (fL)	50,03 ± 0,26	50,43 ± 0,30	50,58 ± 0,39	50,45 ± 0,37
CVE (g/dL)	15,92 ± 0,20	15,83 ± 0,27	15,45 ± 0,16	15,68 ± 0,35
PLT (10³/μL)	861,30 ± 17,23	878,80 ± 23,37	855,50 ± 27,45	751,30 ± 49,92*

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina vs grupo sem sita (+/+).

Tabela 16 – Parâmetros analisados no hemograma dos ratos diabéticos (ZDF *fa/fa*) com e sem sitagliptina às 8, 20 e 26 semanas de idade (no início do tratamento e após 12 e 18 semanas).

Parâmetro	ZDF (<i>fa/fa</i>)			
	Sem sitagliptina	Sitagliptina T ₀	Sitagliptina T ₆	Sitagliptina T ₁₂
Tempo inicial (8 semanas)				
GVs (10 ⁶ /μL)	6,85 ± 0,24	n.a.	n.a.	n.a.
HGB (g/dL)	13,05 ± 0,55	n.a.	n.a.	n.a.
HCT (%)	36,50 ± 1,4	n.a.	n.a.	n.a.
VCM (fL)	53,35 ± 0,15	n.a.	n.a.	n.a.
CVE (g/dL)	15,10 ± 0,30	n.a.	n.a.	n.a.
PLT (10 ³ /μL)	877,50 ± 101,50	n.a.	n.a.	n.a.
Tempo intermédio (20 semanas)				
GVs (10 ⁶ /μL)	7,58 ± 0,26	8,23 ± 0,23*	8,22 ± 0,12*	n.a.
HGB (g/dL)	13,55 ± 0,35	14,45 ± 0,39	14,55 ± 0,32	n.a.
HCT (%)	39,45 ± 0,65	41,98 ± 1,30	43,00 ± 0,98	n.a.
VCM (fL)	52,00 ± 0,90	50,98 ± 0,53	52,28 ± 0,50	n.a.
CVE (g/dL)	16,50 ± 1,00	16,45 ± 0,85	15,53 ± 0,20	n.a.
PLT (10 ³ /μL)	680,50 ± 134,50	870,30 ± 40,43*	878,00 ± 41,34*	n.a.
Tempo final (26 semanas)				
GVs (10 ⁶ /μL)	7,27 ± 0,19	7,22 ± 0,16	7,44 ± 0,17	7,45 ± 0,14
HGB (g/dL)	13,02 ± 0,32	12,98 ± 0,26	13,38 ± 0,34	13,27 ± 0,26
HCT (%)	36,78 ± 0,82	36,73 ± 0,69	38,40 ± 0,86	38,31 ± 0,95
VCM (fL)	50,62 ± 0,27	50,85 ± 0,82	51,63 ± 0,05	51,39 ± 0,37
CVE (g/dL)	16,18 ± 0,35	16,50 ± 0,56	15,70 ± 0,34	16,41 ± 0,24
PLT (10 ³ /μL)	835,2 ± 32,77	735,8 ± 32,51*	743,5 ± 19,65	863,6 ± 30,20

As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina vs grupo sem sita (*fa/fa*).

8.2 – Agregação plaquetar

Nos grupos ZDF (+/+) e (*fa/fa*) sem sitagliptina não se verificaram diferenças significativas, nem no tempo intermédio nem no tempo final, tanto para ADP como para Colagénio, apesar de um valor tendencialmente superior nos ratos diabéticos, *vs* controlos (Fig. 48).

Ao analisarmos o efeito da sitagliptina na agregação plaquetar, observámos que esta produz alguns efeitos positivos nos grupos controlo e diabético. Com efeito, na estimulação com ADP verificou-se uma redução da agregação plaquetar para todos os grupos com sitagliptina (T₀, T₆ e T₁₂) controlo *vs* sem sita, havendo também uma redução no grupo diabético com sita T₀ *vs* o seu homólogo sem sita (Fig. 48A). Em relação à agregação plaquetar em sangue total estimulada com colagénio, verificou-se uma redução tendencial nos grupos controlo com sita, sobretudo aqueles que iniciaram tratamento no T₆ e no T₁₂, *vs* o seu controlo, e uma redução, também tendencial, nos grupos diabéticos com sita, principalmente no T₀ e T₆ *vs* ZDF (*fa/fa*) sem sita (Fig. 48B).

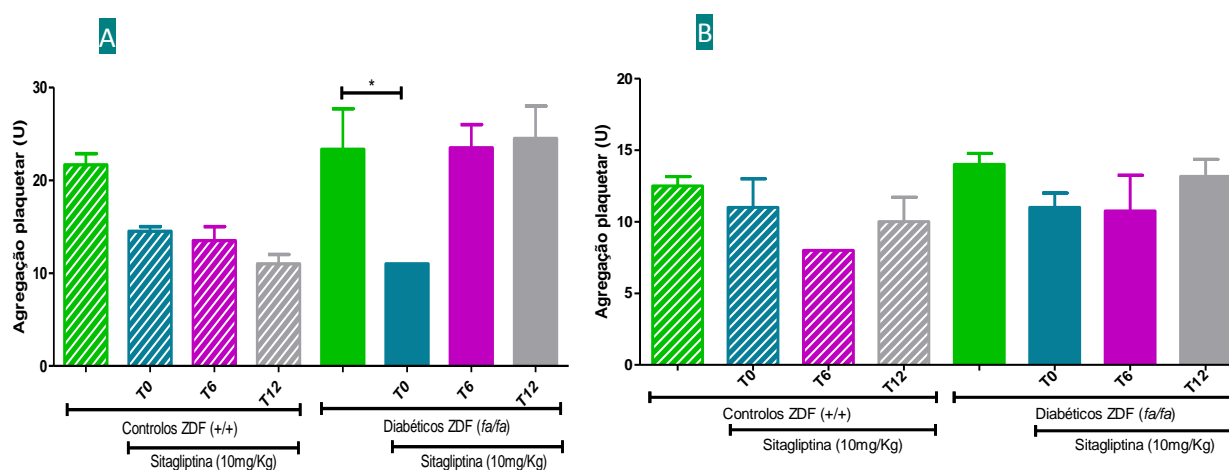


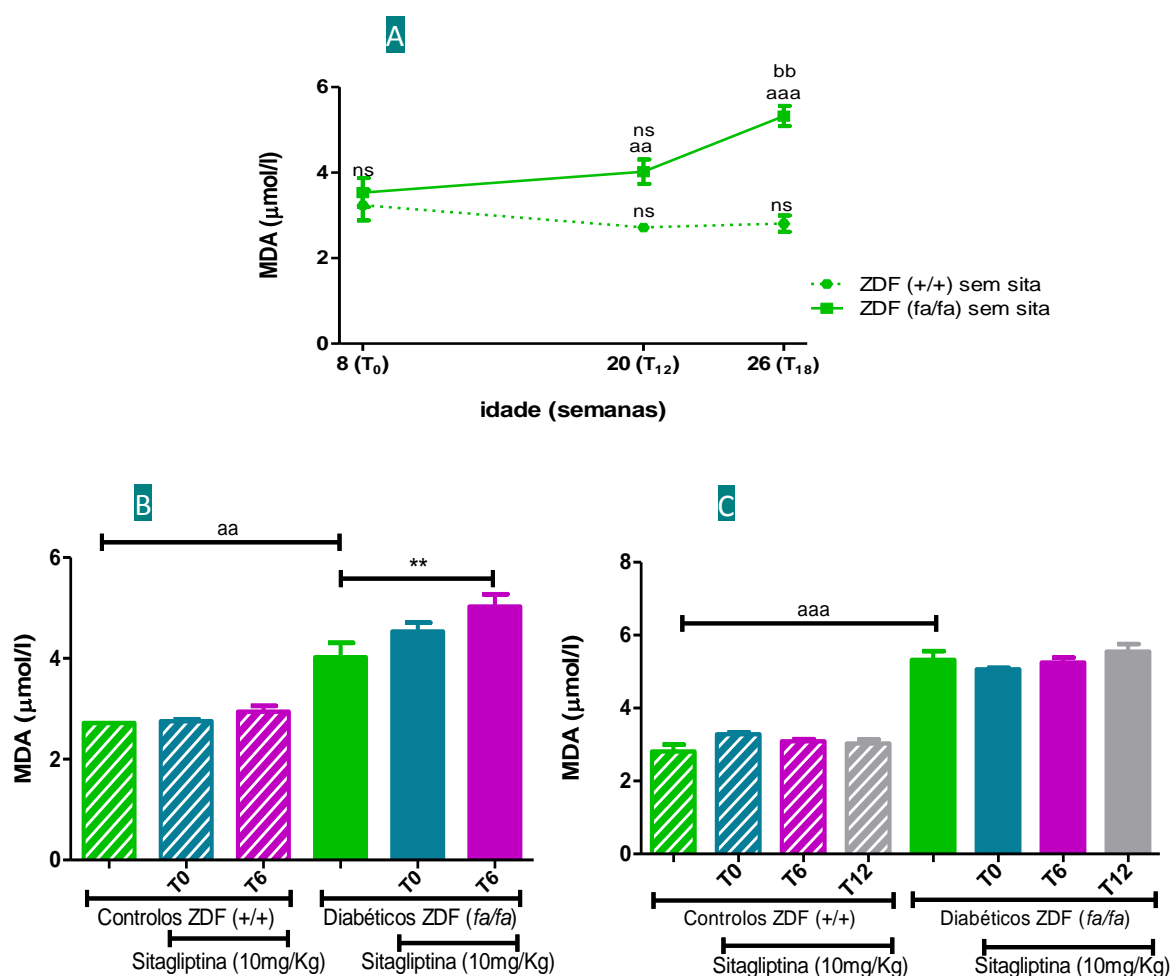
Figura 48 – Valores de agregação plaquetar dos ratos ZDF (+/+) e (*fa/fa*), no tempo final. **A** – com ADP (1 μM); **B** – com Colagénio (5 μg/ml). As diferenças significativas são representadas por * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) e comparam os grupos com sitagliptina *vs* grupo sem sita (+/+) e (*fa/fa*).

9 – Marcadores de estado redox

9.1 – Peroxidação lipídica (MDA)

9.1.1 – Em soro

Inicialmente (T_0 ; 8 semanas de idade), os ratos controlos e diabéticos apresentavam valores de malondialdeído (MDA) bastante próximos, que se mantiveram mais ou menos constantes ao longo das semanas de estudo nos ratos ZDF (+/+). O mesmo não acontece no grupo ZDF (*fa/fa*), que regista um aumento da peroxidação lipídica, sobretudo no tempo final (T_{18} ; 26 semanas de idade) (Fig. 49A).



A concentração sérica de MDA, no tempo intermédio e final não mostra grandes alterações entre os diferentes grupos controlo com e sem sita (Fig. 49B e C). Contudo, nos ratos diabéticos verifica-se um aumento no tempo intermédio no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₆ vs grupo sem sita (Fig. 49B), equiparando-se os 4 grupos diabéticos no tempo final (Fig. 49C).

9.1.2 – Tecidualar

Foram avaliados os níveis de MDA nos seguintes tecidos dos grupos em estudo: fígado, coração e rim, no tempo intermédio e final (Fig. 50) e pâncreas e músculo, apenas no tempo final (Fig. 51). Em nenhum dos 3 tecidos avaliados nos dois tempos (T_i e T_f) (fígado, coração e rins) se observaram diferenças entre os valores de MDA nos ratos ZDF (*fa/fa*) sem sita vs ZDF (+/+) sem sita (Fig. 50). Os órgãos avaliados apenas ao tempo final (músculo e pâncreas) mostraram níveis de MDA significativamente inferiores nos diabéticos (Fig. 51).

Em relação ao efeito da sitagliptina, no tempo intermédio, as concentrações de MDA nos 3 órgãos avaliados (fígado, coração e rins) não mostraram muitas variações, vs os respectivos grupos sem sita. Enquanto no fígado e nos rins apenas se verifica uma ligeira diminuição no grupo diabético sita T₀ vs sem sita, no coração a diminuição é observada no grupo com o mesmo tempo de administração mas controlo, ou seja, ZDF (+/+) sita T₀ vs (+/+) sem sita (Fig. 50A, C e E).

Nos ratos sacrificados às 26 semanas (tempo final), a sitagliptina parece demonstrar mais alterações. Na figura 50B, representativa do fígado, verificou-se um pequeno aumento nos grupos ZDF (+/+) sita T₆, ZDF (*fa/fa*) sita T₀ e ZDF (*fa/fa*) sita T₆, quando comparados com os seus respectivos grupos sem sita, ZDF (+/+) e (*fa/fa*), respectivamente. Todavia, o grupo diabético sita T₁₂ é o que demonstra melhores resultados, pois mostra uma diminuição bastante significativa (Fig. 50B). No MDA quantificado no coração, também às 26 semanas, observa-se um aumento nos ratos diabéticos com sitagliptina T₆ e uma diminuição nos dois grupos com sita T₁₂, ZDF (+/+) e (*fa/fa*), tendo o último um significado estatístico mais eminente (Fig. 50D). O fármaco nos rins parece apenas ter tido efeito positivo, ao nível da peroxidação lipídica, nos ratos diabéticos e nos grupos sita T₆ e T₁₂, verificando-se neste último uma vez mais, uma drástica diminuição (Fig. 50F).

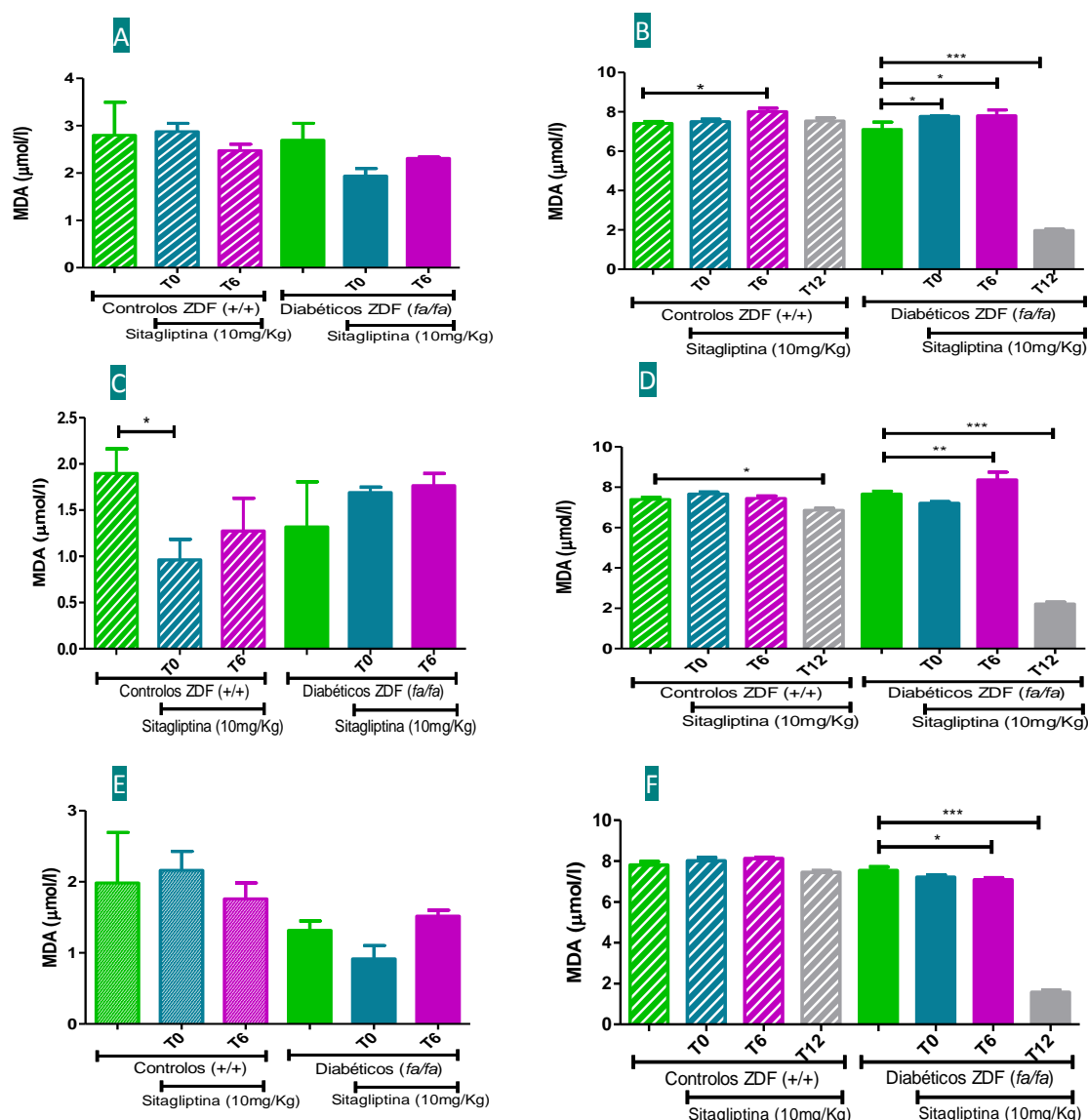


Figura 50 – Concentração de malondialdeído (via TBARS) em diferentes tecidos e tempos, nos ratos controles (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (fa/fa)). Representa: **A** – o fígado no tempo intermédio; **B** – o fígado no tempo final; **C** – o coração no tempo intermédio; **D** – o coração no tempo final; **E** – os rins no tempo intermédio; **F** – os rins no tempo final. Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

No pâncreas e músculo dos ratos controlo sita T₆ e T₁₂, as concentrações de MDA revelam-se diminuídas em relação ao grupo controlo sem sita, enquanto o grupo diabético sita T₁₂ volta a diminuir significativamente, mostrando que a sitagliptina pode ter muito bons resultados quando administrada numa fase mais avançada da doença (Fig. 51A e B).

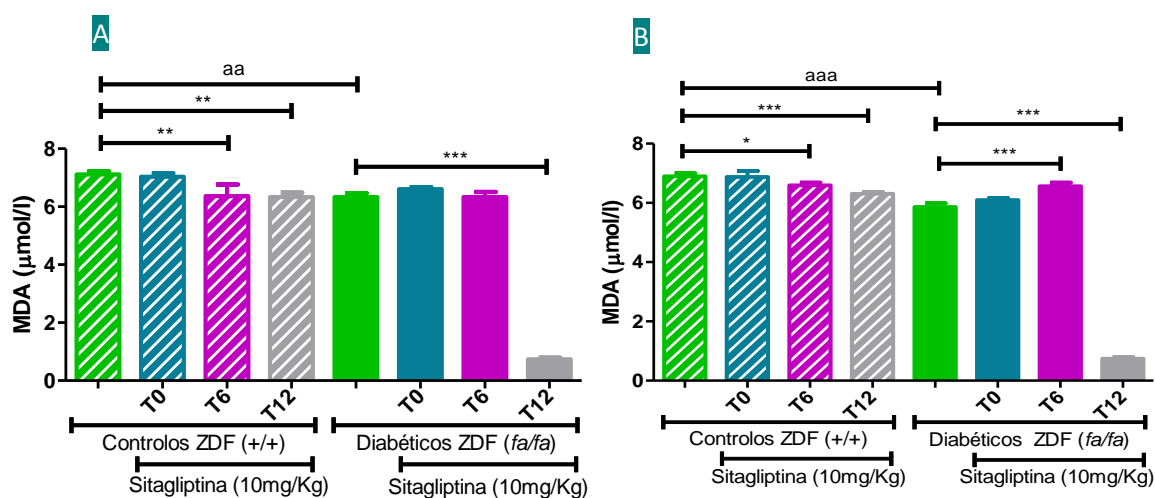


Figura 51 – Concentração de malondialdeído (via TBARS) em diferentes tecidos dos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)), no tempo final (26 semanas de idade). Representa: **A** – o pâncreas; **B** – o músculo. As diferenças significativas são representadas por ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente para uma, duas ou três letras.

9.2 – Estado antioxidante total

Os valores encontrados para a capacidade antioxidante total (TAS) para o grupo controlo (sem sita) não diferem significativamente ao longo de todo o período experimental. O mesmo não acontece com o grupo diabético que, para além de mostrar valores mais elevados que o controlo, demonstra uma ligeira diminuição nas primeiras doze semanas do estudo e um aumento a partir desse tempo intermédio até ao final (Fig. 52A).

Em relação ao efeito da administração da sitagliptina, no tempo intermédio os valores de TAS não sofreram alterações estatisticamente significativas, sendo que às 20 semanas a sitagliptina não mostra resultados positivos nos grupos diabéticos e não diabéticos sita T₀ e T₆, ainda que pareça haver um aumento tendencial nestes grupos vs ZDF (*fa/fa*) sem sita (Fig. 52B).

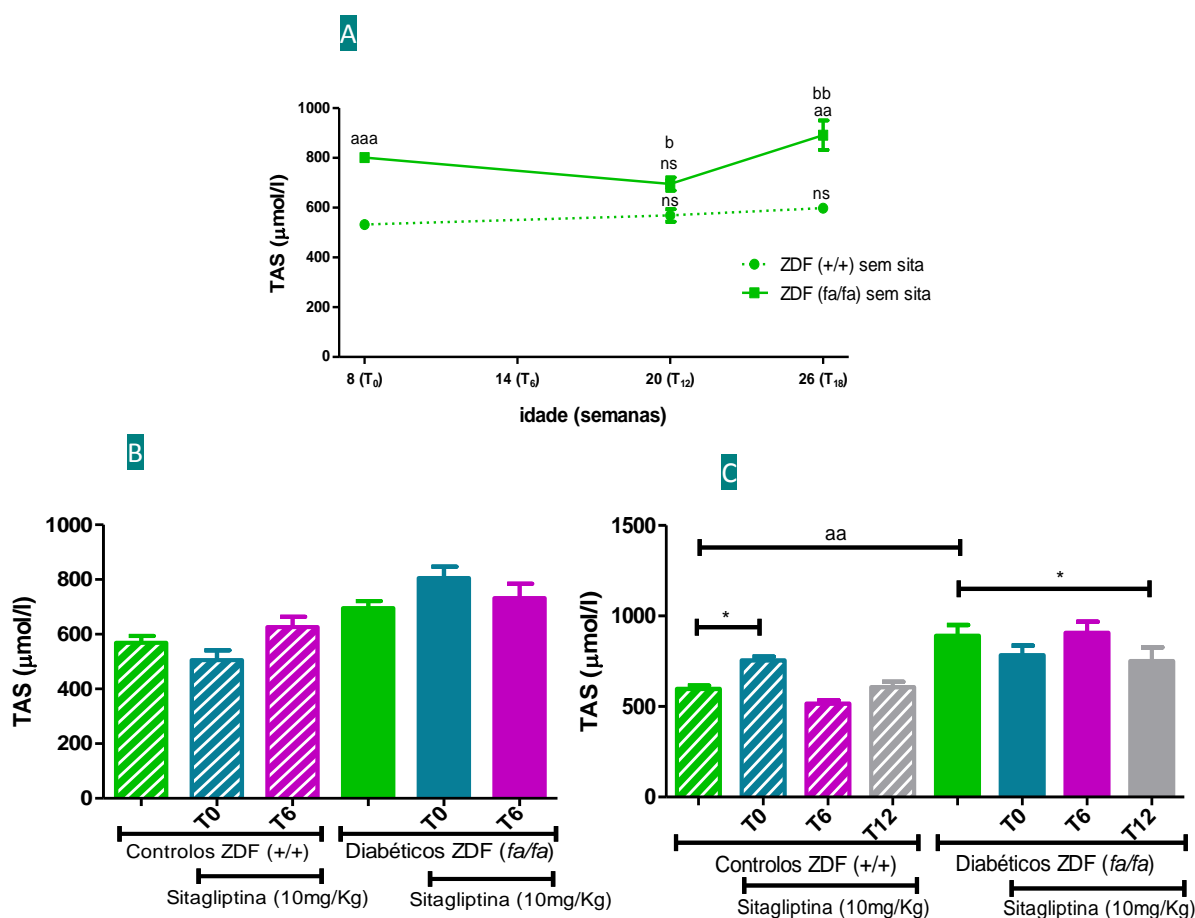


Figura 52 – Estado antioxidante total (TAS) sérico nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (fa/fa)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (fa/fa) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

No tempo final, os resultados mostram-se em concordância com o MDA de alguns tecidos, uma vez que, apesar de se verificar um ligeiro aumento no grupo controlo sita T₀, verifica-se uma diminuição do TAS nos ratos diabéticos com sita T₁₂, reflectindo assim um efeito positivo na avaliação das defesas antioxidantes (Fig. 52C).

9.3 – Malondialdeído (MDA)/Estado Antioxidante Total (TAS)

Ao estudarmos o razão MDA/TAS nos diferentes grupos controlo e diabético, observámos que os valores são bastante próximos entre si, mesmo quando comparados nos diferentes tempos de estudo, mostrando que houve uma compensação das variações de peroxidação lipídica, através de um aumento de antioxidantes (Fig. 53A, B e C).

Os valores de MDA/TAS no tempo inicial são superiores nos ratos ZDF (+/+) vs ZDF (*fa/fa*) sem sita. Este padrão é invertido até ao tempo final, ainda que a diferença não seja estatisticamente significativa (Fig. 53A).

Em relação ao efeito do fármaco, verificou-se a existência de valores tendencialmente superiores em todos os grupos diabéticos vs controlo, mas sem alterações com significado estatístico com sita vs sem sita, nem nos controlos nem nos diabéticos (Fig. 53B e C).

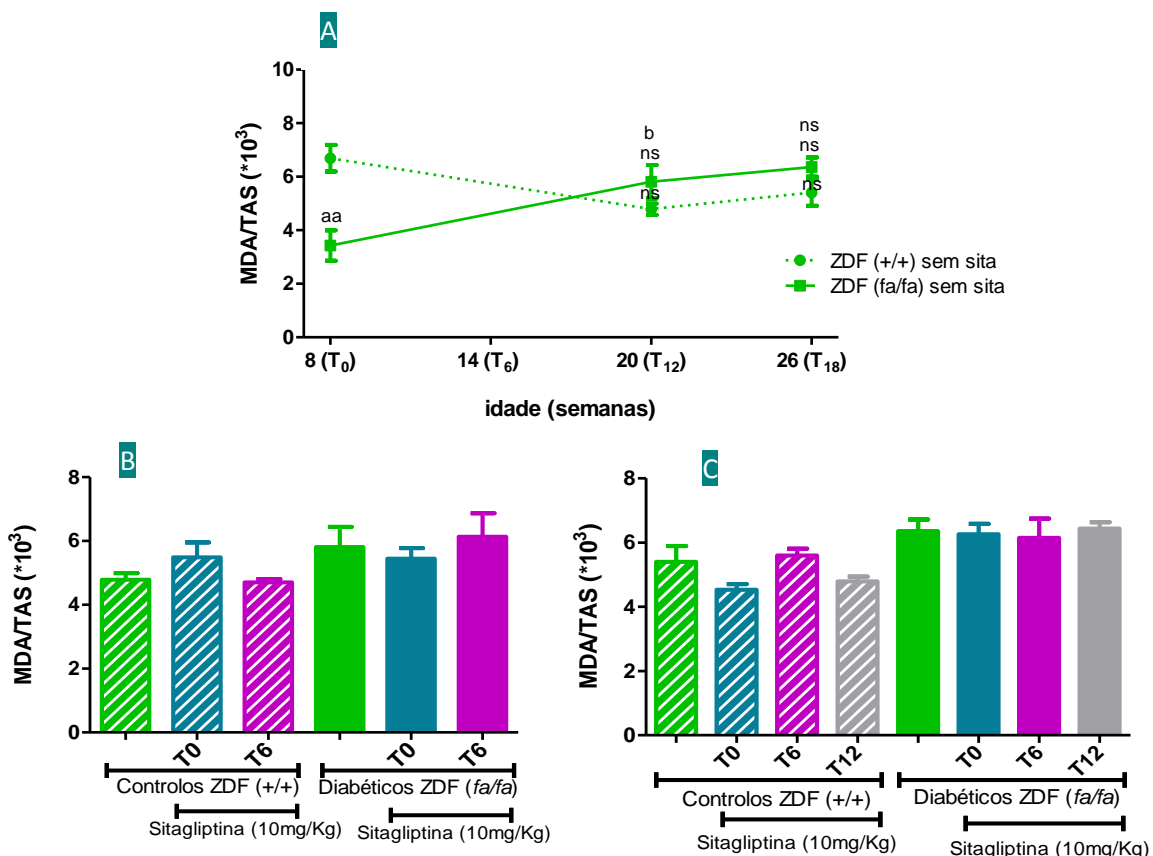


Figura 53 – Razão MDA/TAS nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

9.4 – 3-Nitrotirosina (3-NT)

A produção de espécies reactivas de nitrogénio, avaliada pela concentração sérica de 3-NT, encontrava-se aumentada nos ratos ZDF (*fa/fa*), relativamente ao seu controlo ZDF (+/+), ao longo do estudo (Fig. 54A). Nos grupos diabéticos e controlos com sita, não se observaram alterações significativas entre os diferentes tempos de administração, tanto no tempo intermédio como no tempo final (Fig. 54B e C).

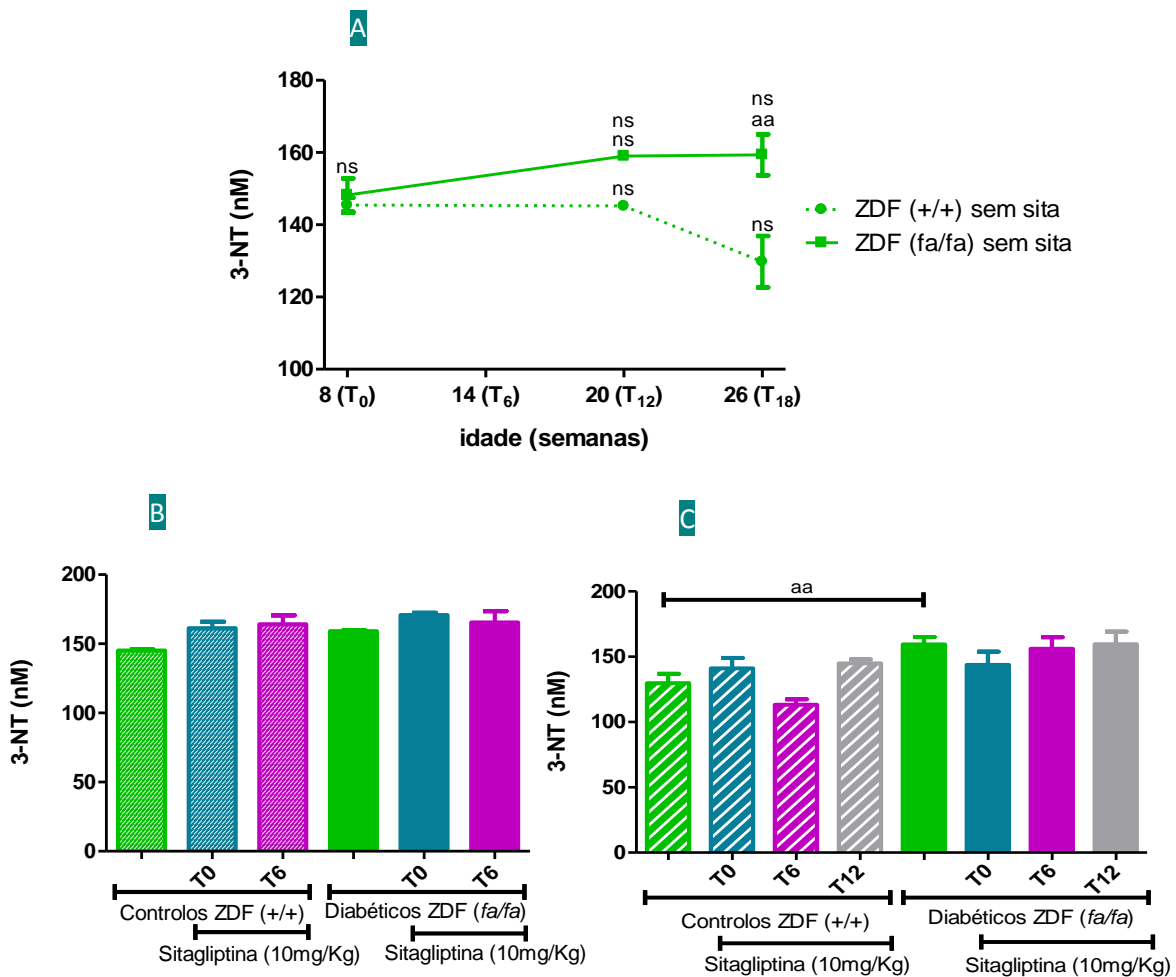


Figura 54 – Concentração sérica de 3-NT nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

10 – Perfil inflamatório

10.1 – Avaliação dos níveis de adipocitocinas

10.1.1 – Adiponectina

Relativamente à concentração sérica de adiponectina, os ratos ZDF (+/+) sem sita não sofreram alterações significativas nos três tempos avaliados, sendo os seus valores sempre superiores aos observados no grupo ZDF (*fa/fa*). Estes ratos diabéticos sem sitagliptina, entre as 8 e as 20 semanas, sofreram uma descida dos níveis de adiponectina que se manteve até ao final do estudo (Fig. 55A).

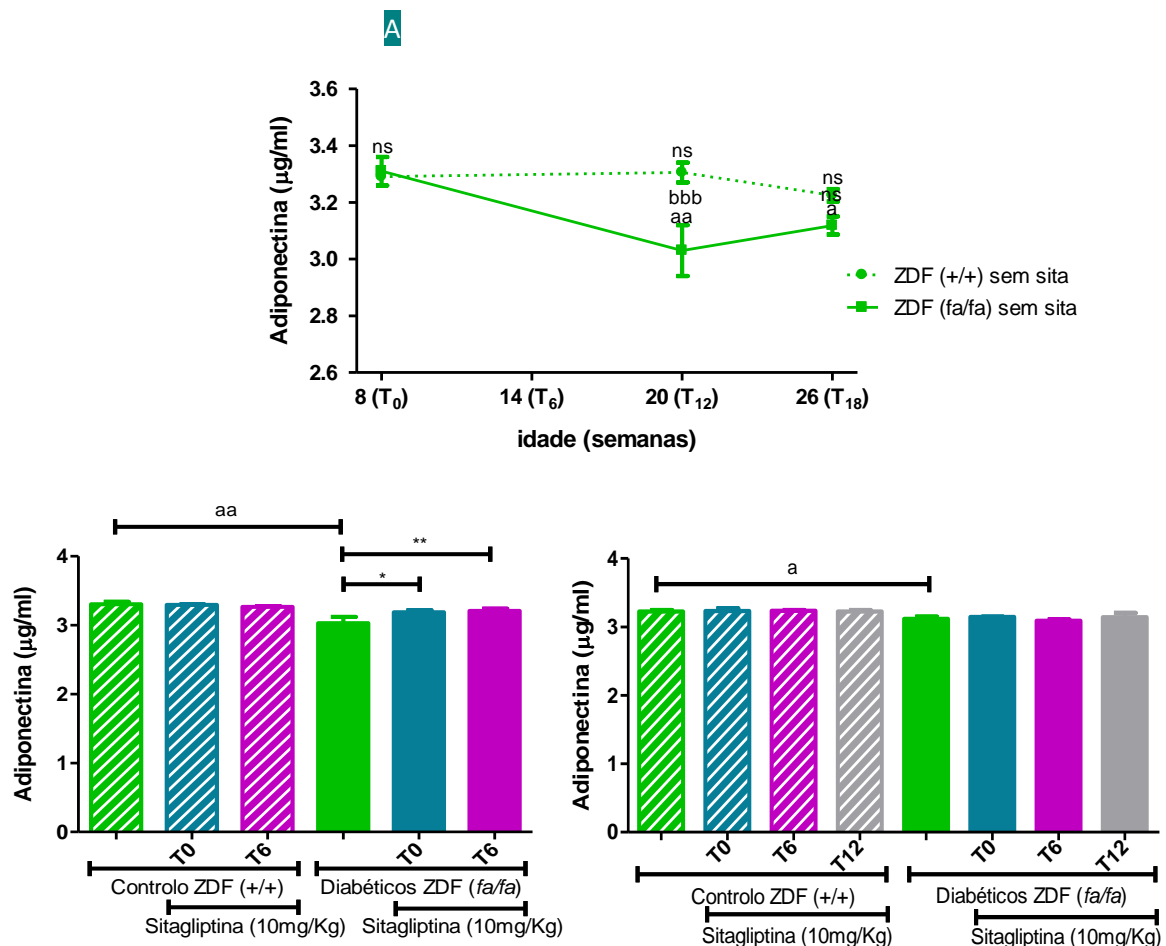


Figura 55 – Concentração sérica de Adiponectina nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Nos tempos intermédio e final, os 3 grupos controlo com sitagliptina não mostraram alterações nos seus níveis quando comparados com o grupo (+/+) sem sita (Fig. 55B e C). Contudo, nos grupos diabéticos sita T₀ e T₆ os valores da adiponectina eram superiores ao seu grupo sem sita, no tempo intermédio, pois no tempo final não se observaram alterações entre os diferentes grupos (Fig. 55B e C).

10.1.2 – Interleucina-1 β (IL-1 β)

Na avaliação das citocinas pró-inflamatórias, verificou-se que os níveis de IL-1 β nos ratos ZDF (*fa/fa*) foram sempre constantes ao longo do estudo e superiores aos níveis encontrados nos ratos controlo (+/+), ambos sem sita (Fig. 56A).

No tempo intermédio, observamos que os grupos com sitagliptina não tiveram qualquer efeito nos valores da IL-1 β , tanto para ratos diabéticos como para controlos (Fig. 56B). Apenas no tempo final, se verificou um aumento desta citocina nos grupos ZDF (*fa/fa*) e (+/+) sita T₆ e uma tendência em diminuir do grupo diabético sita T₁₂ (Fig. 56C).

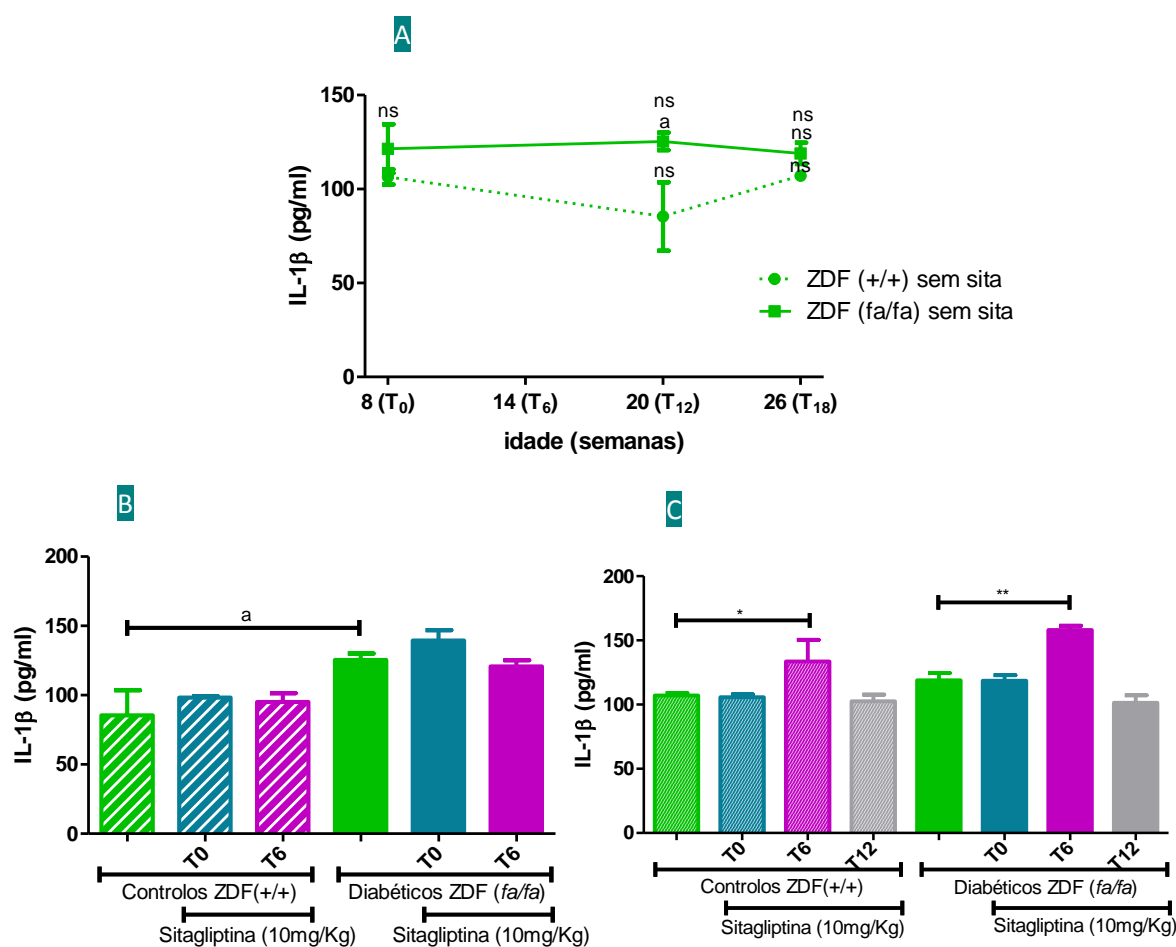


Figura 56 – Concentração sérica de IL-1 β nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

10.1.3 – Interleucina-6 (IL-6)

Na continuidade da avaliação das citocinas pró-inflamatórias, observamos que os níveis de IL-6 dos ratos diabéticos, no tempo inicial (8 semanas) e intermédio (20 semanas), eram superiores aos valores dos ratos controlo, ainda que sem significado estatístico. Este perfil inverte-se ao tempo final e os níveis dos ZDF (*fa/fa*) passam a ser inferiores ao seu grupo de comparação (Fig. 57A).

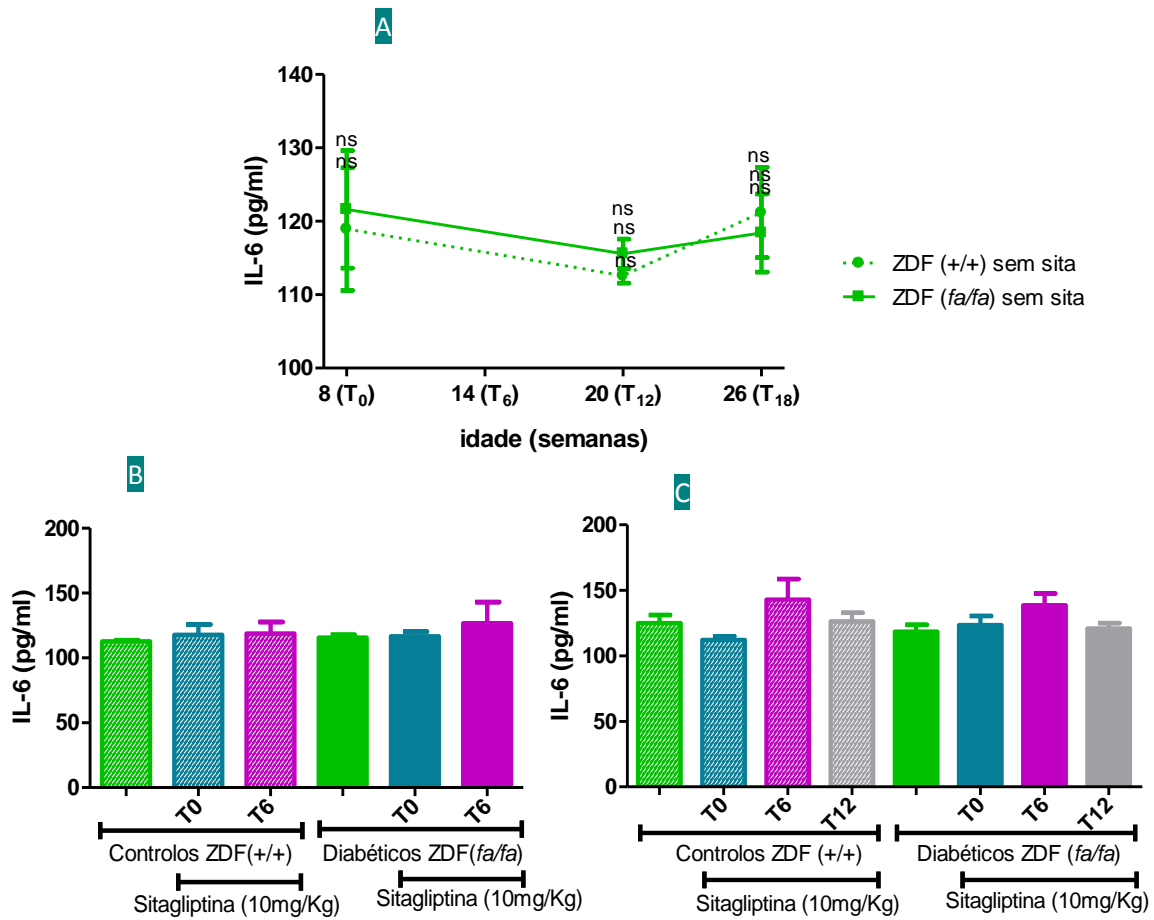


Figura 57 – Concentração sérica de IL-6 nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

No tempo intermédio todos os grupos avaliados ZDF (+/+) e (*fa/fa*) com sitagliptina não mostraram alterações (Fig. 57B). No tempo final apesar de não ter havido alterações estatisticamente significativas, no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₆ verificou-se uma ligeira tendência em aumentar os níveis séricos de IL-6 (Fig. 57C).

10.1.4 – Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)

No grupo controlo ZDF (+/+) e no grupo diabético ZDF (*fa/fa*), ambos sem sita, os níveis séricos de TNF- α não sofreram variações ao longo do período experimental, tendo os ratos diabéticos valores significativamente mais altos que os não diabéticos (Fig. 58A).

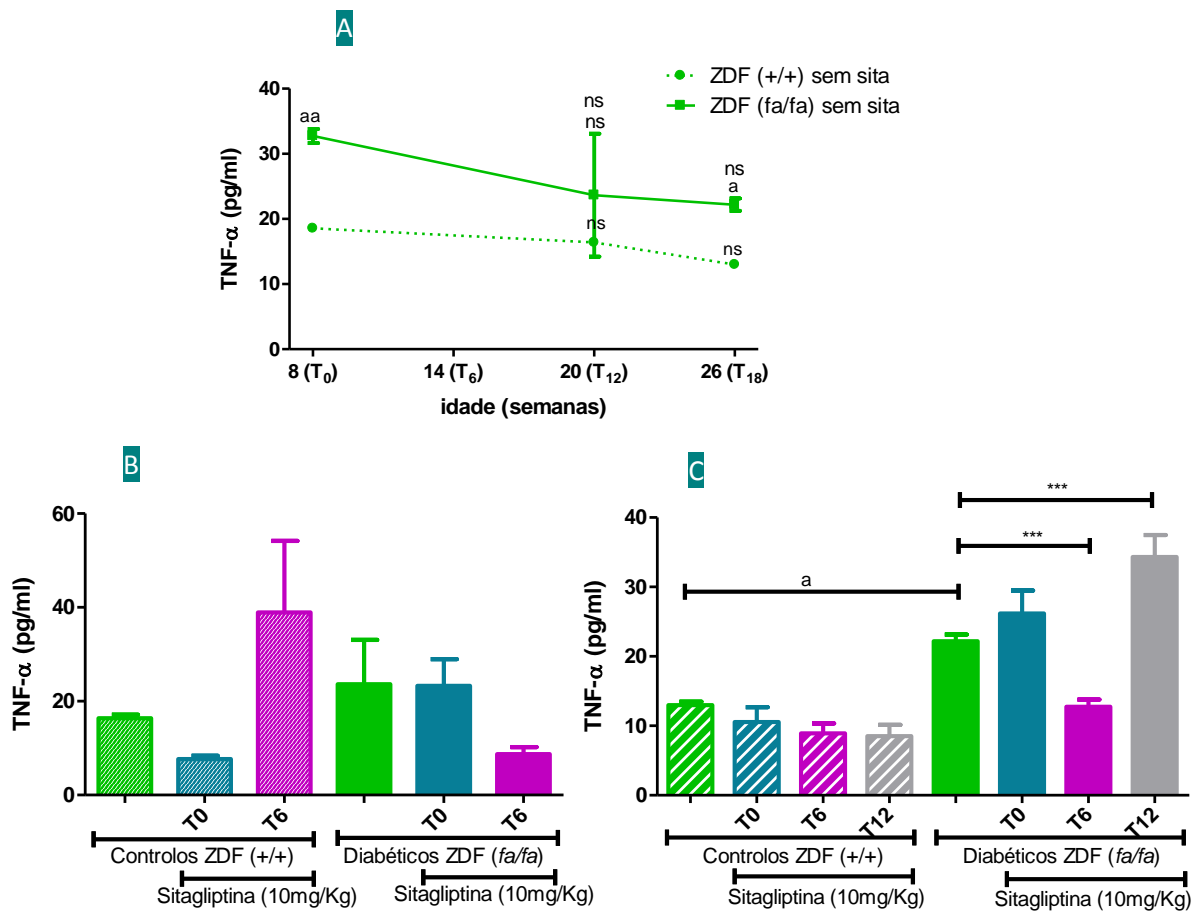


Figura 58 – Concentração sérica de TNF- α nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

No tempo intermédio verifica-se uma diminuição dos valores de TNF- α nos ratos controlo (+/+) sita T₀ vs sem sita. O mesmo já não aconteceu com os ratos controlo (+/+) sita T₆, que mostram os seus níveis de TNF- α muito mais elevados que o seu grupo respectivo sem sita (Fig. 58B). Nos ratos diabéticos, o grupo sita T₆ apresenta um perfil inverso ao mesmo grupo controlo, observando-se uma diminuição da concentração sérica de TNF- α (Fig. 58B). Apesar de todas estas alterações entre grupos no tempo intermédio, nenhuma mostra significado estatístico.

No tempo final, enquanto os grupos controlo com sitagliptina (T₀, T₆ e T₁₂), vs (+/+) sem sita, não mostram alterações em relação à concentração sérica desta adipocitocina, no grupo diabético sita T₆, verificou-se uma diminuição dos seus valores e um aumento no grupo (*fa/fa*) sita T₁₂, vs (*fa/fa*) sem sita, todos com significado estatístico (Fig. 58C).

10.2 – Avaliação de proteínas de fase aguda

10.2.1 – Proteína C reactiva (PCR)

Os níveis de PCR dos ratos diabéticos sem sita sofreram um aumento até às 20 semanas, acabando por se manterem até à última semana de estudo (semana 26). O mesmo perfil é observado nos ratos controlo, mas com níveis superiores aos ratos diabéticos, apesar de com excepção no tempo final, onde os níveis do grupo ZDF (*fa/fa*) são ligeiramente superiores (Fig. 59A).

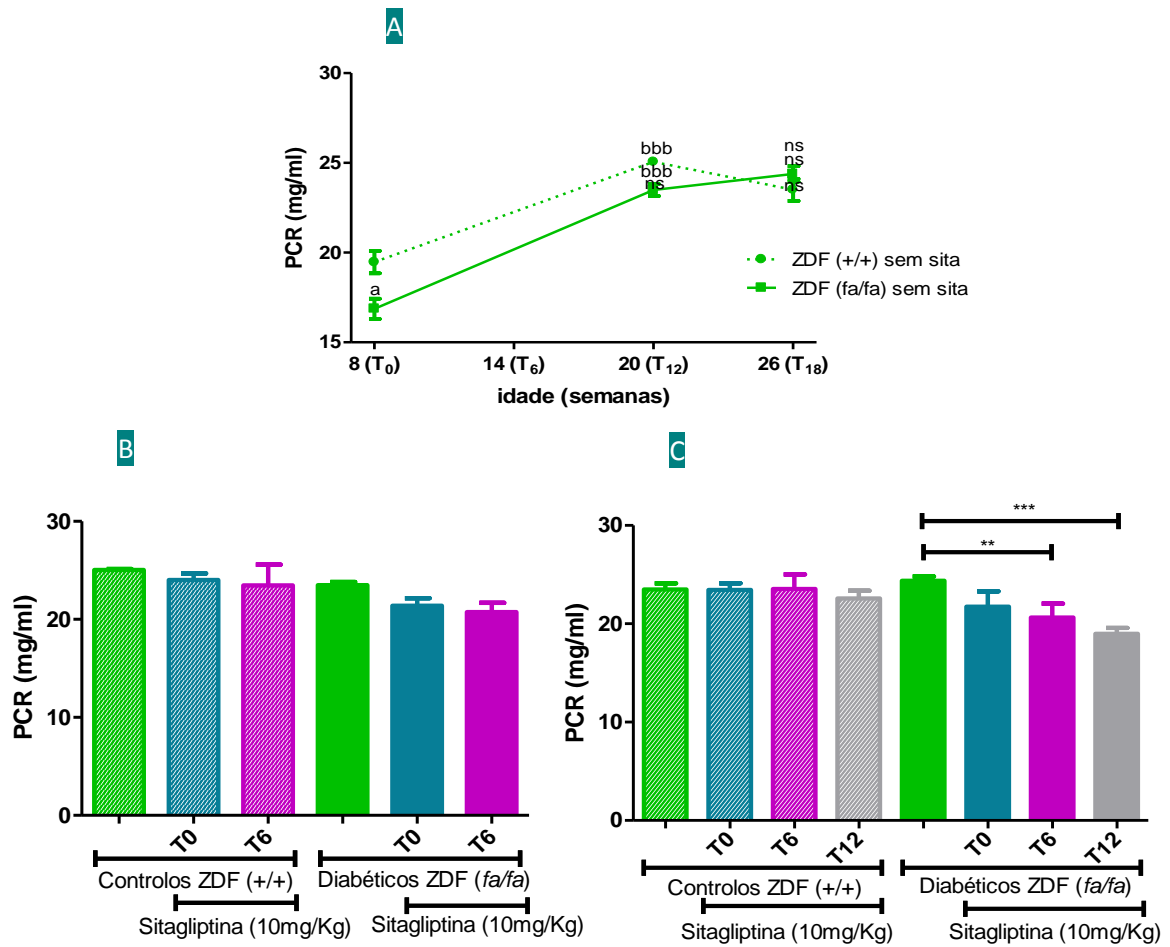


Figura 59 – Concentração sérica de PCR nos ratos controlos (ZDF (+/+)) e diabéticos (ZDF (*fa/fa*)). **A** – evolução ao longo do período experimental; **B** – representação do tempo intermédio (20 semanas); **C** – representação do tempo final (26 semanas). Significância estatística: ^a (*fa/fa*) vs. (+/+); ^b T₁₂ vs. T₀ e T₁₈ vs. T₁₂; * com sitagliptina vs. sem sitagliptina (intra-grupo). P<0,05, P<0,01 e P<0,001, respectivamente para uma, duas ou três letras.

No tempo intermédio, verificou-se uma ligeira diminuição nos grupos diabéticos sita T₀ e T₆, apesar de sem significado estatístico (Fig. 59B). O mesmo acontece no tempo final com estes grupos diabéticos com sita, tendo significado estatístico nos grupos ZDF (*fa/fa*) sita T₆ e T₁₂ (Fig. 59C). Quanto aos controlos com sitagliptina, não se observaram alterações nos dois últimos tempos analisados, tempo intermédio e tempo final (Fig 59B e C).

Parte V

DISCUSSÃO

A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é a doença com maior crescimento no mundo e a principal causa da crescente morbidade e mortalidade cardiovascular. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, prevê-se que em 2030 haja 300 milhões de doentes diabéticos em todo o mundo. Em Portugal, esta “epidemia do século XXI” toma também proporções preocupantes, pois 11,7% da população portuguesa é diabética.

A patogénese da DMT2 caracteriza-se por uma desordem endócrina e envolve anomalias no metabolismo da glicose e lipídeos, incluindo a secreção irregular de insulina das células β e a resistência à actividade desta hormona. Sendo esta a definição abreviada desta patologia, na verdade a DMT2 abrange uma série de outras interacções e contribuições para o desenvolvimento da doença. A susceptibilidade genética e ambiental, sobretudo baseada no aumento da esperança de vida, nas alterações na dieta e na actividade física, respectivamente, resulta no aumento da obesidade e da síndrome metabólica (Korenblum e col., 2005; Gerstein e col., 2006; Yache e col., 2006; Hanefeld e col., 2007; Schwarz e col., 2007). A nível molecular, a libertação de diversas hormonas e factores inflamatórios pelo tecido adiposo estabelecem a ligação entre a obesidade e a diabetes, havendo uma contribuição clara do excesso de gordura visceral e do desequilíbrio oxidativo para o desenvolvimento da insulino-resistência (Bornstein e col., 2000; Ehrhart-Bornstein e col., 2003; Lamounier-Zepter e col., 2006; Ulgen e col., 2008; Mlinar e col., 2007).

Apesar dos grandes avanços na medicina durante os últimos anos, a cura para a DMT2 ainda parece inatingível, o que valoriza o estudo de outras formas de prevenção do crescimento desta doença, bem como do retardamento da sua progressão.

Os benefícios para a saúde resultantes de uma dieta e prática do exercício físico regular são múltiplos e de tal modo diversificados que poderá afirmar-se que nenhum sistema orgânico escapa à sua influência. A síndrome metabólica, a obesidade, a doença cardiovascular e a diabetes figuram entre as patologias que beneficiam com estas alterações do estilo de vida. Contudo, a evolução natural da DMT2 torna esta medida insuficiente para o tratamento da doença. E, desta forma, a estratégia terapêutica passa a contemplar medidas farmacológicas. Consoante as necessidades do diabético e a fase da doença em que se encontra, é adoptado um regime terapêutico singular ou com associações de diferentes agentes antidiabéticos, de modo a fazer um controlo da glicemia e uma

correção “fisiológica” da resistência à insulina e das anomalias verificadas na sua secreção.

Actualmente, existe já uma considerável variedade de escolhas farmacológicas com diferentes mecanismos de acção, como o aumento da secreção de insulina pelo pâncreas (sulfonilureias), a diminuição da libertação de glicose pelo fígado (metformina), a diminuição da absorção gastrointestinal de hidratos de carbono (inibidores de α -glucosidase) ou estimuladores da sensibilidade à insulina (metformina e tiazolidinediona). Apesar do número de agentes antidiabéticos existentes, alguns apresentam algumas limitações, designadamente sob a forma de efeitos adversos, como o aumento de peso (tiazolidinediona), a hipoglicemia (sulfonilureias, insulina) ou a intolerância gastrointestinal (metformina).

Embora nas últimas décadas o tratamento se tenha destinado a reduzir/controlar a hiperglicemia, actualmente o foco começa a mudar, virando-se para uma preservação e regeneração das células β e prevenção das complicações macro e microvasculares associadas à doença (Meier, 2008 e Reichard e col., 1993). Assim, surgiram os análogos de GLP-1 que, para além da capacidade de diminuir a HbA1c e o peso, tentam melhorar a função das células β pancreáticas, apesar do risco de hipoglicemia e a inconveniência da administração intravenosa. Contudo, outros alvos surgiram de modo a aperfeiçoar este tratamento antidiabético. Incluídos neste grupo estão os inibidores da dipeptidil peptidase IV (como a sitagliptina), que parecem ter o potencial de aumentar a acção da insulina nos tecidos alvo, estimular o catabolismo das gorduras e hidratos de carbono, diminuir a produção de glicose endógena e aumentar a neogénese das células β e a sua secreção de insulina estimulada por glicose (Jain, 2008).

Podendo a sitagliptina ser uma grande promessa na terapêutica da diabetes tipo 2, tivemos como objectivo entender em que fase da doença - pré-diabetes, diabetes ou diabetes avançada - este fármaco poderia ser mais eficaz, não apenas no controlo glicémico, mas também na preservação das células β . Neste contexto, tentamos avaliar a eficácia da sitagliptina na prevenção e progressão da DMT2 e das perturbações a ela associadas, procurando desvendar e entender alguns dos mecanismos bioquímicos e fisiopatológicos de evolução da doença e, sobretudo, a forma como o fármaco poderia prevenir, designadamente ao nível da inflamação e stresse oxidativo.

Porém, a realização destes estudos no homem é difícil e daí a necessidade de recorrer a modelos animais que, ao possibilitarem a monitorização das condições ambientais, a

recolha de sangue e a colheita de órgãos e tecidos, permitem uma investigação mais detalhada dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença e, conseqüentemente, da sua prevenção ou tratamento. Embora os resultados assim obtidos não possam ser directamente extrapoláveis para o homem, eles constituem, sem dúvida, uma abordagem de grande utilidade para o estudo da patologia, suas complicações e eficácia da terapêutica.

Desta forma, iniciámos o presente estudo com a caracterização do modelo experimental escolhido e, em seguida avaliámos os efeitos da sitagliptina.

a) Caracterização do modelo experimental de DT2 e progressão da doença

Como foi anteriormente descrito, o modelo animal utilizado para o estudo da diabetes foi o rato *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF). Estes animais têm origem dos ratos *Zucker* obesos e possuem uma mutação espontânea no receptor de leptina, ou seja, no gene *fa* (Philips e col., 1996), que está associado à obesidade. De acordo com a literatura, os ratos ZDF obesos que apresentam o genótipo (*fa/fa*) exibem uma série de anomalias metabólicas (hiperlipidemia, hiperglicemia e resistência à insulina), cardiovasculares e renais, sendo que, o aparecimento destas disfunções é progressivo. Estes ratos apresentam nas primeiras duas semanas de vida um metabolismo lipídico anómalo, seguido de uma hiperinsulinemia, uma intolerância à glicose e hiperglicemia e uma resistência periférica à insulina (Peterson e col., 1990). A resistência à insulina acontece em duas fases: na primeira desenvolvem hiperinsulinemia e, numa segunda fase, uma insulinopenia relativa com diminuição da massa das células β pancreáticas. Desta forma, este tipo de ratos consegue reproduzir os diferentes estadios da diabetes humana. A escolha dos ratos ZDF (+/+) para grupo controlo foi feita com base em alguns parâmetros que se mantêm normais, como o peso, os níveis de glicose e insulina, bem como o perfil lipídico (Liao e col., 1997; Lee e col., 2000).

Os tempos de estudo foram seleccionados de acordo com estudos prévios, e assim, escolheu-se como ponto de partida as 8 semanas de idade, pois nesta idade os animais já apresentavam hiperinsulinemia e hiperglicemia moderadas. De acordo com estudos anteriores do nosso grupo, às 14 semanas de vida, com a alimentação diabetogénica, os ratos atingiriam o pico de hiperinsulinemia, encontrando-se numa fase pré-diabética. A escolha das 20 semanas foi feita por ser o momento, de acordo com o estudo prévio, de caracterização da diabetes, uma vez que os animais estão em insulinopenia. Contudo, no estudo anterior não foi possível esclarecer com exactidão se os ratos na semana 20 já

teriam atingido uma fase de diabetes sustentada, uma vez que a insulinopenia encontrada foi ainda muito moderada. No sentido de avaliar uma maior desregulação metabólica, acompanhada por uma disfunção das células β pancreáticas, prolongou-se o estudo até às 26 semanas.

Neste nosso ensaio, procedeu-se ao longo das semanas de estudo, à avaliação do peso corporal e do perímetro abdominal, de modo a que este último parâmetro servisse como referência à gordura abdominal. Os ratos controlo ZDF (+/+) mostram um crescimento uniforme ao longo de todo o tratamento, enquanto nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*), a massa corporal e o perímetro abdominal, já ligeiramente superiores às 8 semanas, evoluíram muito acentuadamente numa fase inicial, o que é característico da obesidade/diabetes. Tal como acontece nos humanos, numa fase mais avançada da diabetes (sensivelmente a partir das 14 semanas) os ratos diabéticos diminuíram ligeiramente de peso e de gordura abdominal sem causa aparente, sendo este um dos principais “sintomas” da doença já instalada.

Apesar destes ratos diabéticos diminuírem de peso numa fase mais avançada da doença, não mostram alterações na sua alimentação, comendo sempre quantidades constantes de comida diabetogénica a partir de uma pré-diabetes. No entanto, constata-se que a partir da semana 14/15 de estudo há uma estabilização, ou mesmo redução, da quantidade de comida ingerida pelos ratos diabéticos, ao contrário dos controlos, o que coincide com o período a partir do qual o peso e o perímetro abdominal começam a diminuir.

Em relação à pressão arterial, verificou-se que os ratos diabéticos apresentavam valores superiores aos dos ratos controlo, no fim do tratamento. Este dado está de acordo com o panorama no humano, uma vez que a diabetes, a obesidade e a hiperglicémia/hiperlipidémia são factores de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial, pelas implicações tanto a nível vascular como cardíaco que estes factores determinam.

Os indicadores de trofismo cardíaco estavam aumentados nos ratos diabéticos sacrificados às 20 semanas relativamente aos controlos, o que está associado a perturbações do foro cardiovascular. Contudo, verificou-se que no tempo final os valores se equipararam, o que poderá ficar a dever-se a uma falência da capacidade de compensação cardíaca numa fase mais avançada da diabetes, e que coincidiu com uma redução do peso dos animais, eventualmente por degradação funcional acentuada.

Relativamente ao perfil glicémico, logo nas primeiras semanas avaliadas (com 11 semanas de idade) os ratos diabéticos apresentam valores de glicose significativamente superiores aos dos ratos controlo. Esta hiperglicemia vai-se acentuando ao longo do tempo, com um grande aumento por volta da semana 17, e ligeiras oscilações até ao tempo final, enquanto os ratos controlo permanecem normoglicémicos. Este perfil confirma trabalhos anteriores do nosso grupo (Teixeira de Lemos e col, 2009). Também os valores de HbA1c, no tempo final, confirmam estes dados e validam o nosso modelo animal de diabetes tipo 2. Contudo, em relação à insulina os dados são mais curiosos, uma vez que no tempo inicial já se observa um hiperinsulinemia, ocorrendo uma perda da função das células β pancreáticas observada, na semana 20, pela insulinopenia relativa que se vai acentuando até ao final do estudo (semana 26). Esta insulinopenia severa observada nos ratos diabéticos ao tempo final é acompanhada pelo elevado índice de insulino-resistência, avaliado pelo HOMA-IR. Tendo em conta os resultados do estudo anterior, e os agora obtidos, podemos afirmar que no tempo inicial (8 semanas) já existia uma hiperglicemia e hiperinsulinemia, que se agravam até à semana 14 (Teixeira de Lemos e col, 2009), momento a partir do qual os valores da glicemia estabilizam, não obstante a queda acentuada na insulina. Ou seja, a insulinopenia relativa e a correspondente insulino-resistência desenvolvem-se de forma mais clara entre a semana 14 e a 17, atingindo-se um quadro de declarada diabetes, com insulinopenia severa e insulino-resistência, às 20 semanas de idade (Fig. 60).

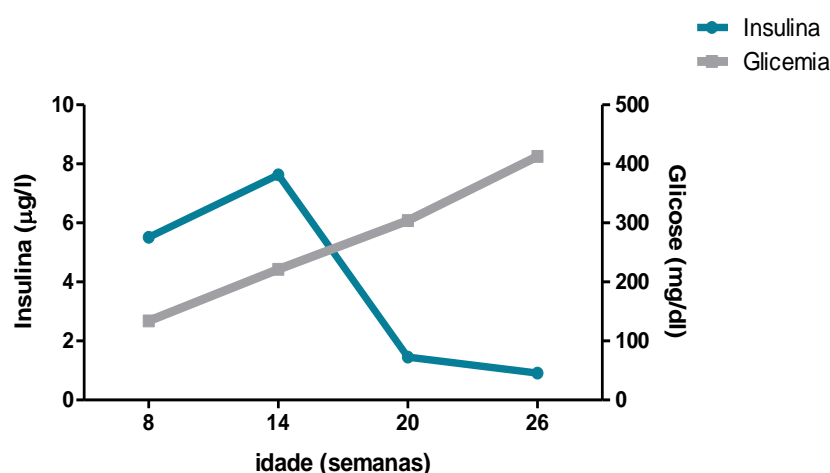


Figura 60 – Relação dos níveis de glicemia e de insulina ao longo do estudo.

De acordo com o esperado, e confirmando os dados anteriores, também o perfil lipídico se encontra alterado nos diabéticos. Com efeito, já no tempo inicial se constata uma dislipidemia, com valores elevados de colesterol total e de TGs nos ratos diabéticos, *vs* controlos. Este padrão agrava-se ao longo do tempo, acentuando a hiperlipidemia, que é característica da diabetes, com excepção dos valores de TGs que, apesar de sempre superiores aos dos ratos controlo, sofrem uma ligeira redução no tempo intermédio (20 semanas de idade), voltando a elevar-se no tempo final.

A este perfil de disglícemia e dislipidemia estão associadas anomalias metabólicas e resistência à insulina. O facto de existir insulino-resistência no tecido adiposo, traduz-se num aumento de AG em circulação, explicada no capítulo I da introdução. Este excesso de AG livres possui a capacidade de se acumular, dando origem ao fígado gordo. De acordo com Marchesini e Forlani (2002) o aumento do peso do fígado em ratos ZDF (*fa/fa*), relativamente aos seus controlos ZDF (+/+), parece estar relacionado com a acumulação de gordura. Com efeito, a nível hepático os AG livres aumentam o seu conteúdo em triglicéridos que se acumulam e provocam insulino-resistência hepática, estimulando a neoglucogénese e a saída de mais glicose para a circulação. Por outro lado, a acumulação dos AG ao nível do músculo esquelético conduz a uma diminuição da utilização da glicose, por inibição da sua oxidação e/ou por inibição da sinalização insulínica.

Também os rins são alvo desta patologia, cuja falência e disfunção é observada no aumento do peso do órgão e nos valores séricos de creatinina e ureia. No tempo inicial a concentração de ureia era já superior nos ratos diabéticos *vs* controlo. Contudo, verifica-se um ligeiro agravamento até às 20 semanas de idade, havendo depois uma acentuada redução entre a semana 20 e a 26, para valores iguais aos dos ratos controlo. Um comportamento semelhante foi observado para a creatinina sérica, sugerindo uma acentuada nefrotoxicidade neste estadio da diabetes (depois da semana 20). Tendo em conta que os diabéticos apresentam como uma das principais complicações a nefropatia diabética, o que também foi constatado nestes animais em trabalhos anteriores, seria de esperar um aumento da creatinina sérica, que é usado como marcador para a lesão/insuficiência renal. Os nossos resultados mostram um valor superior ao controlo logo no tempo inicial, que se inverte na semana 20, o que deverá ficar a dever-se aos valores não esperados de creatinina nos ratos controlo, e que deverão ser objecto de confirmação futura. Considerando o perfil de outros dados já relatados (glicemia e insulinemia), poderemos especular sobre a possibilidade de um agravamento dos valores de creatinina na

semana 14 (o que não foi avaliado neste trabalho), depois decrescendo acentuadamente até ao tempo final, coincidindo com a fase de deteriorização orgânica. De qualquer forma, trabalhos posteriores deverão ter em atenção estes indicadores, tanto mais quanto a observação macroscópica do rim no dia do sacrifício dos animais era suficientemente reveladora da existência de nefropatia. Uma outra possível explicação para estes valores reside no papel do músculo esquelético nos níveis de creatinina sérica, tida como um metabolito da creatina que, por sua vez, é quase exclusivamente de origem no músculo esquelético. Tal como equacionado por Harita e col. (2009), uma redução da creatinina sérica poderá reflectir um menor volume de músculo esquelético. Sendo este um dos principais alvos periféricos da insulina, e estando a resistência à insulina associada ao desenvolvimento da DMT2, uma diminuição da massa muscular poderá explicar a redução de creatinina sérica com o agravamento da diabetes, por um lado, e a insulino-resistência devido ao menor número de alvos para a insulina, por outro. Esta associação foi observada em diabéticos japoneses (Harita e col., 2009), e parece também poder ser explicada pelos nossos dados, uma vez que se verificou uma concordância entre a redução dos valores de creatinina e a redução de massa corporal entre a semana 20 e 26.

Assim, os ratos ZDF (*fa/fa*) utilizados exibiram: obesidade, com aumento de perímetro abdominal até à semana 14-15, com posterior perda de peso, eventualmente por degradação acentuada resultante de um estado de diabetes agravado; hiperglicemia, crescente ao longo das semanas do estudo e confirmada pelos valores de HbA1c no tempo final; hiperinsulinemia logo no tempo inicial (8 semanas) mas evoluindo rapidamente para insulinopenia sugestivo de rápida degradação da função pancreática; disfunção ao nível renal, demonstrada pelos níveis séricos de ureia e creatinina; hipercolesterolemia, confirmada pelos níveis elevados de colesterol-total e colesterol-LDL e hipertrigliceridemia, evidenciada pelos valores de TG.

Para além do papel desempenhado ao nível da insulino-resistência periférica, os AG poderão ainda ser responsabilizados pela diminuição da função das células β pancreáticas e até mesmo apoptose, que ocorrerá num estadió mais avançado da DMT2. Nos ratos diabéticos observa-se uma diminuição da massa pancreática, numa fase mais avançada da doença, e presumivelmente associada a uma disfunção do órgão e a uma insulinopenia (Vesterhus e col., 2008). Os valores de α -amilase em soro eram inferiores aos dos ratos controlo, com excepção do tempo intermédio, onde se observou uma ligeira diminuição nos ratos controlo. A α -amilase sérica é geralmente usada como um marcador de

lesão/disfunção pancreática, razão pela qual esperaríamos um aumento nos ratos diabéticos em relação aos controlos, o que não se verificou. Ainda que estes valores devam ser confirmados posteriormente, até porque outros parâmetros (nomeadamente a evolução dos níveis de insulina) sugerem disfunção das células β pancreáticas, outras explicações podem ser equacionadas. Com efeito, níveis reduzidos desta enzima são detectados em indivíduos obesos, o que poderá explicar os resultados por nós alcançados.

Aparentemente, existirão várias explicações para as alterações existentes ao nível das células β pancreáticas, como a glicotoxicidade, o incremento de espécies reactivas de oxigénio e azoto e possíveis fenómenos inflamatórios.

O stresse oxidativo indica a acumulação intracelular de espécies reactivas de oxigénio e de azoto e tem sido implicado em numerosas patologias como a aterosclerose, as complicações microvasculares da diabetes, a apoptose das células β pancreáticas (Robertson, 2006; Evans e col., 2003; Brownlee, 2005) e as diferentes formas de insulino-resistência (Evans e col., 2002; Evans e col., 2005).

A comparação dos parâmetros de equilíbrio oxidativo entre os animais diabéticos ZDF (*fa/fa*) e o seu grupo controlo não diabético, ZDF (+/+), mostra um aumento de dano originado pelo ataque dos compostos oxidantes aos lipídeos da membrana. Este aumento da peroxidação lipídica (MDA) e das espécies reactivas de nitrogénio (3-NT) ao longo do tempo foi acompanhado por uma acrescida produção de espécies antioxidantes (TAS) já no tempo inicial, eventualmente para compensar a agressão oxidativa, que se manteve ao longo do tempo. Esta resposta antioxidante poderá justificar a não existência de níveis superiores de peroxidação lipídica, em comparação com os dos ratos controlo, na maioria dos tecidos avaliados.

Na procura de outras causas da desregulação metabólica verificada no modelo de DMT2 utilizado, considerámos a inflamação, onde avaliámos algumas adipocitocinas (adiponectina, IL-6 e TNF- α) e a proteína de fase aguda (PCR).

Ao contrário das citocinas pró-inflamatórias séricas e tal como no nosso estudo, a adiponectina representa níveis diminuídos nos ratos diabéticos. Os factores que intervêm na diminuição dos níveis não são ainda totalmente conhecidos, sabendo-se, no entanto, que os seus níveis circulantes têm sido inversamente correlacionados com os níveis de AGL e de TG (Punyadeera e col., 2005), com o peso corporal e com as concentrações de insulina (Maeda e col., 2001; Combs e col., 2002). Os níveis dos mediadores inflamatórios avaliados (TNF- α , IL-1 β e IL-6), apresentam-se aumentados neste modelo de DMT2,

contribuindo o TNF- α para a insulino-resistência. Os resultados obtidos em todos os parâmetros séricos de avaliação de inflamação sugerem que as maiores diferenças relativamente aos ratos diabéticos são observadas na fase de uma diabetes já estabelecida, uma vez que, apesar do não agravamento dos parâmetros pró-inflamatórios, há uma marcada redução da concentração de adiponectina. Em relação à PCR, nos ratos diabéticos verificou-se um aumento acentuado entre o tempo inicial (8 semanas) e o tempo intermédio (20 semanas), mantendo-se depois sensivelmente constante até ao tempo final (26 semanas). Tendo em conta que este é um marcador de fase aguda da inflamação, esta variação está de acordo com um agravamento progressivo destes mecanismos ao longo do desenvolvimento da diabetes. No entanto, o perfil idêntico encontrado nos ratos controlo, que por ser inesperado deverá ser oportunamente confirmado, retira algum significado à variação encontrada nos diabéticos.

b) Avaliação do papel da sitagliptina na DMT2

Sabendo que a sitagliptina parece ser útil na prevenção e tratamento do dismetabolismo diabético, fomos avaliar os efeitos provocados por este fármaco em diferentes fases da diabetes, tendo um grupo iniciado a administração às 8 semanas, numa fase em teoria ainda pré-diabética, outro iniciado às 14 semanas numa fase de clara hiperglicemia e eventual início de resistência à insulina, e por fim, um último grupo com sitagliptina apenas quando está instalada uma diabetes avançada, a partir das 20 semanas de idade.

A partir dos resultados obtidos, observámos que a sitagliptina não leva a alterações do peso corporal e perímetro abdominal, enquanto ratos com um metabolismo normal. Todavia, num diabético este fármaco em diferentes tempos parece mostrar diferentes efeitos, pois a administração de sitagliptina iniciada às 8 (ZDF (*fa/fa*) sita T₀) semanas mostrou uma ligeira diminuição do peso e perímetro abdominal, enquanto no grupo diabético sita T₆, esta parece não ter tido qualquer efeito, uma vez que os valores destes parâmetros se encontrarem sempre bastante próximos ao grupo sem sita. O melhor perfil foi observado no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₁₂, no qual o peso e o perímetro abdominal se mantiveram até à semana 26 sempre constantes, sem chegar a apresentar a diminuição do peso que é uma das características de um estadio avançado da diabetes. Tendo sido este o grupo diabético que apresentou uma massa corporal mais elevada, também foi o que

mostrou quantidades mais elevadas de comida ingerida, durante as semanas de administração do fármaco. Nos outros dois grupos de ratos diabéticos com sita (sita T₀ e T₆), observaram-se quantidades sempre bastante próximas ao grupo de comparação, ZDF (*fa/fa*) sem sita. Apenas, se verificou uma pequena descida do consumo na semana 20, em ambos os grupos, provavelmente como resultado de alguma perturbação pontual.

De acordo com o panorama humano, também os ratos diabéticos utilizados apresentavam os factores de risco (hiperlipidemia, obesidade e hiperglicemia) para o desenvolvimento de hipertensão arterial. Desta forma, a sitagliptina parece ter tido um papel importante na diminuição dos valores de P.A. em todos os grupos diabéticos, eventualmente por uma diminuição das implicações a nível vascular e cardíaco associadas à doença. Provavelmente este efeito se deve aos níveis elevados de GLP-1, que exibem efeitos protectores a nível cardíaco em modelos animais (Baggio e Drucker, 2007) e, na verdade, os nossos resultados indicadores de trofismo cardíaco dos ratos diabéticos com sita, no tempo intermédio, se mostravam inferiores em relação ao grupo sem sita, o que nos permite dizer que a este tempo a sitagliptina consegue diminuir as perturbações a nível cardiovascular. Contudo, no tempo final, os grupos diabéticos não mostram diferenças entre si, o que poderá dever-se a uma grande falência da capacidade de compensação cardíaca e uma degradação funcional acentuada, que a sitagliptina é incapaz de corrigir, visto se tratar de uma fase mais avançada da diabetes.

O melhor controlo glicémico pela sitagliptina foi observado quando administrada apenas às 20 semanas, mostrando ser mais eficaz quando fornecida num estadio mais avançado da doença. Como confirmação destes resultados da glicemia, é somente neste tempo que a HbA1c demonstra valores inferiores aos dos ratos diabéticos sem fármaco. Contudo, verifica-se que a redução é ainda pequena, o que poderá dever-se ao curto espaço de tempo entre a administração de sitagliptina e a medição de HbA1c (entre a semana 20 e 26) ou a um efeito reduzido do fármaco, apesar da redução concludente de glicemia o desmentir. Apenas na semana 26 se verifica um novo aumento de glicose sérica neste grupo com sitagliptina a partir do T₁₂, o que deixa dúvidas se se trata de uma perturbação pontual ou de um efeito hipoglicémico muito transitório. Esta melhoria do perfil glicémico poderá ser consequência do aumento da acção da GLP-1 que, por sua vez, estimula a síntese de glicogénio, assim como a captação de glicose nos adipócitos e hepatócitos e diminui a produção hepática de glicose (Baggio e Drucker, 2007).

Também é no tempo final que se observa uma tentativa da sitagliptina em aumentar de forma moderada os níveis de insulina no grupo diabético sita T₁₂, vs grupo sem sita. Esta variação é concordante com a redução, uma vez mais modesta, da resistência à insulina neste grupo, avaliada pelo HOMA-IR. Este parâmetro registou uma diminuição no grupo diabético sita T₀ e o aumento no grupo ZDF (*fa/fa*) sita T₆, que estão associados a uma ligeira diminuição e a um aumento, respectivamente, dos níveis de insulina, quando comparados com o grupo (*fa/fa*) sem sita. Ainda assim, e até pelo perfil de insulina encontrado no tempo intermédio, sem variação em nenhum dos grupos (diabético sita T₀ e T₆), reforça a ideia já expressa de melhor efeito da sitagliptina quando administrada numa fase mais avançada da diabetes (20 semanas – sita T₁₂), uma vez que permite uma diminuição importante da glicemia, acompanhada de uma correcção, ainda que moderada, da HbA1c, da insulina e da resistência à insulina.

Ao nível do perfil lipídico observaram-se resultados positivos nos animais diabéticos. Relativamente ao colesterol-total, apesar de no tempo intermédio os grupos com sitagliptina não terem conseguido diminuir os seus níveis, no tempo final o grupo diabético sita T₀ foi o único onde se verificou uma diminuição dos valores de colesterol. Contudo, no tempo final, verificou-se que em todos os grupos diabéticos com sitagliptina, os níveis de TG eram inferiores aos do grupo sem sita. Este panorama já se faz sentir, no tempo intermédio, com a diminuição dos níveis no grupo (*fa/fa*) sita T₀. A sitagliptina não mostra qualquer efeito ao nível do col-HDL, o que deve ser interpretado com algumas cautelas, nomeadamente quando se pretende fazer uma extrapolação para o humano, uma vez que os ratos não possuem a enzima de transferência de ésteres de colesterol (CETP). No que diz respeito aos níveis de col-LDL, nos grupos diabéticos com sita T₀ e T₆ são inferiores ao seu grupo de comparação, no tempo final. Assim, a sitagliptina, principalmente quando administrada desde uma fase inicial da diabetes, mostra uma correcção da dislipidemia.

Em relação à função renal, a sitagliptina melhorou os níveis séricos de ureia, normalmente elevados em diabéticos, quando administrada numa fase de diabetes já instalada e avançada, ou seja às 20 semanas de idade. Apesar de não ser significativa, existe também uma tendência em diminuir no mesmo grupo (sita T₁₂) nos ratos controlo. Também em relação à creatinina, a sitagliptina parece ter tido um efeito positivo observado numa fase final do estudo. Recentemente, surgiu a hipótese de níveis baixos de creatinina séricos estarem relacionados com a perda de volume do músculo esquelético, grande alvo da insulino-resistência e produtor desta proteína e, conseqüentemente, com o risco de

diabetes tipo 2 (Harita e col, 2008). Assim, o mesmo parece acontecer no nosso estudo nos ratos diabéticos, sendo atenuado pela administração de sitagliptina, que promoveu um aumento dos níveis de creatinina.

A alfa-amilase é uma enzima envolvida na absorção de glicose pelo intestino, sendo maioritariamente sintetizada pelo pâncreas. Em situações de doença pancreática (como na pancreatite aguda) é normal encontrar valores aumentados desta enzima, o que não foi verificado nos ratos diabéticos. No entanto, níveis reduzidos de α -amilase são encontrados em obesos, o que poderá encontrar paralelismo com as variações observadas nos ratos diabéticos, *vs* controlo. Assim, a recuperação dos valores de α -amilase nos grupos (*fa/fa*) com sitagliptina, tanto no tempo intermédio (sita T₀ e T₆) como no final (sita T₆ e T₁₂), poderá ser demonstrativa de alguma eficácia do fármaco no que concerne à melhoria da função pancreática.

Entre os pacientes diabéticos, a incidência elevada de complicações vasculares está relacionada com anormalidades na função plaquetar (em resultado da elevada glicação), nos factores da coagulação e na actividade fibrinolítica (o PAI-1 tem sido cada vez mais implicado na patogénese da injúria vascular). Os níveis elevados de PAI-1 estão fortemente associados aos parâmetros da síndrome metabólica: índice de massa corporal elevado, aumento da gordura visceral, hipertensão arterial, hiperinsulinemia e dislipidemia (Juhan-Vague e col., 2003). Assim, os nossos estudos mostram que nos diabéticos a sitagliptina diminui a agregação plaquetar, principalmente nos grupos cuja administração de fármaco foi iniciada às 8 e 14 semanas de idade. Esta diminuição da função plaquetar estimulada pela sitagliptina é também verificada nos ratos controlo, reforçando a probabilidade da gliptina ter um efeito benéfico a este nível, e assim, a nível do risco cardiovascular.

Na avaliação do equilíbrio oxidativo em soro observámos que não existem alterações nos grupos com sitagliptina, em relação aos parâmetros avaliados (MDA, TAS e 3-NT). Assim, o aumento da formação das espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio observado nos diabéticos, *vs* controlos, resulta também num aumento dos níveis de antioxidantes. Contudo, os valores de stresse oxidativo determinado nos órgãos, no tempo final, mostram o grupo sita T₁₂ como o melhor momento para a diminuição da peroxidação lipídica, visto que os níveis de MDA em todos os órgãos avaliados se encontravam diminuídos, provavelmente em resultado dos baixos níveis de glicemia e da resistência à insulina, observada neste grupo. Os outros grupos ZDF (*fa/fa*) sita T₀ e T₆ não só não tiveram

efeitos idênticos aos do grupo sita T₁₂, como ainda agravaram os níveis de MDA, em alguns órgãos.

No perfil inflamatório, os níveis de adiponectina nos ratos diabéticos, *vs* os controlos, encontravam-se diminuídos nos dois tempos avaliados. A sitagliptina apenas demonstrou alterações benéficas no tempo intermédio, através do aumento dos níveis desta adipocitocina nos grupos diabéticos sita T₀ e T₆. Possivelmente devido ao aumento do dismetabolismo associado à doença, a sitagliptina no tempo final deixa de produzir este efeito.

Para além da adiponectina, foram também avaliadas citocinas pró-inflamatórias, encontrando-se sempre níveis séricos mais elevados nos ratos diabéticos. Desta forma, os níveis de TNF- α dos ratos diabéticos apresentaram-se superiores aos seus controlos durante todo o estudo. Neste parâmetro não se observaram muitas alterações significativas de relevo entre os grupos diabéticos com sitagliptina, sendo apenas de realçar a redução no tempo final para o grupo sita T₆, enquanto o grupo sita T₁₂ apresentou níveis aumentados, ao contrário do que seria eventualmente de esperar. Porém, com um perfil inverso ao TNF- α , a IL-1 β mostrou melhores resultados no grupo diabético sita T₁₂, quando se verificou uma tendência em diminuir os níveis desta citocina, e um agravamento no grupo sita T₆ por aumento dos valores. Na avaliação da IL-6, este agravamento do grupo diabético sita T₆ é também observado no tempo intermédio e final.

Como que acompanhando o agravamento progressivo da diabetes, a proteína de fase aguda (PCR) nos ratos diabéticos tende a aumentar ao logo do estudo. Enquanto no tempo intermédio (às 20 semanas) a sitagliptina não mostrou qualquer efeito, no tempo final (26 semanas) os três grupos diabéticos com sita (sita T₀, T₆ e T₁₂) apresentam uma diminuição desta proteína, mostrando alguma eficácia do fármaco numa fase de diabetes severa, relativamente a este parâmetro.

c) Resumo do efeito da sitagliptina nos três tempos em avaliação

Com o objectivo de estudar os três tempos de administração de sitagliptina e, conseqüentemente, avaliar o melhor efeito deste fármaco na prevenção e/ou regressão da DMT2, tentámos clarificar e simplificar todos os nossos resultados do tempo final, através da representação esquemática da tabela 17.

Tabela 17 – Representação dos parâmetros avaliados nos três grupos diabéticos com sitagliptina (ZDF (fa/fa) sita T₀, T₆ e T₁₂)), no tempo final.

Parâmetros avaliados	Início da administração de sitagliptina		
	T ₀ (8 semanas)	T ₆ (14 semanas)	T ₁₂ (20 semanas)
Massa corporal			
Pressão arterial			
Perfil glucídico	Com excepção do HOMA-IR - Melhoria		
Perfil lipídico		Com excepção do col- total sem alterações	Com excepção dos TG - Melhoria
Função renal	Com excepção da ureia - sem alterações	Com excepção da ureia - sem alterações	Com excepção da creatinina - sem alterações
Função pancreática	Com excepção do Ti - Melhoria		
Agregação plaquetar			
Stresse oxidativo			Com excepção no soro - sem alterações
Inflamação	Apenas na PCR e adiponectina (Ti)	Apenas na PCR, TNF-α e adiponectina (Ti)	Apenas na PCR, IL-1β, IL-6

Melhoria

Sem alterações

Agravamento

i) Sita T₀ (administração iniciada às 8 semanas)

A sitagliptina, quando administrada às 8 semanas de idade, ou seja, numa fase de Anomalia da Tolerância à Glicose (ATG), mostrou alguns efeitos positivos, não sendo, no entanto, o melhor perfil por nós estudado. Assim, este fármaco, quando introduzido desde a fase de hiperglicemia e hiperinsulinemia moderada, consegue diminuir a hipertensão e, pelo menos, até a uma fase de diabetes instalada (tempo intermédio) diminui também o peso do coração e ventrículo esquerdo, contribuindo para a diminuição do risco cardiovascular. Apesar da baixa insulino-resistência, como resultado dos níveis baixos de insulina, a administração a este tempo não mostra qualquer efeito que mereça algum destaque ao nível do perfil glucídico. No entanto, ao nível do perfil lipídico este tempo é, sem dúvida, o melhor, com baixos níveis de TG, col-total e col-LDL. Diminuindo o risco de perturbações ao nível vascular, este fármaco é também um bom anti-agregante plaquetar desde o tempo inicial.

Apenas até ao tempo intermédio (20 semanas), a sitagliptina aumentou os níveis de α -amilase, assim como os níveis de creatinina (numa fase final), demonstrando alguma melhoria na função pancreática e renal. Quanto aos restantes parâmetros avaliados, a sitagliptina não têm efeitos ao nível do stresse oxidativo, quando administrada desde a fase inicial, e no perfil inflamatório, apenas se observou um aumento dos níveis de adiponectina no tempo intermédio e diminuição da PCR no tempo final. Ou seja, quando uma diabetes avançada é alcançada e, conseqüentemente, uma grande desregulação metabólica, a sitagliptina deixa de ter efeito na enzima pancreática e nos níveis de adiponectina.

Desta forma, quando administrada desde uma fase pré-diabética a sitagliptina melhora, a longo prazo, o perfil lipídico, a hipertensão, a agregação plaquetar e o perfil inflamatório, apenas ao nível da PCR (T_f) e adiponectina (T_i).

ii) Sita T₆ (administração iniciada às 14 semanas)

Este grupo cuja administração do fármaco foi iniciada numa fase de hiperinsulinemia e hiperglicemia mais marcadas (às 14 semanas de idade), não mostrou qualquer alteração no perfil glucídico e ao nível do desequilíbrio oxidativo. Tal como o grupo sita T₀, também este tempo registou efeitos positivos no “combate” à hipertensão, na agregação plaquetar e na função pancreática. No perfil lipídico observou-se alguma melhoria, assim como no perfil inflamatório, principalmente na capacidade em diminuir os níveis de TNF- α e da PCR. Apesar de neste tempo também se observar uma diminuição da adiponectina, esta apenas se verifica no tempo intermédio.

Assim, a sitagliptina quando administrada numa fase ainda de pré-diabetes, mas já com elevada hiperglicemia, hiperinsulinemia e, eventualmente, intolerância à glicose com insulino-resistência moderada, consegue obter melhorias ao nível da pressão arterial, da agregação plaquetar, da função pancreática e alguns efeitos positivos no perfil lipídico e inflamatório.

iii) Sita T₁₂ (administração iniciada às 20 semanas)

A sitagliptina, quando administrada desde uma fase de insulinopenia relativa e, previsivelmente, disfunção das células β , ou seja, num estadio de diabetes já instalada, apresenta o melhor perfil na melhoria das principais perturbações metabólicas características da DMT2.

A sitagliptina iniciada a este tempo mantém o peso do diabético, impedindo a perda de peso na fase final, diminui bastante os níveis de glicose, para valores similares ao dos estadios iniciais, tentando uma homeostase a este nível, assim como a HbA1c (de forma mais moderada). Mais ainda, aumenta os níveis de insulina na fase da insulinopenia e diminui a insulino-resistência.

Relativamente ao perfil lipídico, apenas melhorou os níveis de TG. No que diz respeito à função renal e pancreática os resultados parecem ser melhores, com uma diminuição de ureia e aumento de α -amilase, respectivamente, e em sentido contrário ao encontrado na evolução da diabetes nestes animais. Também ao nível do risco

cardiovascular tem efeitos que merecem alguma evidência, como a diminuição da pressão arterial, apesar de não mostrar qualquer alteração na agregação plaquetar.

No stresse oxidativo tecidual, a sitagliptina quando administrada numa fase de diabetes instalada, parece ser capaz de resultados muito positivos, diminuindo bastante a peroxidação lipídica, em todos os órgãos avaliados. Na inflamação, este grupo diminui os níveis de PCR e mostra uma tendência para diminuir os valores de IL-1 β e IL-6.

Assim, este grupo para além de mostrar melhorias em muitos dos parâmetros avaliados conseguiu, principalmente, alcançar um bom controlo glicémico e uma diminuição da peroxidação lipídica nos órgãos avaliados, como o pâncreas.

d) Papel do controlo glucídico/lipídico na eficácia da terapêutica

Apesar do grande número de antidiabéticos disponíveis no mercado e, consequentemente, da variedade de mecanismos de acção, o objectivo principal passa sempre por obter um bom controlo glicémico. Deste modo, a sitagliptina é merecedora de alguma importância pois, para além de tentar obter um controlo glicémico, sem risco de hipoglicemia, parece ter também alguma participação na preservação das células β .

De forma sucinta, são basicamente os níveis plasmáticos de glicose e de AGL que, de diferentes formas, determinam o perfil pró-inflamatório e de desequilíbrio oxidativo encontrado na diabetes tipo 2 (Fig. 61).

A hiperglicemia é o principal motor da formação de espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio, assim como produtos avançados de glicação, que levam a um desequilíbrio oxidante/antioxidante. Este stresse oxidativo, para além de induzir lesões a nível celular, também promove a diminuição da translocação de glicose pelo GLUT4 nos órgãos periféricos, contribuindo desta forma para o aumento da IR.

Os níveis elevados de glicose têm também um papel importante no perfil inflamatório, por estimulação de algumas citocinas inflamatórias e inibição da função leucocitária, culminando muitas vezes na apoptose.

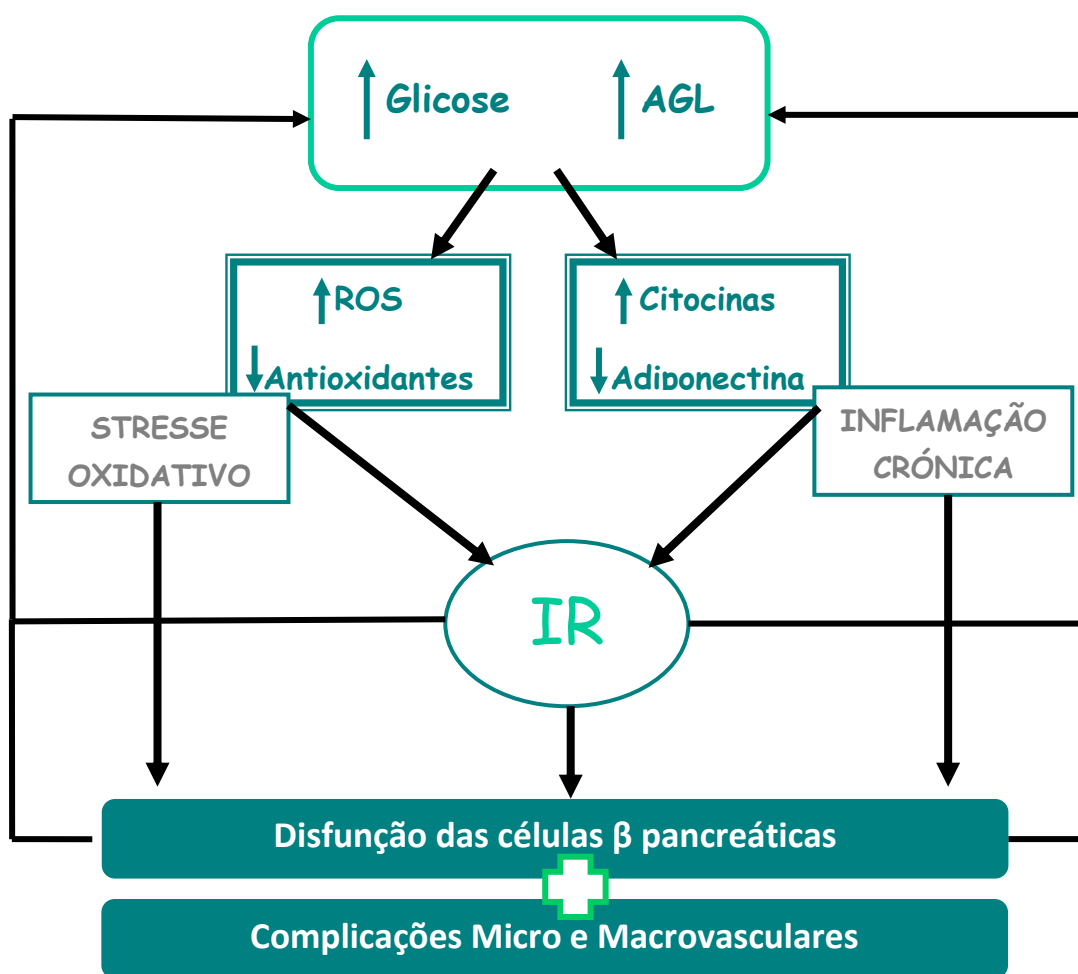


Figura 61 – Esquema representativo dos desequilíbrios associados à insulino-resistência e à hiperglicemia.

Porém, não é só o excesso de glicose leva ao stresse oxidativo, também o excesso de AGL, por aumento do gradiente de prótons na mitocôndria, estimula a produção de ROS. Este aumento dos AGL é uma consequência da hiperglicemia, da insulino-resistência e da elevada lipólise. Os AG originam um aumento da resistência à captação de glicose estimulada por insulina nos tecidos periféricos, assim como estimulam a invasão dos macrófagos no TA. Tanto os macrófagos como os adipócitos, nestas condições, libertam citocinas pró-inflamatórias que têm a capacidade de contribuir para o aumento de AGL, para o desenvolvimento de IR e da inflamação e, conseqüentemente, para a apoptose das células β. Adicionalmente, também a secreção da adiponectina, dotada de actividades anti-inflamatórias e anti-diabéticas, se encontra diminuída. Como a resposta inflamatória resulta

da activação da transcrição de NF-kB, e este se encontra envolvido nos mecanismos de dano oxidativo, encontra-se explicada a associação da inflamação ao stresse oxidativo.

Desta forma, torna-se clara a importância da glicemia no desenvolvimento da diabetes e das suas complicações. Neste contexto, um bom controlo dos níveis de glicose é fundamental para a prevenção ou melhoria do perfil inflamatório e do dano oxidativo. Com base nisto, podemos afirmar que a sitagliptina, numa fase de diabetes severa, parece ser mais eficiente no controlo glicémico e nos mecanismos associados, apesar de ainda não o suficiente. A enorme variedade e quantidade de desregulações metabólicas que os diferentes estadios da diabetes tipo 2 envolvem, ajuda a justificar a grande “divergência” dos nossos resultados. Contudo, mais estudos serão necessários para clarificar esta opção farmacológica, assim como a avaliação da eficácia de uma terapêutica combinada da sitagliptina com outros antidiabéticos, nomeadamente com metformina.

Parte VI

CONCLUSÕES

O trabalho realizado visou dois objectivos principais:

- 1- Caracterização do modelo de diabetes tipo 2 e sua evolução ao longo do tempo;
- 2- Avaliação do melhor momento para iniciar a terapêutica com sitagliptina, tendo em conta as 3 fases distintas da DMT2.

Estes objectivos foram perseguidos através de parâmetros de caracterização metabólica geral (perfil lipídico e glucídico), cardiovascular, de carácter inflamatório e de equilíbrio oxidativo.

1 - O modelo animal experimental ZDF (*fa/fa*) utilizado apresentou as seguintes alterações:

- a) Aumento progressivo do peso corporal e abdominal, com decréscimo após a semana 20;
- b) Desregulação do perfil glucídico:

As alterações do perfil glucídico são caracterizadas por algumas variações ao longo das semanas de estudo, que representam as diferentes fases da evolução da diabetes. Assim, este modelo às 8 semanas de idade apresentava uma hiperglicemia e uma hiperinsulinemia moderadas, com eventual intolerância à glicose e insulino-resistência ainda em fase inicial. Às 20 semanas caracterizava-se por uma insulinopenia relativa e hiperglicemia, que se foram acentuando até ao final do estudo (semana 26), com previsível agravamento da função das células β pancreáticas;

- c) Dislipidemia, expressa por níveis elevados de colesterol e TG;
- d) Hipertensão arterial;
- e) Alterações da função renal e pancreática;
- f) Aumento da lesão oxidativa;
- g) Desregulação do perfil inflamatório, com diminuição dos níveis de adiponectina (adipocitocina anti-inflamatória) e aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias;

2 - No que diz respeito à avaliação do efeito da sitagliptina verificou-se:

- a) Nenhum dos tempos de administração foi totalmente eficaz na prevenção da evolução da diabetes;
- b) A administração do fármaco nos tempos 0 e 6 semanas não corrigiu a glicemia tendo, no entanto, apresentado efeitos positivos no perfil lipídico e ao nível da hipertensão arterial e agregação plaquetar;
- c) A administração da sitagliptina no tempo 12 mostrou o melhor perfil glucídico, com correcção da glicemia, da HbA1c, dos níveis e da sensibilidade à insulina, e ainda ao nível do dano oxidativo, com diminuição da peroxidação lipídica em todos os órgãos avaliados.

Em suma, constata-se que a síndrome diabética observada no modelo experimental escolhido apresenta factores de risco cardiovascular, insulino-resistência e hiperglicemia progressiva, com consequente desenvolvimento de stresse oxidativo e de inflamação crónica.

A administração da sitagliptina a partir das 20 semanas, ou seja, a partir de uma fase muito mais agravada da doença, com uma insulinopenia relativa, com uma hiperglicemia bastante instalada e já com algumas perturbações associadas à diabetes, corrigiu o perfil glucídico e alguns mecanismos associados. Contudo, este fármaco mostrou algumas dificuldades em estabilizar alguns parâmetros avaliados, como o perfil glicémico. Neste contexto, são necessários mais estudos para clarificar as reais vantagens desta opção terapêutica, pondo a hipótese de uma terapia combinada com outros antihyperglicémicos, já existentes no mercado.

Parte VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agerso H** e col. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men. *Diabetologia* **1992**; 45:195–202.
- Ahren B**, Landin-Olsson M, Jansson P-A e col. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**; 89: 2078-84.
- Arner P**. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Endocrinol Metab* **2003**; 14:3.
- Aschner P** e col. A Multicenter Randomized, Double-Blind, Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Sitagliptin Monotherapy in Patients With Type 2 Diabetes Who Have Inadequate Glycemic Control: 24-week Study. *Diabetes Care* **2006**; 29:2632.
- Baggio LL e Drucker DJ**. Biology of incretins: GIP e GLP-1. *Gastroenterology* **2007**;132:2131–2157.
- Bailey CJ**. Treating insulin resistance in type 2 diabetes with metformin and thiazolidinediones. *Diabetes Obes Metab* **2005**;7:675–91.
- Barnett A**. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* **2006**; 60:1454–1470.
- Berg AH**, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **2002**; 13:84–9.
- Bornstein SR**, Abu-Asab M, Glasow A, Path G, Hauner H, Tsokos M e col. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* **2000**; 9(4):532–538.
- Brissova M**, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem* **2005**; 53:1087–1097.
- Brown JC**, Pederson RA. GI hormones and insulin secretion. *Endocrinology: Proc 5th Int Congr Endocrinol* **1976**; 2:568-570.
- Brown JC**. A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides. *Can J Biochem* **1971**; 49:255-261.
- Brown WV**, Clark Luther, Falko James M., Guyton John R, Rees Tomas J., Schonfeld Gustav, Lopes-Virella Maria F. Optimal management of lipids in diabetes and metabolic Syndrome. *Journal of Clinical Lipidology* **2008**; 2:335–342.
- Brownlee M**. the pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **2005**; 54(6): 1615-25.
- Brunner Yannick**, Schvartz Domitille, Priego-Capote Feliciano, Couté Yohann, Sanchez Jean-Charles. Glucotoxicity and pancreatic proteomics. *JOURNAL OF PROTEOMICS* **2009**; 71: 576–591.

- Buse JB** e col. Exenatide maintained glycemic control with associated weight reduction over three years in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **2007**; 56(1):73.
- Butler AE**, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in human with type 2 diabetes. *Diabetes* **2003**; 52:102–10.
- Cabrera O**, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet 461 cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**; 103, 2334–2339.
- Cefalu WT**, **Cannon Christopher P**. Atlas de risco cardiometabólico. *Euromédice* **2007**; Volume 1.
- Cefalu WT**. Pharmacotherapy for the Treatment of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Rationale and Specific Agents. *Nature* **2007**; 81:5.
- Chacra AR**. Efeito Fisiológico das incretinas. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine* **2006**; 6(7B): S613-S617.
- Charbonnel B**, Karasik A, Liu J e col. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. *Diabetes Care* **2006**; 29: 2638-2643.
- Combs TP**, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB e col.. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* **2002**; 143 (3): 998-1007.
- Creutzfeldt W**, Ebert R. The incretin concept. *Adv Metab Disord* **1988**; 11:333-67.
- Creutzfeldt W**. The [pre-] history of the incretin concept. *Regul Pept* **2005**; 128:87-91.
- Creutzfeldt W**. The incretin concept today. *Diabetologia* **1979**; 16:75-85
- Davies MJ**. Insulin secretagogues. *Curr Med Res Opin* **2002**; 18:22–30.
- Day C**. Metabolic syndrome, or what you will: Definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* **2007**; 4:32–38.
- De Koning EJP**, Bonner-Wei S, Rabelink TJ. Preservation of beta cell function by targeting beta cell mass. *Pharmacology in the Netherlands*. **2008**.
- Deacon CF**, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide-1 are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and healthy subjects. *Diabetes* **1995**; 44:1126–31.
- Diabetes Prevention Program Research Group**. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* **2002**; 346: 393–403.
- Dokken BB**, Saengsirisuwan V, KimJS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced

insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2007**; 294(3):E615–21.

Dolan PL, Boyd SG, Dohm GL. Effects of feeding acarbose on muscle glucose transport and GLUT4 protein in lean and obese diabetic rats. *J nutrit biochem* **1997**; 8:322-327.

Dominiczak MH. Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. Implications for laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* **2003**; 41:1266–1278.

Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* **2004**; 47:581–589.

Drucker DJ, Baggio LL. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **2007**; 132:2131-2157.

Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* **2006**; 368:1696-1705.

Drucker DJ. The Biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* **2006**; 3:153-165.

Drucker e col. Enhancing Incretin Action for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2003**; 26: 2929-2940.

Duarte R, Rodrigues E, Duarte J S, Duarte A, Ruas MMA. Recomendações da Sociedade Portuguesa de Diabetologia para o tratamento da hiperglicemia e factores de risco na Diabetes tipo

2. *Revista Portuguesa de Diabetes* **2007**; 2(4): 5-18.

Dyachok O, Idevall-Hagren O, Sagetorp J, Tian G, Wuttke A, Arriemerlou C, Akusjarvi G, Gylfe E, Tengholm A. Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion. *Cell Metab* **2008**; 8:26–37.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. **2005**; 365:1415-1428.

Eckel RH. Mechanisms of the components of the metabolic syndrome that predispose to diabetes and atherosclerotic CVD. *Proc Nutr Soc* **2007**; 66:82–95.

Efrati S, Berman S, Tov YS, Averbukh Z, Weissgarten J. Hyperglycemia alters renal cell responsiveness to pressure in a model of malignant hypertension. *J Hypertens* **2009**; 27(2):365-75.

Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A e col. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100(24):14211–14216.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* **2002**; 23:599–622.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grosky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* **2003**, 52(1):1-8.

- Evans JL**, Goldfine ID, Maddux BA, Grosky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr rev* **2002**; 23(5):599-622.
- Evans JL**, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* **2005**; 7(7-8):1040-52.
- Ford ES**, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* **2002**; 287: 356-9.
- Fulop T**, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie Biologie* **2006**; 54:375–386.
- Gallwitz B**, Betazellen. Insulin and incretins. *Diabetologie*. 2: R1, **2007**
- Gallwitz B**. New Therapeutic Strategies for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus Based on Incretins. *Diabetic Studies* **2005**; 2:61-69.
- Gallwitz B**. Sitagliptina, perfil de um nuevo inhibidor de la DPP-4 para el tratamiento de la diabetes tipo 2. *Drugs of today* **2007**; 43(1): 13-25.
- Geelhoed-Duijvestijn**. Incretins: a new treatment option for type 2 diabetes? *The Netherlands Journal of Medicine*. **2007**; 65:2.
- Gerstein HC**, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N e col. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet* **2006**; 368(9541):1096–1105.
- Getty L**, Hamilton-Wessler M, Ader M, Dea MK, Bergman RN. Biphasic insulin secretion during intravenous glucose tolerance test promotes optimal interstitial insulin profile. *Diabetes* **1999**; 47:1941–7.
- Gil-Campos M**, Canete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* **2004**; 23:963–74.
- Giles TD**, Sander GE. Pathophysiologic, diagnostic, and therapeutic aspects of the metabolic syndrome. *J Clin Hypertens* **2005**; 7:669–78.
- Gilon P**, Shepherd RM, Henquin JC. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} as evidences in single pancreatic islets. *J. Biol. Chem* **1993**; 268: 22265–22268.
- Ginsberg HN**. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* **2000**; 106:453 -8.
- Goodarzi M, Bryer-Ash M**. Metformin: Its role in the expanding pharmacopoeia of antidiabetic agents. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **2005**; 7:654-665.
- Gorogawa S**, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H e col. Probucol preserves pancreatic β -cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Prac* **2002**; 57:1–10.

- Grant SF**, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolesu R, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **2006**; 38:320–3.
- Green J**, Feinglos M. New combination treatments in the management of diabetes: focus on sitagliptin – metformin. *Vascular Health and Risk Management* **2008**; 4(4):743–751.
- Guyton JR**, Hall JE. Insulin, glucagon, and diabetes mellitus. *Textbook of Medical Physiology* **2006**; 961-977.
- Hanefeld M**, Ceriell A, Schwarz PE, Bornstein SR. The challenge of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* **2007**; 39(9):625–626.
- Harita N**, Hayashi T, Sato KK, Nakamura Y, Yoneda T, Endo G, Kambe H. Lower Serum Creatinine Is a New Risk Factor of Type 2 Diabetes. *Diabetes care* **2009**; 32(3):424-426.
- Herman GA**, Stein PP, Thornberry NA, Wagner JA. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin. *Clin Pharmacol Ther* **2007**; 81:761–767.
- Holman RR**. Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states. *Diabetes Res Clin Pract* **1998**; 40:S21– S25.
- Holst Jens J**, Deacon Carolyn F e col. Glucagon-like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes. *Trends in Molecular Medicine* **2008**; 14-4.
- Holst JJ**. Glucagon-like peptide-1, a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential. *Curr Med Chem* **1999**; 6:1005-1017.
- Höppener JWH**, Ahren B, Cornelis JM. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **2000**; 343:411–9.
- Hotamisligil GS**, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **1995**; 95:2409–15.
- Jacqueminet S**, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic β -cells to palmitate is dependent upon the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* **2000**; 49:532–536.
- Jain S**, Saraf S. Type 2 diabetes mellitus—Its global prevalence and therapeutic strategies. *Diab Met Syndr Clin Res Rev* **2008**; doi:10.1016/j.dsx.2008.04.01.
- Januvia** - RCM. Resumo das características do medicamento - Januvia. *Merck Sharp & Dohme Ltd.* **2007**.
- Jellinger PS**. Metabolic Consequences of Hyperglycemia and Insulin Resistance. *Clinical Cornerstone*. **2007**; 8(7):30-42.
- Juhan-Vague I**, Alessi M-C, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost* **2003**; 1:1575-9

- Kaneto H**, Xu G, Song K.-H, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC, Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function by provoking oxidative stress, *J Biol Chem* **2001**; 276: 31099–31104.
- Kaneto H**, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka T, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2006**; 38, 5-6: 782-793.
- Karaca M**, Magnan C, Kargar C. Functional pancreatic beta cell mass: Involvement in type 2 diabetes and therapeutic intervention. *Diabetes e metabolism* **2009**.
- Kenji N**, Taro K, Asako S, Kotoba O, Go F, Naoki K, Hideyo S, Yukio H, Tuli A, Davies Michael J, Stein PP. Efficacy and safety of sitagliptin monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes. *diabetes research and clinical practice*. **2008**. 79:291–298
- Korenblum W**, Barthel A, Licinio J, Wong ML, Wolf OT, Kirschbaum C e col. Elevated cortisol levels and increased rates of diabetes and mood symptoms in Soviet Union-born Jewish immigrants to Germany. *Mol Psychiatry* **2005**; 10(11):974–975.
- Kowluru RA**. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* **2003**; 52:818–23.
- La Barre J**. Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine. *Bull Acad R Med Belg* **1932**; 12:620-634.
- Lamounier-Zepter V**, Ehrhart-Bornstein M, Karczewski P, Haase H, Bornstein SR, Morano I. Human adipocytes attenuate cardiomyocyte contraction: characterization of an adipocyte-derived negative inotropic activity. *J FASEB* **2006**; 20(10):1653–1659.
- Lebovitz HE**, Melander A. Sulfonylureas: basic aspects and clinical uses. International Textbook of Diabetes Mellitus. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, editors. *John Wiley and Sons Ltd Ed* **1992**.
- Lee WN**, Bassilian S, Lim S, Boros LG. Loss of regulation of lipogenesis in the Zucker diabetic (ZDF) rat. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* **2000**; 279(2): E425-32.
- Lenhard JM**, Croom DK, Minnick DT. Reduced serum dipeptidyl peptidase-IV after metformin and pioglitazone treatments. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**; 324:92–97.
- LeRoith D, Grailova O**. Mouse models created to study the pathophysiology of type 2 diabetes. *Int Biochem Cell Biol* **2006**, 38(5-6):904-12.
- Liao R**, Carles M, Gwathmey JK. Animal models of cardiovascular disease for pharmacologic drug development and testing: appropriateness of comparison to the human disease state and pharmacotherapeutics. *Am j ther* **1997**; 4(4):149-58.

- Ling PR**, Mueller C, Smith RJ, Bistrian BR. Hyperglycemia induced by glucose infusion causes hepatic oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats. *Metabolism* **2003**; 52:868–74.
- Ling PR**, Smith RJ, Bistrian BR. Hyperglycemia enhances the cytokine production and oxidative responses to a low but not high dose of endotoxin in rats. *Crit Care Med* **2005**; 33(5):1084-9.
- Lund PK**. The discovery of glucagon-like peptide 1. *Regul Pept* **2005**; 128:93-96.
- Luzi L**, DeFronzo RA. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am J Physiol* **1989**; 257:241–6.
- Maeda N**, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K e col.. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* **2001**; 50(9):2094-9.
- Maedler K**, Sergeev P, Ehnes JA, Mathe Z, Bosco D, Berney T, Dayer JM, Reinecke M, Halban PA, Donath MY. Leptin modulates beta-cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101:8138–8143.
- Mannucci E**, Pierzazuoli E, Ognibene A, et al. Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. **2001**;24:489–94.
- Marchesini G**, Forlani G. NASH:from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology* **2002**; 35(2):497-9.
- Marchetti P**, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regulatory Peptides* **2008**; 146:4-11.
- Masiello P**. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta cell mass. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**; 38(5-6): 873-93.
- Mathews DR**, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**; 28 (7):412-9.
- Matsuda M**, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N e col. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* **2002**; 277:37487–91.
- Matsuoka T**, Kajimoto Y, Watada H, Kaneto H, Kishimoto M, Umayahara Y, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest* **1997**; 99:144–150.
- Matsuoka T**, Kajimoto Y, Wataka H, Kaneto H, Kishimoto M, Umayahara Y, et al. Glycation-dependent, reactive oxygen-species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest* **1997**; 99:144–50.

- McIntosh CHS.** Incretin-based Therapies for Type 2 Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes* **2008**; 32(2): 131-139.
- McIntyre N,** Holdsworth CD, Turner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* **1964**; 2:20-1.
- Meier JJ.** Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? *Diabetologia* **2008**; 51(5):703-713.
- Miller Shannon A,** St. Onge Erin L. Sitagliptin: A dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *The annals of pharmacotherapy* **2006**; 40:1336-43.
- Miranda PJ,** DeFronzo Ralph A, Califf RM. Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* **2005**; 149:33-45.
- Mlinar B,** Janja M, Andrej J, Marija P. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta* **2007**; 375:20-35
- Mlinar B,** Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta* **2007**; 375(1-2):20-35.
- Mokdad AH,** Ford ES, Bowman RA e col. Diabetes trends in the US: 1990-1998. *Diabetes Care* **2000**; 23:1278.
- Moller D,** cohen O, Yamaguchi Y, Assiz R, Grigorescu F, Eberle A e col. Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* **1994**; 43(2):247-55.
- Nathan DM** e col. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care* **2006**; 29:1963-1972.
- Nathan DM,** Buse JB, Davidson MB. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetologia* **2009**; 52:17-30.
- Nathanson D,** Nystrom T. Hypoglycemic pharmacological treatment of type 2 diabetes: Targeting the endothelium. *Molecular e cellular endocrinology* **2009**; 297:112-126.
- Nauck MA** e col. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, compared with the sulfonylurea, glipizide, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin alone: a randomized, double-blind, noninferiority trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **2007**; 9(2): 194-205.
- Nauck MA,** Baller B, Meier JJ. Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes* **2004**; 53:190-6.
- Nauck MA,** Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **1993**; 91:301-307.
- Nauck M,** Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt w. Reduced incretin effect in type 2 (non- insulin-

- dependent) diabetes. *Diabetologia* **1986**; 29: 46-52.
- O’Rahilly S**, Turner RC, Matthews DR. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* **1988**;318:1225–30.
- Otero M**, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS* **2005**; 479:295–301.
- Penforinis A**, Borot S, Raccach D. Therapeutic approach of type 2 diabetes mellitus with GLP-1 based therapies. *Diabetes & Metabolism* **2008**; 34:S78-S90.
- Peterson J**, Bihain BE, Bengtsson-Olivecrona G, Deckelbaun RJ, Carpentier YA, Olivecrona T. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between metabolism and lipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**; 87(3): 909-13.
- Phillips JD**, Kinikini DV, Yu Y e col. Differential regulation of IRP1 and IRP2 by nitric oxide in rat hepatoma cells. *Blood* **1996**; 87(7): 2983-92.
- Phillips MS**, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ e col. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat genet* **1996**; 13(1):18-9.
- Pick A**, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky K. Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetes fatty rats. *Diabetes* **1998**; 47:358–364.
- Polonsky KS**, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, e col. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **1988**; 318:1231–9.
- Postic C**, Leturque A, Rencurel F, Printz RL e col. The effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on GLUT4 and hexokinase II mRNA and protein in rat skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes* **1993**; 42(6):922-929.
- Prado CL**, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**; 2924–2929.
- Punyadeera C**, Zorenc AH, Koopman R, McAinch AJ, Smith E, Manders R e col. The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. *Eur J Endocrinol* **2005**, 152(3):427-36.
- Ranganath LR**, Beety JM, Morgon LM e col. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence. *Gut* **1996**; 38:46-52.
- Ranganath R**. The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med* **2008**; 46(1):43–56.
- Ratzmann KP**, Schulz B, Heinke P, Michaelis D. Quantitative and qualitative changes in the early insulin response to glucose in subjects with

impaired carbohydrate tolerance. *Diabetes Care* **1981**; 4:85–91.

Reichard P, Nilsson BY, Rosenqvist U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* **1993**; 329(5):304–309.

Robertson RP. Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr opin phamrcol* **2006**; 6(6):615-9.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol* **2006**; 64:355–365.

Rosenstock J e col. Inhaled insulin improves glycemic control when substituted for or added to oral combination therapy in type 2 diabetes: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **2005**; 143:549–558.

Rosenstock J, Brazg R, Andryuk PJ e col. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing pioglitazone therapy in patients with Type 2 diabetes: a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study. *Clin Ther* **2006**; 28: 1556-1568.

Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N e col. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **1998**; 47:1562–9.

Sango K, Saito H, Takano M, Tokashiki A, Inoue S, Horie H. Cultured Adult Animal

Neurons and Schwann Cells Give Us New Insights into Diabetic Neuropathy. *Current Diabetes Reviews* **2006**; 2(2): 169-183(15).

Schwarz PE, Gruhl U, Bornstein SR, Landgraf R, Hall M, Tuomilehto J. The European perspective on diabetes prevention: development and Implementation of A European Guideline and training standards for diabetes prevention (IMAGE). *Diab Vasc Dis Res* **2007**; 4(4):353–357.

Seino S, Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* **2005**; 85:1303-1342.

Sesti Giorgio. Pathophysiology of insulin resistance. *Endocrinol metab.* **2006**.; 20(4):665-679.

Shafir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Am NY Acad Sci* **1999**; 892:223-46.

Sheehan MT. Current therapeutic options in type 2 diabetes mellitus: a practical approach. *Clin Med Res* **2003**; 1:189–200.

Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger R. Fatty acid-induced β cell apoptosis: A link between obesity and diabetes, *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95:2498–2502.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J clin invest* **2000**; 106:171–176

Stein PP e col. Sitagliptin, a selective DPP-4 inhibitor, is well tolerated in patients with T2DM:

pooled analysis of 5141 patients in clinical trials for up to 2 years. *Diabetes* **2007**; 56:A142-A143.

Stephens Jeffrey W, Khanolkar Manish P., Bain Stephen C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **2009**; 202:321-329.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA e col. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* **2000**; 321: 405-12.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **2005**; 365: 1333-46.

Teixeira e Lemos E. O papel do exercício físico regular no stresse oxidativo e inflamação da diabetes mellitus tipo 2. Coimbra. **2008**.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* **2001**; 344: 1343-50.

Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. Progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). *JAMA* **1999**; 281:2005-12.

UK Prospective Diabetes Study Group. UK Prospective Diabetes Study 16. Overview of 6 years therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes* **1995**; 44:1249-58.

UKPDS. Intensive bloodglucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* **1998**; 352:837-853.

Ulgen F, Scherbaum WA, Partke HJ, Bornstein SR, Schinner S. Intrapancreatic adipocyte deposition in a mouse model of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* **2008**; 40(7):507-509.

Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: Genetic and clinical implications. *Diabetes* **1995**; 44:863-870.

Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH e col. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* **2005**; 28:154-163.

Vesterhus M, Haldorsen IS, Raeder H, Molven A, Njølstad PR. Reduced pancreatic volume in hepatocyte nuclear factor 1A-maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* **2008**; 93(9):3505-9.

Virally M, Blicklé JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism* **2007**; 33:231-244.

Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular

mechanisms of insulin resistance. *J clin invest* **1999**; 103(7):931-43.

Wajchenberg BL. beta-Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment. *Endocrine Reviews* **2007**; 28(2):187–218.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **2004**; 27:1047–53.

Yache D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nat Med* **2006**; 12(1):62–66.

Zerilli T, Pyon EY. Sitagliptin Phosphate: A DPP-4 Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *clinthera* **2007**; 29:12.