



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O impacto da idade na resposta contráctil do íleo isolado de rato à metformina: comparação com um modelo animal de Diabetes *Mellitus* Tipo 2

Ana Mafalda Almeida

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O impacto da idade na resposta contráctil do íleo isolado de rato à metformina: comparação com um modelo animal de Diabetes *Mellitus* Tipo 2

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Silva Santos (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Ângelo Tomé (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Ana Mafalda Almeida

2014

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

If the facts don't fit the theory, change the facts.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Sónia Silva Santos por me ter aceitado no seu laboratório ainda em 2012 na altura do projeto de Licenciatura e por me ter proposto continuação do trabalho em Mestrado. Agradeço-lhe todos os conhecimentos e ensinamentos que me transmitiu ao longo destes últimos 2 anos e também a sua orientação ao longo deste trabalho assim como toda a confiança depositada em mim.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes Ribeiro, Diretor do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, o meu muito obrigada pela oportunidade de participar neste projeto de investigação e por me terem sido proporcionadas todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Professor Doutor Ângelo Tomé pela orientação interna deste trabalho mas também por todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo da Licenciatura enquanto meu professor.

Agradeço ainda ao Professor Doutor Frederico Pereira pelo anticorpo fornecido assim como todo o apoio técnico-científico. Agradeço ainda à Professora Doutora Rosa Fernandes por também me ter facultado apoio técnico-científico.

Deixo também uma palavra de agradecimento à Professora Doutora Raquel Seica e ao Doutor Paulo Matafome do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua colaboração neste trabalho, ao cederem material biológico respeitante aos animais *Goto-Kakizaki*.

Quero igualmente agradecer à Professora Doutora Olga Borges por me ter permitido trabalhar no seu laboratório e aprender com as suas alunas, Sandra, Filipa, Edna e Ana. Um agradecimento especial à Sandra Jesus por ter tido a paciência e o tempo para me ensinar, assim como pelas vezes em que se sentou comigo e procurou ajudar-me nas minhas dúvidas. Foi uma ajuda essencial no meu trabalho, a ela o meu muito obrigado!

À Professora Doutora Lina Carvalho do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra agradeço o tempo despendido com este trabalho, assim como às técnicas Teresa Ferreira e Ana Filipa Ladeirinha, esta última por me ter ensinado e ajudado no laboratório.

Não posso deixar de agradecer também às minhas colegas do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Teresa, Ana Clara, Raquel, Sara e Daniela, por todos os momentos divertidos durante as horas de almoço, os cafés, as ajudas no laboratório, as trocas de

ideias, tudo isto foi muito importante durante este último ano. À Inês Pita e à Catarina deixo um agradecimento especial pela amizade e por todas as vezes em que ouviram os meus desabafos e me procuraram ajudar no laboratório quando tudo parecia correr mal. Sem vocês tudo teria sido mais difícil...

Às minhas amigas do coração, Joana, Diana, Tatiana, Inês Simões, Inês Sebastião, Marina, Guida, Tânia e Raquel, por estes anos, por todos os jantares, noitadas, saídas, conversas. Por tudo! Sem vocês Coimbra não tinha tido a mesma piada. Às minhas amigas de sempre (e do coração também), Rita Meireles e Ana Cláudia, pela amizade e por estarem sempre cá. Apesar da distância, o vosso apoio significa muito. À Luísa também agradeço a amizade ao longo destes anos. Obrigada por fazeres parte da minha vida.

A todos os meus colegas de curso, pela amizade e todos os bons momentos, principalmente ao Ricardo, por ter sido a primeira pessoa que conheci em Bioquímica.

Ao Pedro, por todo o apoio e amor incondicionais.

À Isabel e ao Manel, nem tenho palavras que consigam exprimir o meu agradecimento. Agradeço-lhes por tudo, por terem tido um papel tão ativo nestes anos tão importantes da minha vida; com certeza que sem eles, a minha vida em Coimbra teria sido completamente diferente.

À minha família, por estarem sempre lá. Aos meus pais e irmã, pois sem eles, não seria o que sou hoje. Um muito, muito obrigada.

A quem mencionei e a quem posso eventualmente ter-me esquecido de o fazer, um muito obrigado!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 DIABETES MELLITUS	3
1.1.1 Caracterização geral da patologia	3
1.1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2	3
1.1.2.1 Mecanismos moleculares associados à Diabetes Mellitus Tipo 2	5
1.1.3 Terapêutica farmacológica associada à Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2	10
1.2 METFORMINA	12
1.2.1 Caracterização geral da metformina	12
1.2.2 Mecanismos de ação da metformina	14
1.2.2.1 A metformina e a atividade da AMPK	14
1.2.2.2 A metformina e o seu efeito antihiperlicémico	15
1.2.3 Efeitos adversos associados à Metformina: Sintomas gastrointestinais	18
1.2.3.1 Diarreia Diabética e Diarreia Não Diabética	19
1.3 O SISTEMA GASTROINTESTINAL	24
1.3.1 Estrutura da parede intestinal	24
1.3.2 Movimentos de contração a nível intestinal	26
1.3.3 Regulação da motilidade intestinal	28
1.3.3.1 A Acetilcolina e o Sistema Gastrointestinal	30
1.3.3.2 A Serotonina no Sistema Gastrointestinal	32
1.3.3.2.1 As Células Enterocromafins	34
1.4 O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO: IMPACTO NO INTESTINO	36
1.4.1 O Envelhecimento e as perturbações gastrointestinais	37

1.5	OBJETIVOS DO TRABALHO	39
CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS		41
2.1.	ANIMAIS.....	43
2.1.1.	Recolha de amostras.....	44
2.2.	ESTUDOS FUNCIONAIS	44
2.2.1.	Isolamento e montagem do órgão	44
2.2.2.	Protocolo experimental	45
2.2.3.	Tratamento dos dados e análise estatística	46
2.2.4.	Reagentes e fármacos utilizados nos estudos funcionais	47
2.3.	TÉCNICAS DE HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	47
2.4.	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO ÍLEO DE RATO	48
2.5.	ELISA - <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>	49
2.5.1.	Tratamento dos dados e análise estatística	49
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS		51
3.1.	RESPOSTA CONTRÁCTIL À METFORMINA DO ÍLEO DE RATO COM UM ANO DE IDADE..	53
3.1.1.	Caracterização farmacológica da metformina em íleo de rato <i>Wistar</i> com um ano de idade	53
3.1.2.	Ação da reserpina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato <i>Wistar</i> com um ano de idade	53
3.1.3.	Ação da ritanserina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato <i>Wistar</i> com um ano de idade	54
3.1.4.	Caracterização farmacológica da metformina em íleo de rato GK com um ano de idade.....	55
3.1.5.	Ação da reserpina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato GK com um ano de idade	56
3.1.6.	Ação da ritanserina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato GK com um ano de idade	57
3.2.	RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO <i>WISTAR</i> E GK À METFORMINA: IMPACTO DA PATOLOGIA E DA IDADE	58
3.3.	RESPOSTA CONTRÁCTIL À 5-HT DO ÍLEO DE RATO COM UM ANO DE IDADE.....	60

3.3.1. Caracterização farmacológica da 5-HT em íleo de rato <i>Wistar</i> com um ano de idade	61
3.3.2. Ação da ritanserina na resposta contráctil à 5-HT do íleo de rato <i>Wistar</i> com um ano de idade	61
3.3.3. Caracterização farmacológica da 5-HT em íleo de rato GK com um ano de idade	62
3.3.4. Ação da ritanserina na resposta contráctil à 5-HT do íleo de rato GK com um ano de idade	63
3.4. RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO DE RATO <i>WISTAR</i> E GK À 5-HT: IMPACTO DA PATOLOGIA E DA IDADE	64
3.5. ESTUDOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO <i>WISTAR</i> E GK.....	66
3.6. NÍVEIS DE TNF- α EM ÍLEO DE RATO <i>WISTAR</i> E GK	68
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO	71
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	81
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ABREVIATURAS

$\Delta\phi$	Gradiente de prótons
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxiindolacético
5-HT	5-Hidroxitriptamina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina Difosfato
AGJ	Anomalia da Glicemia em Jejum
AGL	Ácidos Gordos livres
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Proteína cinase ativada por AMP)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATG	Anomalia da Tolerância à Glucose
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca²⁺	Ião Cálcio
CCK	Colecistocinina
ChAT	Colina Acetiltransferase
CIC	Células Intersticiais de <i>Cajal</i>
Cl⁻	Ião Cloreto
Cu⁺	Ião Cobre
DAB	Diaminobenzidina
DHE	Dihidroxietídeo
DMT1	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1
DMT2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
EGTA	Etilenoglicol ácido tetracético

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GI	Gastrointestinal
GLUTs	<i>Glucose Transporters</i>
HbA_{1c}	Concentração de hemoglobina glicosilada 1c
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Sintetase do óxido nítrico induzida
IPANs	Neurónios Aferentes Primários Intrínsecos
K⁺	Ião Potássio
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
mAChR	Recetores muscarínicos acetilcolinérgicos
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MAO_A	Monoamina Oxidase A
MATE	Complexo de extrusão tóxico e multifármaco
MLCK	Cinase das cadeias leves da miosina
Na⁺	Ião Sódio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Monóxido de azoto)
OCT	Transportador catiónico orgânico
Pi	Fosfato Inorgânico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Cinase
pK_a	Constante de dissociação ácida

PMAT	Transportador de monoaminas da membrana plasmática
PtGIP	Prova de tolerância à glucose intraperitoneal
PtGO	Prova de tolerância à glucose oral
RBP4	<i>Retinol-binding protein-4</i>
RI	Resistência à Insulina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SDS	Sódio dodecil sulfato
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i>
SERT	Transportador dependente de Na ⁺ /Cl ⁻
SGLT-1	Transportador de glucose do tipo 1 dependente de Na ⁺
SI	Sistema Imunitário
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPs	<i>Single-Nucleotide Polymorphisms</i>
SREBP-1	<i>Sterol-regulatory element-binding protein-1</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
TpH	Triptofano Hidroxilase
VACHT	Transportador vesicular de Acetilcolina
VIP	Péptido Intestinal Vasoativo
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VMAT1	Transportador de monoaminas vesiculares 1
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organização Mundial de Saúde
Wnt	<i>Wingless-related integrated site</i>

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Disfunção nos adipócitos como um mecanismo de ligação da obesidade à RI. Adaptado de Soumaya (2013). 9
- Figura 2.** Estruturas químicas da Fenformina (à esquerda) e Metformina (à direita). . 12
- Figura 3.** Ações da metformina (AG = Ácidos Gordos; ↑ = aumento; ↓ = diminuição). Adaptado de Krentz and Bailey (2005)..... 17
- Figura 4.** Camadas do trato GI. Adaptada de Fox (2011). 25

CAPÍTULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 5.** Segmentos de íleo montados em banhos de órgãos de 15 ml. 45
- Figura 6.** Representação de uma curva Concentração-Resposta (CR) de adições independentes à metformina..... 46

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS

- Figura 7.** Resposta contráctil do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 µM de reserpina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 54
- Figura 8.** Resposta contráctil do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de ritanserina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 55
- Figura 9.** Resposta contráctil do íleo de rato GK com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 µM de reserpina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 57
- Figura 10.** Resposta contráctil do íleo de rato GK com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de ritanserina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A

significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 58

Figura 11. Resposta contráctil do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de ritanserina (◆); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 62

Figura 12. Resposta contráctil do íleo de rato GK com 1 ano de idade à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de ritanserina (◆); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 64

Figura 13. Técnica de imunohistoquímica no íleo isolado de rato. Os seis painéis (A, X40; B, X200; C, X100; D, X100; E, X100; F, X400) referem-se a secções com imunoreactividade à proteína S100 β (a castanho). A, B e C, rato *Wistar* com 3 meses de idade; D, E e F, rato *Wistar* com 1 ano de idade. Células S100 β positivas em placas de *Peyer* (1), na lâmina própria da mucosa (2), células ganglionares do plexo submucoso (3) e mientérico (4), e células musculares lisas (5). 67

Figura 14. Técnica de imunohistoquímica no íleo isolado de rato. Os seis painéis (G, X200; H, X200; I, X400; J, X40; K, X400; L, X400) referem-se a secções com imunoreactividade à proteína S100 β (a castanho). G, H e I, rato GK com 3 meses de idade; J, K e L, rato GK com 1 ano de idade. Células S100 β positivas em placas de *Peyer* (1), na lâmina própria da mucosa (2), células ganglionares do plexo submucoso (3) e mientérico (4), e células musculares lisas (5). 68

Figura 15. Níveis de TNF- α (pg/ μ g de proteína) no íleo de rato. W3m, rato *Wistar* com 3 meses de idade; GK3m, rato GK com 3 meses de idade; W1A, rato *Wistar* com 1 ano de idade; GK1A, rato GK com 1 ano de idade. Todos os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M. do número de experiências (n) indicado. As barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ *Wistar* 1 ano vs GK 1 ano. 69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Tabela I. Diagnóstico da Diabetes *Mellitus* e testes realizados..... 5

CAPÍTULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Tabela II. Grupos de animais utilizados no trabalho experimental. 44

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS

Tabela III. Respostas contrácteis à metformina do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade..... 53

Tabela IV. Respostas contrácteis à metformina do íleo de rato GK com 1 ano de idade. 56

Tabela V. Respostas contrácteis à metformina do íleo de ratos *Wistar* e GK com 3 meses de idade. Retirado de Henriques (2011). 59

Tabela VI. Respostas contrácteis à metformina do íleo de ratos *Wistar* e GK com 1 ano de idade..... 59

Tabela VII. Impacto da idade na potência e eficácia da metformina em animais *Wistar*. 60

Tabela VIII. Impacto da idade na potência e eficácia da metformina em animais GK. 60

Tabela IX. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade .61

Tabela X. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de rato GK com 1 ano de idade..... 63

Tabela XI. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de ratos *Wistar* e GK com 3 meses de idade. Retirado de Henriques (2011). 65

Tabela XII. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de ratos *Wistar* e GK com 1 ano de idade..... 65

Tabela XIII. Impacto da idade na atividade intrínseca e potência da 5-HT exógena em animais *Wistar*. 65

Tabela XIV. Impacto da idade na atividade intrínseca e potência da 5-HT exógena em animais GK. 66

Tabela XV. Imunomarcção à proteína S100 β no íleo de rato isolado. 67

RESUMO

A Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DMT2) é uma patologia grave que afeta um elevado número de indivíduos da população mundial, estimando-se que seja responsável por 4.6 milhões de mortes por ano, sendo a idade um dos principais fatores de risco. No seu tratamento são usados fármacos antidiabéticos orais, sendo a metformina o fármaco de primeira linha em indivíduos diabéticos obesos, mas igualmente eficaz em indivíduos diabéticos não-obesos pela melhoria da resistência à insulina e do perfil lipídico. A diarreia é um dos efeitos gastrointestinais adversos associados ao tratamento com metformina (diarreia não diabética), mas sabe-se que esta também está associada *per si* à patologia (diarreia diabética). Pensa-se que tal facto está relacionado com o envelhecimento dos indivíduos e não apenas com a patologia em si. Desta forma, foi objetivo deste trabalho estudar qual o papel do envelhecimento na contração intestinal induzida pela metformina em ratos *Wistar* controlo e em ratos *Goto-Kakizaki* (GK), um modelo animal de DMT2 não-obeso, em duas idades diferentes, 3 meses e 1 ano de idade.

Segmentos de íleo de rato foram isolados e preparados para a realização de estudos funcionais de contração isométrica. Foram executadas duas curvas concentração-resposta (CR) (não cumulativas) de metformina (1-36 μ M) e de 5-HT (0,1-60 μ M), na presença ou na ausência de reserpina (100 μ M), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, e de ritanserina (1 μ M), um antagonista não-seletivo dos recetores 5-HT₂. Em todas as experiências foram utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionou apenas os solventes apropriados para cada fármaco. Segmentos de íleo foram ainda utilizados em cortes histológicos e técnicas de imunohistoquímica, nas quais se utilizou o anticorpo contra a proteína S100 β , um marcador de inflamação intestinal enteroglia. Foram ainda quantificados os níveis de TNF- α no íleo de rato através da técnica de ELISA.

Tanto a metformina como a 5-HT, testadas em concentrações terapêuticas, induziram contrações dependentes da concentração no íleo de ratos *Wistar* controlos (metformina: $E_{m\acute{a}x}$ 7,49 \pm 0,66 mN, n=27; pEC₅₀ 5,50 \pm 0,31, n=17; 5-HT: $E_{m\acute{a}x}$ 6,73 \pm 1,25 mN, n=19; pEC₅₀ 5,88 \pm 0,18, n=16) e GK diabéticos (metformina: $E_{m\acute{a}x}$ 12,28 \pm 1,67 mN, n=15; pEC₅₀ 5,00 \pm 0,12, n=12; 5-HT: $E_{m\acute{a}x}$ 11,11 \pm 2,43 mN, n=8; pEC₅₀ 6,17 \pm 0,20, n=7).

O facto de na presença da patologia se observar uma maior contractilidade intestinal em resposta à metformina em ratos GK com 1 ano comparativamente com os GK de 3 meses, verificando-se exatamente o oposto nos animais controlo, sugere que a uma diarreia não diabética sucede-se, com a idade, uma diarreia diabética. Mais

ainda, na presença da patologia, verificou-se que ocorre um comprometimento do efeito da 5-HT libertada pelas células EC em recetores 5-HT₂, responsáveis por mediar a resposta contráctil intestinal induzida pela metformina. Tal foi demonstrado com a não alteração da curva CR à metformina pela ritanserina, facto esse mais uma vez não observado nos animais controlo.

Dado que foi igualmente observado o comprometimento da via serotoninérgica com a idade, a denominada diarreia diabética, traduzida pelo aumento da contractilidade intestinal à metformina e à 5-HT exógena em ratos GK com 1 ano de idade, terá que ter subjacente outros mecanismos que não os envolvendo recetores 5-HT₂, nomeadamente fenómenos inflamatórios associados à idade ou associados à Diabetes.

De facto, verificaram-se níveis elevados de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, no íleo dos *Wistar* controlo envelhecidos. Estes estão em concordância com o estado pró-inflamatório que ocorre durante o processo de envelhecimento. Já a imunomarcção para a proteína S100 β no tecido linfoide associado à mucosa (MALT) foi mais acentuada nos animais GK, o que sugere uma diarreia de características inflamatórias em animais diabéticos.

Em conclusão, os resultados obtidos permitem inferir que, com o envelhecimento, a diarreia que se possa declarar na sequência da toma de metformina, não se deve a um aumento da contractilidade intestinal induzida pelo fármaco em si, como demonstrado nos animais diabéticos adultos, uma vez que se verifica um comprometimento da via serotoninérgica com a idade, mas será mais uma diarreia que terá subjacente um processo inflamatório decorrente da idade ou da patologia em si.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus* Tipo 2, Metformina, Diarreia, Envelhecimento, 5-HT, Inflamação.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes *Mellitus* (T2DM) is a major problem affecting a high number of the world's population. This disease is responsible for at least 4.6 million deaths per year and the age of the individuals is one of the major risk factors associated to it. Metformin, an oral antidiabetic agent recommended as the first-line oral therapy for T2DM, is prescribed to obese patients but has also shown efficacy in non-obese ones, as it improves insulin resistance and lipidic profile. Diarrhoea is one of the adverse gastrointestinal complications associated to metformin independent of the pathological status (non-diabetic diarrhoea) but it is also known as part of the symptomatology of the disease (diabetic diarrhoea). This might be associated with the ageing of the patients and not only with the disease itself. Hence, the main goal of this work was to study the impact of age in the metformin-induced intestinal contraction in Wistar control rats and in Goto-Kakizaki (GK) ones, a non-obese T2DM animal model, at two different ages: 3 months old and 1 year old.

Ileum segments were isolated and prepared for functional studies of isometric contraction. Two concentration-response (CR) curves (not cumulative) were performed with metformin (1-36 μM) and 5-HT (0.1-60 μM), in the presence or absence of reserpine (100 μM), a vesicular monoamine transporter inhibitor, and ritanserin (1 μM), a non-selective antagonist of 5-HT₂ receptors. In each assay, control segments were used with the appropriate solvent of the drug. Ileum segments were also used for histological section and immunohistochemical techniques using the antibody against S100 β protein, an enteroglial intestinal inflammation marker. TNF- α levels present in the rats' ileum were also quantified by ELISA.

Both metformin and 5-HT, used in therapeutic concentrations, induced concentration-dependent contractions in Wistar (metformin: $E_{\text{m}\text{ax}}$ 7,49 \pm 0,66 mN, n=27; pEC₅₀ 5,50 \pm 0,31, n=17; 5-HT: $E_{\text{m}\text{ax}}$ 6,73 \pm 1,25 mN, n=19; pEC₅₀ 5,88 \pm 0,18, n=16) and GK (metformin: $E_{\text{m}\text{ax}}$ 12,28 \pm 1,67 mN, n=15; pEC₅₀ 5,00 \pm 0,12, n=12; 5-HT: $E_{\text{m}\text{ax}}$ 11,11 \pm 2,43 mN, n=8; pEC₅₀ 6,17 \pm 0,20, n=7) rats' ileum.

In the presence of the disease, a greater intestinal contractility in response to metformin was observed in 1 year old GK rats, in comparison with 3 month old GK ones. The opposite was verified in the controls' group. This suggests that, after a non-diabetic diarrhoea, a diabetic one appears. Also, in a diabetic state, 5-HT release by enterochromaffin cells in 5-HT₂ receptors, responsible for mediating the intestinal contraction induced by metformin, is affected. This was demonstrated as ritanserin did not alter the CR curve induced by metformin, which was also not seen in control animals.

Since we verified that 5-HT signalling is affected by age, the so-called diabetic diarrhoea, in which there is greater intestinal contractility to metformin and exogenous 5-HT in 1 year old GK rats, this might happen by other mechanisms not involving 5-HT₂ receptors, namely inflammatory processes associated to ageing or to Diabetes.

We also observed high levels of TNF- α , a pro-inflammatory cytokine, in the aged Wistar rats' ileum. These results are in accordance with the pro-inflammatory state that happens during ageing. Concerning the S100 β immunohistochemical expression in the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), it was higher in GK animals, suggesting that in diabetic animals an inflammatory diarrhoea is present.

In conclusion, these results show us that with the ageing of the animals, the diarrhoea presented by them is not due to the greater intestinal contractility induced by metformin's administration, as seen in 1 year old diabetic animals. As 5-HT signalling has been shown to be affected by age, the diarrhoea might be associated to an inflammatory process due to ageing or Diabetes.

Keywords: Type 2 Diabetes *Mellitus*, Metformin, Diarrhoea, Ageing, 5-HT, Inflammation.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 DIABETES *MELLITUS*

1.1.1 Caracterização geral da patologia

A Diabetes é caracterizada por hiperglicémia devido ao facto de não existirem quantidades suficientes de insulina que consigam responder às necessidades do indivíduo (Ashcroft and Rorsman, 2012). É uma patologia heterogénea que apresenta diversas etiologias, entre as quais se encontram a Diabetes Gestacional, a Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DMT1) e a Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DMT2), sendo estas duas últimas as formas mais comuns. Na DMT1 ocorre uma ausência completa da secreção de insulina, embora aquando do seu diagnóstico, os doentes de DMT1 ainda apresentem cerca de 10-20% das suas células β pancreáticas funcionais (Suen and Burn, 2012). No caso da DMT2, esta é caracterizada por uma resposta à insulina defeituosa e/ou uma disfunção das células β pancreáticas.

De acordo com dados da Federação Internacional da Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF) do ano de 2012, estima-se que na população mundial 371 milhões de indivíduos sejam afetados pela Diabetes; porém, a 50% deste número de indivíduos não foi diagnosticada a mesma. Sabe-se também que o número de pessoas afetadas pela doença se encontra em constante aumento em todos os países do mundo; a sua prevalência é bastante elevada na América do Norte, assim como no Médio Oriente e Norte de África. A presença desta patologia eleva o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas, enfartes e complicações microvasculares, nomeadamente cegueira, falência renal e neuropatia periférica (Ashcroft and Rorsman, 2012).

1.1.2 Diabetes *Mellitus* Tipo 2

A DMT2 consiste numa doença crónica que se caracteriza pela produção, por parte das células β dos ilhéus de *Langerhans* do pâncreas, de insulina em quantidades insuficientes, sendo que o organismo pode também apresentar incapacidade de utilizar eficazmente a insulina produzida. Sendo a insulina um das hormonas responsáveis por regular os níveis de glucose, tal patologia resulta num aumento dos níveis sanguíneos de glucose (hiperglicémia) bem como perturbações a nível metabólico, refletindo-se no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Com a evolução da patologia, verificam-se danos severos nos diversos sistemas do organismo, com especial destaque para os nervos e vasos sanguíneos.

A DMT2 está associada a fatores e estilos de vida de risco que podem ser alterados, tais como a obesidade e excesso de peso, inatividade física, sedentarismo, tabagismo, níveis elevados de triglicérides, baixos níveis de colesterol HDL (*High Density Lipoprotein*), hipertensão, inflamação e condições do ambiente intrauterino; mas também está associada a outros fatores não passíveis de alteração, como a idade, sexo, etnia, história familiar de DMT2, história de Diabetes Gestacional e síndrome do ovário policístico (Chen et al., 2012). É de salientar que 80% dos casos de DMT2 estão associados à obesidade e estilos de vida de carácter sedentário (Venables and Jeukendrup, 2009).

A DMT2 mostra ser a patologia mais preocupante e a que atinge a maior parte da população nas diferentes faixas etárias. É caracterizada por uma desordem metabólica que resulta de complexas interações entre múltiplos fatores e é caracterizada por dois defeitos principais: secreção diminuída de insulina a nível pancreático e resistência à ação da insulina (RI) em vários tecidos-alvo (músculo esquelético, fígado e tecido adiposo), que compromete a captação da glucose. A RI pode ser classificada como uma resposta à insulina suprimida ou tardia, ou seja, é verificada uma diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo. Esta é geralmente do tipo pós-recetor insulínico, na via de transdução do sinal, não envolvendo o processo de produção desta hormona (Lin and Sun, 2010). O mecanismo molecular preciso da insulinoresistência não é ainda claramente entendido, contudo, pensa-se que os défices nas vias de sinalização intracelular do recetor da insulina possam desempenhar um papel importante (Surampudi et al., 2009). À RI está associada uma componente genética, potenciada por fatores ambientais, como obesidade, envelhecimento, hiperglicémia e *stress* oxidativo, podendo também ser causada por gravidez (Evans, 2007). Este fenómeno leva a uma produção em excesso de glucose por parte do fígado (gluconeogénese compensatória), apesar de se verificar hiperinsulinémia e hiperglicémia durante o jejum, levando também a uma diminuição da *clearance* da glucose em tecidos periféricos.

O risco de desenvolver DMT2 é de 7% na população em geral, cerca de 40% no caso de filhos de pai com DMT2, e aproximadamente 70% se os dois progenitores tiverem a patologia (Majithia and Florez, 2009). Nos últimos anos foram identificados mais de 40 genes associados ao elevado risco de desenvolver DMT2, a partir da análise de polimorfismos num único nucleótido (SNPs) em regiões não codificantes dos genes em estudos de *linkage* e de associação do genoma (Ashcroft and Rorsman, 2012). O mecanismo pelo qual os genes identificados levam à predisposição para a DMT2 não se encontra esclarecido, mas sabe-se que tais genes estão envolvidos na função das células β pancreáticas, no seu desenvolvimento e na regulação da sua massa

(Bonfond et al., 2010, McCarthy, 2010). Por exemplo, o gene FTO conduz à predisposição para a obesidade, conduzindo indiretamente à DMT2. O gene mais importante na suscetibilidade para a diabetes é o TCF7L2, que está envolvido na sinalização Wnt (*Wingless-related integration site*), sendo que também foi reportado que influencia a secreção de insulina (Lyssenko et al., 2007, Kirkpatrick et al., 2010). Contudo, ainda é necessário um maior entendimento no que diz respeito à compreensão dos papéis funcionais da maioria destes genes assim como a sua contribuição para a DMT2.

O diagnóstico da Diabetes *Mellitus* é realizado de acordo com as recomendações da WHO de 1999 (WHOECOMMITTEE, 1999), através da prova de tolerância oral à glucose (PtGO) que permite quantificar a concentração de glucose plasmática em jejum e/ou 2 horas após ingestão de 75 g de glucose. Após a determinação dos níveis de glucose, estes são comparados com valores estipulados, permitindo desta forma o diagnóstico da doença (Tabela I). Para além dos estados classificados de normal e diabético, existem outros tipos de valores referidos em relação a perturbações na homeostasia da glucose, sendo estes a anomalia da tolerância à glucose (ATG) e a anomalia da glicemia em jejum (AGJ). Tais denominações dizem respeito a um estado metabólico intermédio entre o início e o estabelecimento propriamente dito da Diabetes e implicam anomalias na regulação da glucose após uma refeição, o denominado estado pós-prandial, e em jejum, respetivamente.

Tabela I. Diagnóstico da Diabetes *Mellitus* e testes realizados.

Condição	Teste	
	Glicémia em jejum	PtGO após 2 h
Normal	< 100 mg/dl	< 140 mg/dl
Anomalia da glicemia em jejum	100-125 mg/dl	-
Anomalia da tolerância à glucose	-	140-199 mg/dl
Diabetes	≥ 126 mg/dl	≥ 200 mg/dl

1.1.2.1 Mecanismos moleculares associados à Diabetes Mellitus Tipo 2

A insulina é uma hormona sintetizada pelo pâncreas, nas células β dos ilhéus de *Langerhans*. É sintetizada na forma de pré-pró-insulina, que migra para o complexo de *Golgi*, onde sofre clivagem e origina insulina e peptídeo C. Esta hormona desempenha um papel chave na regulação da produção de glucose sanguínea (Stumvoll et al., 2005).

É também responsável por estimular o crescimento e diferenciação celular, sendo que também promove o armazenamento de hidratos de carbono, lípidos e proteínas no tecido adiposo, fígado e músculo ao estimular a lipogénese, síntese de glicogénio e proteínas, e inibindo a lipólise, glicogenólise e proteólise (Saltiel and Kahn, 2001). O recetor da insulina humano, pertencente à subfamília de recetores do tipo tirosina cinase, é um heterodímero composto por duas subunidades α extracelulares e por duas subunidades β transmembranares, ligadas por pontes dissulfito (White and Kahn, 1994). As suas subunidades apresentam comportamento de enzimas alostéricas, no qual a subunidade α inibe a atividade de tirosina cinase da subunidade β .

A ação da insulina envolve uma série de cascatas de sinalização, que resultam em diferentes respostas celulares, iniciadas pela ligação da insulina ao seu recetor, levando à autofosforilação do mesmo, consequência da ativação da sua atividade tirosina cinase e conduzindo à fosforilação de resíduos de tirosina dos substratos para o recetor da insulina (IRSs). De entre as diversas vias incluídas, a via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) revelou desempenhar um papel chave nas cascatas de sinalização da insulina, na medida em que é essencial para os efeitos metabólicos da mesma e captação (*uptake*) da glucose pelos tecidos periféricos por translocação dos transportadores de glucose tipo 4 (*Glucose Transporters Type 4*, GLUT4) para as membranas citoplasmáticas (Soumaya, 2013).

Em indivíduos normais, e excetuando os períodos pós-prandiais, os níveis de glucose plasmática podem variar entre 4 e 7 mM. O balanço existente entre a absorção de glucose a partir do intestino, a produção pelo fígado, o *uptake* e a metabolização por parte dos tecidos periféricos, permite controlar e manter tais níveis entre os valores mencionados (Saltiel and Kahn, 2001). As moléculas de glucose entram nas células por difusão facilitada mediada por transportadores de glucose, os GLUTs. Vários GLUTs foram descritos na literatura, e sabe-se que tanto no músculo esquelético como no tecido adiposo, o GLUT1 é responsável por mediar o transporte de glucose basal, ao passo que o GLUT4 é responsável pelo *uptake* de glucose mediado por insulina. A insulina aumenta o *uptake* de glucose em células musculares e do tecido adiposo ao estimular a translocação do transportador de glucose GLUT4 de zonas intracelulares para a superfície da célula (Saltiel and Kahn, 2001). No caso das células β pancreáticas, a glucose plasmática é transportada pelos GLUT2 não insulino-dependentes (Surampudi et al., 2009, Lin and Sun, 2010).

As células β pancreáticas são capazes de detetar níveis aumentados de glucose plasmática pós-prandial e libertar insulina. Assim, níveis elevados de glucose conduzem à entrada nas células β de glucose através dos GLUT2 potenciando a via glicolítica assim como o ciclo dos ácidos tricarbóxicos, levando a um aumento do rácio adenosina

trifosfato (ATP)/adenosina difosfato (ADP). O aumento do rácio ATP/ADP leva ao fecho dos canais de potássio (K^+) hiperpolarizadores sensíveis a ATP (K_{ATP}), o que conduz à despolarização da membrana celular. A despolarização da membrana abre canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes da voltagem, gerando potenciais de ação e mediando o influxo de iões Ca^{2+} extracelulares. Por conseguinte, a insulina é exocitada dos grânulos onde se encontra armazenada (Rutter and Hodson, 2013). A secreção da insulina é, portanto, um processo dependente do metabolismo da glucose. Este é também modulado por hormonas e neurotransmissores, sendo estes responsáveis por influenciar o processo de libertação de insulina dos grânulos sem que os níveis de cálcio intracelulares aumentem (Ashcroft and Rorsman, 2012). Mais ainda, a insulina é também interveniente na conversão de glucose em glicogénio, para armazenamento nas células do músculo esquelético e fígado.

O organismo liberta insulina das células β pancreáticas de forma a manter uma condição de normoglicémia, nos estados de jejum e pós-prandial. No entanto, na DMT2, verifica-se que o organismo é incapaz de manter esta condição pois face à RI desencadeia-se um mecanismo compensatório de secreção de insulina, paralelamente a um aumento da produção endógena de glucose hepática (gluconeogénese). A hiperinsulinémia, particularmente nos estados iniciais, que ocorre simultaneamente com a hiperglicémia, acabará por condicionar a RI uma vez que leva a uma *downregulation* dos recetores de insulina periféricos. Por outro lado, e face a uma demanda exacerbada de insulina e a glucotoxicidade, as células β pancreáticas começam a acusar exaustão e acaba por se instalar uma hiperinsulinémia por disfunção das mesmas (Stumvoll et al., 2005, Cnop, 2008, Surampudi et al., 2009). A produção de glucose endógena encontra-se acelerada em indivíduos com DMT2 mas também em indivíduos com AGJ (Stumvoll et al., 2005). A RI pode ser devida a uma deficiência na via de sinalização da insulina a diversos níveis. No ser humano, a RI pode estar associada a mutações na proteína IRS-1 (Soumaya, 2013). Esta condição está fortemente associada à obesidade, onde o *uptake* de ácidos gordos para o tecido adiposo é bastante díspar da oxidação dos mesmos, tal resultando numa acumulação excessiva de triacilgliceróis e metabolitos de ácidos gordos neste órgão (Venables and Jeukendrup, 2009), e ao sedentarismo.

O tecido adiposo desempenha um papel fundamental no controlo da homeostasia da glucose no organismo, tanto em situações normais como em situações patológicas, pelo que desempenha um papel relevante na RI. As suas células, os adipócitos, tanto periféricos como viscerais, são responsáveis pela secreção de diversos fatores, entre os quais se encontram as citocinas inflamatórias (como, o fator de necrose tumoral- α , TNF- α , e a interleucina-6, IL-6), as adipoquinas (como a adiponectina, resistina, leptina, visfatina e *retinol-binding protein-4*, RBP4) e os ácidos gordos livres (AGL) do plasma.

Em relação às citocinas inflamatórias, o TNF- α potencia a lipólise nos adipócitos e, ao fosforilar o IRS-1 nos resíduos de serina, previne a interação deste substrato com a subunidade β do recetor de insulina, interrompendo a via de sinalização da insulina; no que diz respeito à IL-6, esta é conhecida por induzir a produção a nível hepático de proteína C reativa, mas também se encontra envolvida nos fenómenos de RI e complicações a si associadas, pois encontra-se altamente expressa no tecido adiposo, correlacionando-se positivamente com a obesidade no ser humano. Verifica-se uma forte interação entre esta citocina e as vias de sinalização de insulina, conduzindo à inibição do seu sinal; tal poderá envolver a ativação da proteína tirosina fosfatase ou então poderá ocorrer por interação entre as proteínas supressoras da sinalização das citocinas (*suppressor of cytokine signaling*, SOCS) e o recetor da insulina (Bastard et al., 2006, Kwon and Pessin, 2013). As adipoquinas, por sua vez, são hormonas responsáveis por influenciar o metabolismo e gastos energéticos. No caso particular da adiponectina, os seus níveis encontram-se diminuídos em indivíduos com DMT2 e/ou obesos, e a sua concentração no tecido adiposo visceral encontra-se diminuída, levando à redução dos efeitos da insulina tanto no fígado como no músculo. A proteína cinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*, AMPK) intervém na sinalização da adiponectina, sendo esta uma enzima sinalizadora ativada em situações de défice energético e que se encontra associada a diversas respostas metabólicas como a supressão da gluconeogénese hepática, *uptake* de glucose pelo músculo esquelético em situações de exercício, oxidação de ácidos gordos e inibição do processo de lipólise.

Os AGL, em excesso, contribuem para a estimulação do processo de gluconeogénese no fígado, levando a RI hepática, por inibição do sistema de transdução de sinal da insulina, e a um decréscimo da *clearance* de glucose a nível periférico, devido a efeitos inibitórios no metabolismo da glucose e na ação da própria insulina (Stumvoll et al., 2005, Surampudi et al., 2009). O tecido adiposo, bem como os macrófagos aí presentes, promovem inflamação e diminuem a sensibilidade à insulina. Em situações de obesidade, verifica-se infiltração de macrófagos no tecido adiposo, pelo que a atividade inflamatória relacionada com os macrófagos pode contribuir para a patogénese da insulinoresistência induzida por esta condição ao haver libertação de TNF- α , por exemplo, pelos macrófagos residentes neste tecido (Wellen, 2005, Bastard et al., 2006, Luca and Olefsky, 2006).

É importante ainda referir que um grande número de doentes com DMT2 são não-obesos, sendo estes oriundos dos continentes Europeu e Asiático. Nestes casos, o fenótipo da DMT2 caracteriza-se por uma redução desproporcionada da secreção de insulina e por uma menor RI, quando em comparação com a DMT2 em obesos. Para além disto, a função das células β pancreáticas encontra-se ainda mais comprometida

na DMT2 de não-obesos em comparação com o que se verifica na DMT2 de obesos (Vaag and Lund, 2007).

Diversos mecanismos envolvidos na patogénese da DMT2 podem induzir fenómenos apoptóticos nas células β pancreáticas assim como provocar a redução da sua massa, comprometendo a função de compensação para a RI (Rhodes, 2005). Estes mecanismos são vários, destacando-se o *stress* oxidativo no retículo endoplasmático, hiperglicémia crónica, hiperlipidémia crónica e presença de citocinas inflamatórias.

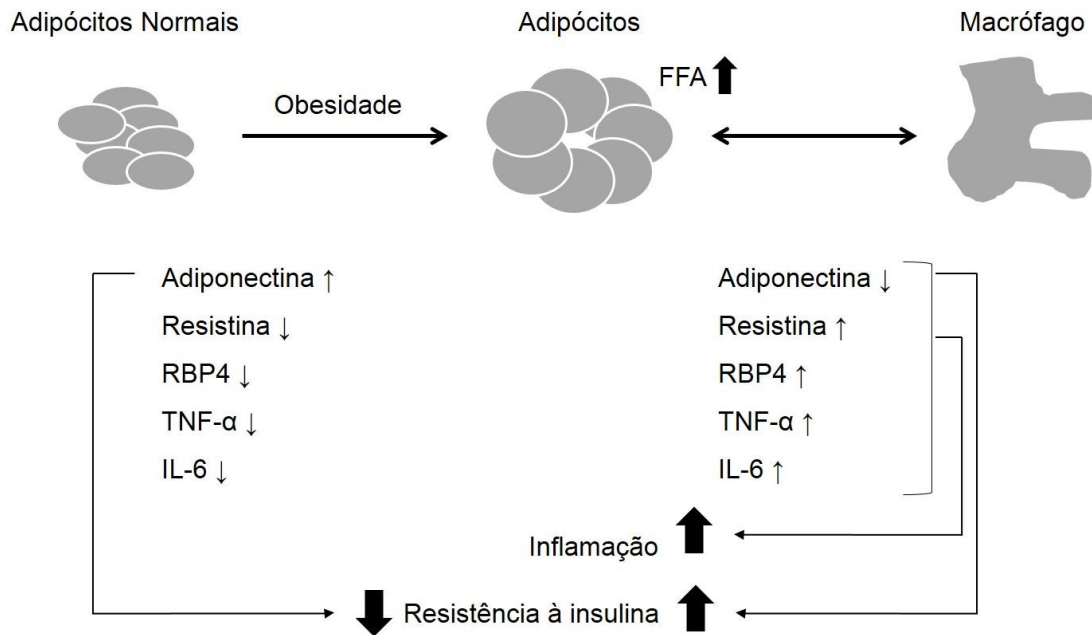


Figura 1. Disfunção nos adipócitos como um mecanismo de ligação da obesidade à RI. Adaptado de Soumaya (2013).

Em todos os sistemas biológicos aeróbicos são geradas continuamente espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS); estão incluídos neste grupo o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Sob condições fisiológicas normais, um aumento da quantidade destas moléculas oxidantes reativas não conduz necessariamente a *stress* oxidativo, sendo este aumento contrabalançado pela própria atividade antioxidante endógena do organismo. Contudo, a produção em excesso deste tipo de moléculas assim como uma reduzida capacidade em eliminá-las, pode conduzir a *stress* oxidativo, a uma desregulação da sinalização intracelular, podendo mesmo culminar numa situação patológica como é o caso da RI (Evans, 2007). Foi documentado que as ROS e a insulina se encontram relacionadas pois elevadas concentrações (na ordem do milimolar) de H_2O_2 ativam as vias de sinalização da insulina e/ou induzem as suas ações metabólicas mais comuns. A

ativação da cascata de sinalização da insulina deve-se à fosforilação de um resíduo de tirosina da cadeia β do recetor para a insulina de uma forma independente da insulina, o que sugere que o H_2O_2 utiliza exatamente a mesma via que a insulina (Bashan et al., 2009).

Uma vez que a RI pode originar períodos de hiperglicémia, tal fenómeno pode conduzir a deterioração da sensibilidade à insulina em determinados tecidos, como é o caso do endotélio vascular, músculo e adipócitos (Furukawa et al., 2004, Lin et al., 2005). Em condições de Diabetes, a hiperglicémia crónica pode levar à produção de grandes quantidades de ROS responsáveis pela progressiva disfunção das células β pancreáticas. Estas últimas são bastante sensíveis às ROS devido ao facto de apresentarem baixa quantidade de enzimas com poder antioxidante, como é o caso da catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase (Robertson et al., 2003, Evans, 2007).

1.1.3 Terapêutica farmacológica associada à Diabetes *Mellitus* Tipo 2

Na escolha da terapêutica farmacológica mais adequada para a DMT2 é necessário ter em atenção as complicações associadas à patologia que eventualmente poderão surgir a longo prazo. Aquando do diagnóstico, a maioria dos doentes apresenta excesso de peso ou até mesmo obesidade, pelo que será difícil manter um estado perto da normoglicémia apenas com alterações no estilo de vida (Krentz and Bailey, 2005).

Numa abordagem inicial, e uma vez que a RI desempenha um papel fulcral na patogénese da DMT2, esta deverá incidir na melhoria da sensibilidade à insulina ao nível dos tecidos. Desta forma, deverá ser feito um controlo a nível metabólico, que incluam alterações no estilo de vida do doente. Uma destas alterações passa pela realização de exercício físico moderado que, para além de ajudar na perda de peso, leva a melhorias na sensibilidade à insulina, a um aumento dos níveis de colesterol HDL em circulação, a uma diminuição dos níveis de triglicédeos e também à normalização da pressão sanguínea arterial. Estes efeitos são altamente benéficos, levando também a uma melhoria dos parâmetros associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Os fármacos antidiabéticos orais devem, numa primeira fase, serem tomados em baixas doses e ajustados posteriormente de acordo com a resposta glicémica, avaliada através da medição da concentração de hemoglobina glicosilada A_{1c} (HbA_{1c}), cujo valor se deve encontrar entre 6,5 e 7,0%, podendo ser suplementada nalguns casos com a monitorização dos níveis de glucose dos capilares sanguíneos (Krentz and Bailey,

2005). No entanto, é de realçar que o tratamento não pode ser apenas direcionado para a redução de HbA_{1c}, mas também deve incidir noutros pontos, como a preservação da capacidade antioxidante e anti-inflamatória do organismo (Teixeira-Lemos et al., 2011).

Atualmente os tradicionalmente denominados antidiabéticos orais mais utilizados subdividem-se em sensibilizadores da insulina e insulinossecretores. Do grupo dos sensibilizadores de insulina temos a classe das biguanidas (metformina) e as glitazonas (pioglitazona). Do grupo dos insulinossecretores temos as sulfonilureias de segunda geração (glibenclamida, glipizida, gliclazida), as meglitinidas (nateglinida) e as incretinas (*glucagon-like peptide-1*, GLP-1, e *glucose-dependent insulintropic peptide*, GIP), nomeadamente os inibidores da dipeptidil-peptidase-4 (sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina), enzima metabolizadora das incretinas e os agonistas do GLP-1 (Katzung et al., 2012).

1.2 METFORMINA

1.2.1 Caracterização geral da metformina

A metformina (1,1-dimetilbiguanida) é um fármaco antidiabético oral pertencente à classe das biguanidas. Esta classe de fármacos antidiabéticos atua diretamente sobre a RI, pelo que são designados de fármacos sensibilizadores de insulina. Quimicamente, as biguanidas são compostas por dois anéis guanidina ligados entre si (Hundal and Inzucchi, 2003, Krentz and Bailey, 2005). As duas principais biguanidas, a metformina e a fenformina, foram colocadas no mercado nos anos 50. No entanto, 20 anos mais tarde, a fenformina foi retirada do mercado por ter sido reportada a sua associação a um risco elevado de acidose láctica (Misbin, 1977). Deste modo, a metformina tornou-se na principal biguanida utilizada a nível global, tendo sido aprovada nos anos 70 na Europa, e em 1995 nos E.U.A. pela FDA (*Food and Drug Administration*). Tornou-se o fármaco antihiperlipicémico mais prescrito nos E.U.A e o segundo na Europa, sendo que, a nível mundial, mais de 100 milhões de indivíduos tomam metformina anualmente (Rena et al., 2013). Pode ser prescrita isoladamente ou então associada a insulina ou a outro fármaco antidiabético, como é o caso das sulfonilureias, das tiazolidinedionas, dos inibidores da α -glucosidase, dos inibidores da DPP-4 e dos agonistas do GLP-1. Atualmente, no mercado, os nomes comerciais que se encontram disponíveis são os seguintes: Risidon® 850 mg e 1000 mg, Glucophage® 500 mg e Stagid® 700 mg, encontrando-se também disponíveis inúmeros genéricos de diferentes dosagens e formas farmacêuticas (INFARMED, 2012).

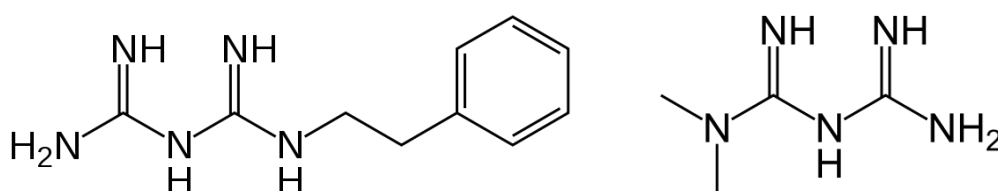


Figura 2. Estruturas químicas da Fenformina (à esquerda) e Metformina (à direita).

A metformina é um fármaco antihiperlipicémico altamente eficaz que funciona independentemente do pâncreas, não utilizando insulina. A sua principal função consiste na supressão da produção de glucose hepática, através da redução da gluconeogénese (Gong et al., 2012). Contudo, esta não é a sua única ação pois é também responsável por exercer uma variedade de efeitos a nível metabólico: diminui também o *output* de glucose hepática através da inibição da glicogenólise, pode

umentar a utilização periférica de glicose, leva à diminuição dos AGL do plasma e apresenta efeitos benéficos a nível cardiovascular, podendo prevenir complicações vasculares (Stumvoll et al., 2005, Bailey, 2008). Como não estimula a secreção de insulina, não conduz a situações de hipoglicémia e como reduz a produção de glicose endógena, não conduz a hiperglicémia em jejum, efeitos secundários associados à toma de outros fármacos antidiabéticos (Gong et al., 2012). É geralmente prescrita a doentes com excesso de peso ou obesos, pois um dos seus efeitos é o de não promover o ganho de peso. A sua eficácia também se verifica em doentes com peso normal que não apresentem hiperglicémia severa e que não necessitem de insulina (Bailey, 2008). Em indivíduos hiperlipidémicos, o tratamento com metformina encontra-se associado a uma redução da concentração de triglicédeos no plasma, acompanhado, por norma, de uma redução no colesterol LDL (*Low density lipoprotein*) e VLDL (*Very low density lipoprotein*) (Bailey, 2008).

A metformina apresenta valores da constante de dissociação ácida (pK_a) de 2,8 e 11,5, pelo que, a pH fisiológico, existe em larga escala na sua forma catiónica de carácter hidrofílico. Porém, apresenta baixa lipofilia pelo que é bastante improvável que consiga atravessar as membranas celulares por difusão passiva (Graham et al., 2011), para além de não possuir a capacidade de se ligar às proteínas do plasma. Com um tempo de meia-vida entre 1,5 e 3 horas, é rapidamente absorvida, não sendo metabolizada, pelo que não interfere com a atividade de outros fármacos que possam ter sido co-administrados, acabando por ser excretada através da urina ainda na forma de composto ativo, após um período de 5 horas. Sabe-se que cerca de 90% da dose absorvida é eliminada num período de tempo de 12 horas (Bailey et al., 1996). É de salientar que é de extrema importância que a metformina seja apenas prescrita a indivíduos cuja função renal não esteja comprometida pois a acumulação do fármaco (Krentz and Bailey, 2005) levaria a uma acidose láctica, por inibição da piruvato desidrogenase, e provocaria uma conseqüente acumulação de ácido láctico, via alternativa de utilização do piruvato. É amplamente distribuída pelo organismo, utilizando os transportadores orgânicos catiónicos no fígado, nos rins e no intestino (Gong et al., 2012), ficando retida em elevadas concentrações nas paredes do trato gastrointestinal (GI). A farmacocinética deste fármaco é em grande parte determinada pelo transporte ativo realizado pelos transportadores catiónicos ao longo do epitélio intestinal, no qual a metformina é seu substrato. A determinação das taxas de absorção é realizada pelo transportador de monoaminas da membrana plasmática (PMAT) e pelo transportador catiónico orgânico 3 (OCT3); o transporte da metformina para os hepatócitos é da responsabilidade do transportador OCT1, e dos hepatócitos para a biliar, o transporte é realizado pelo complexo de extrusão tóxico e multifármaco 1

(MATE1); numa fase final, o transporte para as células do epitélio tubular renal é conduzido pelo transportador OCT2 e para o túbulo renal pelo MATE2 (Proctor et al., 2008, Rena et al., 2013).

A metformina deve ser tomada com as refeições ou imediatamente antes das mesmas com o objetivo de minimizar possíveis efeitos GI que possam advir da sua toma. O tratamento deve ser iniciado com 500 ou 850 mg diariamente, e a dosagem deve ser aumentada progressivamente até se conseguir atingir o controlo glicémico pretendido, não devendo ser excedidos 3 g por dia. A metformina é contraindicada na doença hepática e renal, na insuficiência cardíaca ou respiratória, em situações de hipóxia, infeções severas, história de acidose láctica, hipersensibilidade à metformina, gravidez e lactação. É necessário despistar logo à partida a disfunção renal em indivíduos com idade superior a 80 anos, indivíduos com enfarte agudo do miocárdio, situações de abuso de álcool, uso de agentes de contraste radiográficos intravenosos e procedimentos cirúrgicos (Tahrani et al., 2007). Nas reações adversas reportadas encontram-se situações hematológicas como redução da agregação plaquetária, acidose láctica, sintomas GI (vómitos, náuseas, anorexia, diarreia e flatulência), má absorção quer de aminoácidos, vitamina B₁₂ ou ácido fólico e ainda reações alérgicas. Durante o tratamento a longo prazo com este fármaco, é aconselhável verificar as concentrações de creatinina do soro, sendo que estas não devem ser elevadas (Krentz and Bailey, 2005, INFARMED, 2012).

1.2.2 Mecanismos de ação da metformina

A metformina foi introduzida na prática clínica numa altura em que os possíveis alvos farmacológicos ainda não eram considerados objeto de estudo, pelo que o seu mecanismo de ação molecular começou a ser estudado apenas depois da sua aplicação clínica, o que leva a que, presentemente, alguns dos seus mecanismos moleculares ainda não se encontrem completamente esclarecidos. O efeito antihiperlipidémico da metformina reflete-se em diversos órgãos, como o fígado, músculo esquelético, intestino e tecido adiposo.

1.2.2.1 A metformina e a atividade da AMPK

A atividade da enzima AMPK implica a regulação do estado energético celular e sistémico, tendo esta bastante relevância na proteção celular em condições energéticas

restritas (Viollet et al., 2012). É ativada em resposta a *stress* metabólico, traduzindo-se num decréscimo no estado energético celular, ao qual se segue hipóxia, privação de glucose e inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial. É de salientar o papel ativo desta enzima na fosforilação e inativação de enzimas intervenientes na síntese de ácidos gordos, como a acetil-CoA carboxilase (Hardie and Carling, 1997).

A AMPK é uma proteína serina/treonina cinase heterotrimérica constituída por uma subunidade α catalítica e duas subunidades reguladoras β e γ . A ativação da AMPK envolve a ligação de adenosina monofosfato (AMP) a locais reguladores nas suas subunidades γ , o que ocorre normalmente devido ao aumento intracelular do rácio AMP/ATP resultante de um desequilíbrio entre a produção e consumo de ATP. Esta sua ativação leva a um *switch* nas células, de um estado anabólico para um estado catabólico, conduzindo a uma paragem das vias que consomem ATP, levando a um restauro do balanço energético. O resultado deste *switch* metabólico traduz-se na inibição da síntese proteica e lipídica e do crescimento celular, sendo que ocorre estimulação da oxidação de ácidos gordos e do *uptake* de glucose (Viollet et al., 2012).

Na presença de metformina, a AMPK pode ser ativada a nível hepático e muscular. A nível hepático, após captação pelo OCT1, este fármaco exerce uma inibição específica do complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial AMPK-independente, que induz uma redução transitória no estado energético celular. Mais, foi verificado que a metformina estimula a AMPK em células intactas e em condições *in vivo* (Zhou et al., 2001). O aumento da fosforilação e ativação da AMPK por parte da metformina conduz a efeitos no metabolismo dos lípidos e glucose. A sua ativação conduz à fosforilação e inativação da acetil-CoA carboxilase, como mencionado previamente, o que leva a uma redução no passo limitante da lipogénese, refletindo-se na redução do produto de síntese desta enzima, malonil-CoA. A produção em baixas concentrações de malonil-CoA leva à desinibição da carnitina palmitoiltransferase-1, que, por consequência, aumenta a oxidação de ácidos gordos. Pensa-se que estes efeitos estão diretamente relacionados com a capacidade da metformina em reduzir os níveis de triglicéridos e colesterol VLDL (Zhou et al., 2001).

1.2.2.2 A metformina e o seu efeito antihiperlipidémico

No fígado, a metformina reduz a produção de glucose, o que se verifica acontecer ou pela diminuição da gluconeogénese ou pela diminuição da glicogenólise. A redução do processo gluconeogénico deve-se ao aumento da sensibilidade à insulina, à diminuição da extração hepática de certos substratos gluconeogénicos, como o lactato

e à diminuição das enzimas participantes neste processo metabólico (Krentz and Bailey, 2005). A metformina é responsável por manter a homeostasia da glucose em indivíduos com DM2 mesmo em situações em que a taxa de eliminação da glucose se encontra relativamente alta. Esta ação da metformina nos hepatócitos deve-se à elevada expressão de OCT1, que facilita o *uptake* celular deste fármaco (Shu et al., 2007, Viollet et al., 2012). No fígado, a AMPK participa essencialmente na regulação da síntese de lípidos, fosforilando e inibindo a acetil-CoA carboxilase que catalisa a transferência de um grupo carboxílico para a acetil-CoA dando origem à malonil-CoA. Assim, a AMPK diminui a concentração de malonil-CoA, um substrato precursor da síntese de ácidos gordos e um forte inibidor do processo de β -oxidação mitocondrial. Consequentemente, a metformina diminui a lipogénese hepática, aumentando a oxidação de ácidos gordos. Assim, a metformina, em hepatócitos, ao ativar a AMPK leva à redução da atividade da acetil-CoA carboxilase e à redução da expressão da proteína que liga o elemento regulador de esteróis 1 (*sterol regulatory element-binding protein 1* – SREBP-1), bem como outros genes lipogénicos e proteínas, o que se reflete num aumento da oxidação de ácidos gordos, redução da síntese de colesterol VLDL, redução da esteatose hepática e melhoria da sensibilidade hepática à insulina.

Tanto no músculo esquelético como no tecido adiposo, a metformina leva a uma melhoria do *uptake* de glucose, podendo também diminuir o processo de lipólise. Nestes órgãos, na presença de insulina, a metformina facilita o tráfego dos transportadores de glucose GLUT4 para a membrana plasmática, sendo estes recrutados em maior número (Hundal and Inzucchi, 2003). No músculo esquelético, o *uptake* de glucose dependente de insulina é potenciado pela ação da metformina, no qual está subjacente a ativação da enzima AMPK que induz igualmente um aumento da síntese de glicogénio e aumento da atividade da enzima glicogénio sintase (Krentz and Bailey, 2005). Tais efeitos encontram-se descritos na Figura 3.

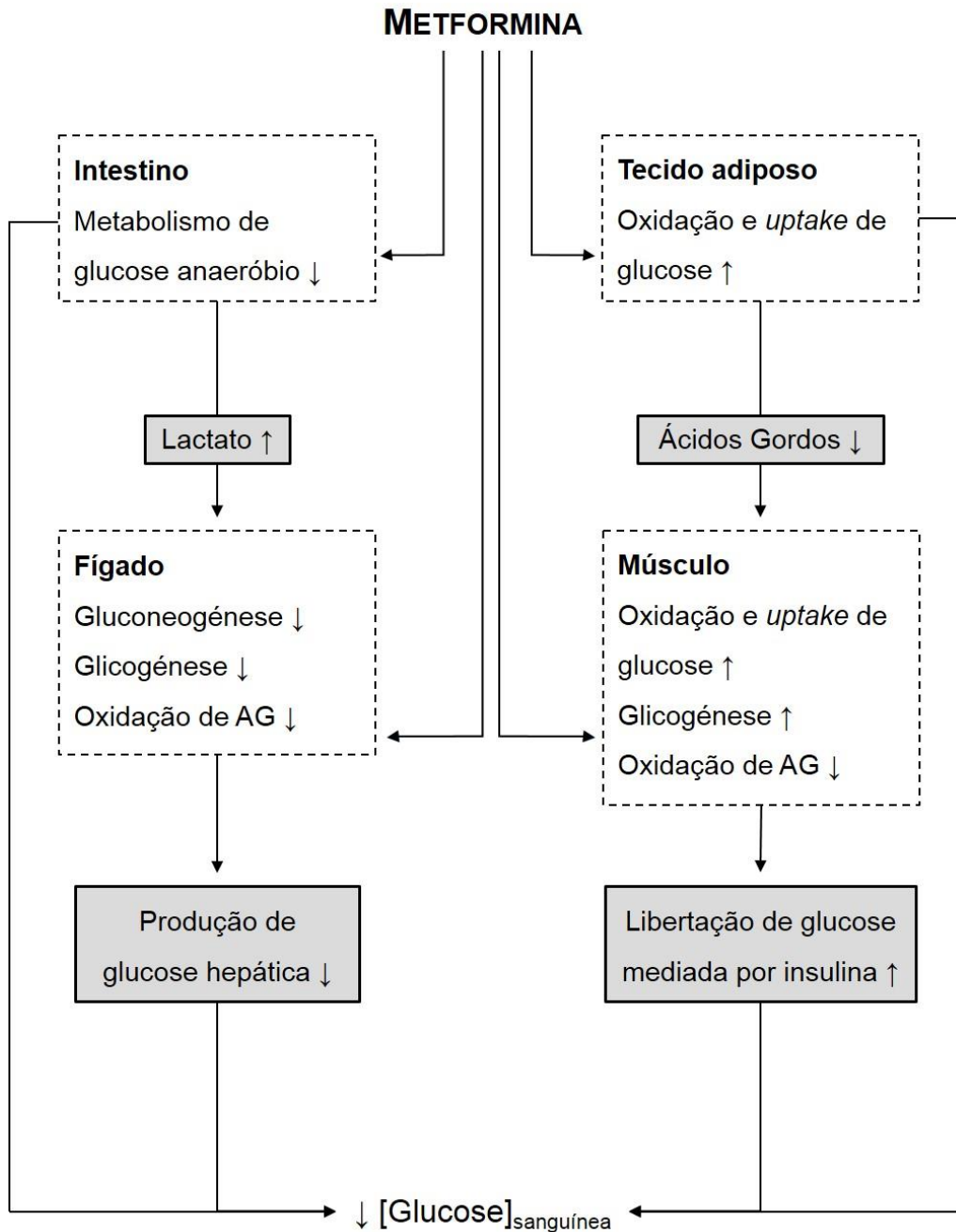


Figura 3. Ações da metformina (AG = Ácidos Gordos; ↑ = aumento; ↓ = diminuição). Adaptado de Krentz and Bailey (2005).

A metformina é também responsável por melhorias no perfil lipídico dos indivíduos, conseguindo reduzir a quantidade de triglicéridos em circulação, nomeadamente em indivíduos com hiperlipidémia (Bailey, 2008). Geralmente, nestes indivíduos não ocorre risco de hipoglicémia severa e a RI também é combatida, havendo uma diminuição das necessidades de insulina tanto endógenas como exógenas bem como da concentração basal de insulina do plasma. Este fármaco exerce também efeitos angioprotetores,

efeitos benéficos na cardiomiopatia diabética e melhorias na reatividade vascular (Bosi, 2009). O tratamento com metformina também é responsável por reverter a situação de redução das defesas antioxidantes observável na DMT2, verificando-se aumentos em enzimas como a glutatona, catalase, superóxido dismutase, para além de um aumento da atividade da glutatona peroxidase. Contudo, ainda se encontram por explicar os mecanismos que conduzem à reativação do poder antioxidante (Skrha et al., 2007).

Na célula, o principal alvo da metformina é a mitocôndria, onde esta inibe de modo transitório o complexo 1 da cadeia transportadora de eletrões mitocondrial, levando a uma diminuição da carga energética (Pernicova and Korbonits, 2014). Esta sua especificidade conduz à indução de um decréscimo na oxidação do dinucleótido de nicotinamida e adenina (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*, NADH), no bombeamento de prótons através da membrana interna da mitocôndria e na taxa de consumo de oxigénio, promovendo uma diminuição do gradiente de prótons ($\Delta\phi$), um aumento do rácio NADH/NAD e por fim, a uma redução da síntese de ATP a partir do ADP e do fosfato inorgânico (Pi).

A Diabetes per si aumenta o risco de cancro; a hiperinsulinémia e a obesidade associados à DMT2 são fatores predisponentes, bem como os níveis elevados de insulina e de fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (*Insulin-like growth factor 1*, IGF-1), devido aos efeitos proliferativos associados à via de sinalização da insulina. Numa condição de cancro, a transformação maligna encontra-se aliada a um aumento da taxa de captação intracelular de glucose e a uma taxa elevada do processo de glicólise, associado à oxidação do piruvato e ao incremento da produção de ácido láctico (glicólise aeróbia) (Hanahan and Weinberg, 2011). A metformina encontra-se associada a melhorias significativas no combate ao cancro, dado que atua na progressão do tumor, quer por um efeito direto, isto é, atua diretamente na célula alvo inibindo a via proliferativa mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*), quer por efeito indireto, como agente responsável pela diminuição dos níveis sanguíneos de glucose e de fatores de crescimento como a insulina (Papanas et al., 2010). Verificou-se que a ativação da AMPK suprime a sintase dos ácidos gordos sobreexpressa nas células malignas nos casos do cancro da mama, próstata, ovário e cólon (Aljada and Mousa, 2012).

1.2.3 Efeitos adversos associados à Metformina: Sintomas gastrointestinais

A administração de metformina em situações de DMT2 está associada ao aparecimento de vários efeitos adversos, como referido anteriormente, nomeadamente

a nível GI, tais como paladar metálico, desconforto abdominal, anorexia, náuseas, flatulência, dispepsia e diarreia, por vezes incontrolável (Garber et al., 1997, Raju et al., 2000). Verificou-se que o aparecimento destes efeitos laterais acontece no início da terapêutica, ocorrendo em 30% dos indivíduos que iniciaram o tratamento na forma de monoterapia, tendo levado à descontinuação do mesmo num baixo número de casos, correspondendo a aproximadamente 4% (Davidson and Peters, 1997). Na grande maioria das situações, estes efeitos ocorrem paralelamente nas doses terapêuticas, manifestam-se de forma pouco acentuada, não apresentando nenhuma causa exterior associada, podendo ser minimizados tomando o fármaco aquando do momento das refeições (Garber et al., 1997) ou podendo-se optar também por doses do fármaco mais baixas numa fase inicial do tratamento, aumentando-as gradualmente ao longo do mesmo. O tratamento com metformina leva ainda a perturbações ao nível da circulação entero-hepática dos sais biliares, reduzindo a sua absorção no íleo, levando a um excesso no cólon (Scarpello et al., 1998).

Recentemente, foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar quais as características cardiometabólicas dos indivíduos com DMT2 de acordo com a sua tolerância ou intolerância GI à metformina devido à existência de indivíduos que são intolerantes a este fármaco pelo que não são abrangidos pelos benefícios associados à administração do mesmo, estando esta desvantagem associada ao seu fenótipo, considerado de alto risco. As variáveis em análise neste estudo pertencem à definição de síndrome metabólica e de DMT2, ou estão associadas a estas patologias, assim como foram incluídos fatores que contribuem para o risco cardiometabólico. Em suma, a intolerância GI à metformina em indivíduos com DMT2 revelou um fenótipo complexo caracterizado por uma baixa prevalência de doença arterial coronária, níveis de ferritina mais elevados, prevalência do grupo sanguíneo do tipo A e função cerebral lateralizada com tendência para serem esquerdinos. Porém, serão necessários mais estudos de forma a corroborar e complementar esta informação (Hermans et al., 2013).

1.2.3.1 Diarreia Diabética e Diarreia Não Diabética

Por norma, a diarreia pode ser definida como fezes soltas ou muito aguadas em cerca de 75% das vezes, não se verificando dor abdominal, ou estando associada a um aumento da frequência de defecação, sendo esta frequência definida por mais do que três movimentos intestinais por dia (Bytzer et al., 2001a, Bytzer et al., 2002, Gaundalini and Vaziri, 2011). A diarreia pode ser classificada com base na sua duração em aguda, persistente e crónica: a diarreia aguda é devida a infeções bacterianas ou virais cuja

duração pode atingir até uma semana (Fine and Schiller, 1999); a diarreia persistente apresenta causas similares, mas a sua duração pode variar entre 2 e 4 semanas; e a diarreia crónica, menos comum que a aguda, pode durar 4 semanas ou mais, podendo apresentar diferentes causas, estando sujeita a diversas classificações. A fisiopatologia da diarreia pode ser classificada tendo por base diferentes mecanismos como os mecanismos secretórios, osmóticos, inflamatórios, mecanismos relacionados com o processo de motilidade ou com fármacos (Gaundalini and Vaziri, 2011). Na diarreia secretora ocorre transporte de iões Cl^- para o lúmen intestinal, levando a que iões sódio (Na^+) atravessem a parede intestinal de forma a manter a eletronegatividade, acompanhados de moléculas de água de modo a assegurar a isotonicidade; trata-se, portanto, de diarreia aguada de grande volume, persistente, mesmo em situações de jejum, cuja causa mais comum são infeções provocadas por agentes patogénicos (Schiller et al., 2014). A diarreia osmótica verifica-se quando solutos cuja absorção é nula (como o caso dos açúcares manitol ou sorbitol) ou praticamente nula (iões magnésio, sulfatos e fosfatos) são ingeridos, ou então quando os colonócitos ou enterócitos não possuem capacidade para os absorver. A força osmótica destes solutos provoca o movimento de água seguido do movimento de iões para o lúmen do intestino. Por outro lado, a diarreia também pode ser desencadeada por mecanismos inflamatórios, de exsudação da mucosa intestinal, da interação entre citocinas e células imunologicamente reativas, da atividade do Sistema Nervoso Entérico (SNE), e do efeito de estímulos secretórios.

A prevalência de sintomas GI encontra-se aumentada tanto em indivíduos com DMT1 como com DMT2, conferindo um impacto negativo na sua qualidade de vida (Quan et al., 2008). No que diz respeito aos indivíduos com DMT2, estas complicações do foro GI podem ser várias, nomeadamente gastroparésia, neuropatia intestinal, doença gordurosa hepática não alcoólica, náuseas, vómitos, dor abdominal e enteropatia, que pode, por sua vez, resultar em incontinência fecal, obstipação e diarreia, sendo esta última um dos sintomas com maior prevalência (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007, Shakil et al., 2008). Para além de estarem associados à morbilidade, este tipo de manifestações adversas conduz a má nutrição, podendo originar simultaneamente infeções. Os sintomas GI associados à DMT2, principalmente os sintomas que se manifestam a um nível superior, encontram-se associados a um baixo controlo glicémico, avaliado através da monitorização dos níveis de HbA_{1c} (Bytzer et al., 2002, Kim et al., 2010). Dado que a prevalência da diarreia em indivíduos com DMT2 se encontra entre 4 e 22% (Rayner et al., 2001, Ebert, 2005), esta tem sido muito estudada nos últimos anos (Lysy et al., 1999, Spangeus et al., 1999, Bytzer et al., 2001b, Bytzer et al., 2002, Koch and Uwaifo, 2008, Quan et al., 2008). Porém, este tipo de

sintomas GI está também associado aos efeitos adversos de fármacos utilizados no controlo glicémico, isto é, aos fármacos antidiabéticos orais. A diarreia associada a este tipo de fármacos é denominada de diarreia não diabética, estando normalmente associada à toma de metformina (Shakil et al., 2008), em oposição com a diarreia associada à Diabetes, denominada de diarreia diabética. É, contudo, bastante difícil distinguir entre a diarreia espontânea associada à patologia e a diarreia como efeito secundário da ação da metformina.

A diarreia diabética afeta indivíduos com uma extensa história de DMT1 e de tratamentos com insulina igualmente extensos durante períodos superiores a oito anos, sendo que a neuropatia diabética, autonómica e periférica, consiste no principal fator da etiologia da diarreia diabética (Foss and Clement, 2001, Bytzer et al., 2002). A neuropatia diabética é uma complicação muito comum associada à Diabetes, tanto à DMT1 como à DMT2, sendo responsável por elevadas taxas de morbilidade e mortalidade nestes indivíduos. O principal fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia diabética é a hiperglicémia. Na neuropatia diabética o Sistema Nervoso Periférico (SNP), ao nível dos neurónios sensoriais e motores autonómicos é afetado, havendo perturbação dos sistemas cardiovascular, urogenital e GI. Verificam-se alterações morfológicas como a desmielinização e a degeneração nervosas, afetando a função de órgãos inervados pelo Sistema Nervoso Autónomo (SNA), como o sistema GI, tal se refletindo em anomalias na secreção e motilidade intestinais. O sistema GI é afetado, deste o esófago até ao cólon, podendo resultar em obstipação, diarreia e incontinência fecal (Duby et al., 2004, Edwards et al., 2008). Deste modo, a diarreia encontra-se relacionada com a hiperatividade de neurónios secretores e motores excitatórios responsáveis pela inervação da parede GI e pela estimulação da secreção de água e eletrólitos, originando fezes líquidas e aquosas (Wood, 2007). Outros fatores que contribuem para o aparecimento da diarreia em indivíduos diabéticos são o aumento da atividade parassimpática, insuficiência pancreática, esteatorreia e má absorção de sais biliares, que conduzem a uma hipermotilidade no intestino (Shakil et al., 2008, Krishnan et al., 2013). Nestes casos, a diarreia é de carácter episódico, é indolor, pode estar associada à incontinência fecal e ocorre durante o dia mas, mais frequentemente, durante o período noturno (Ebert, 2005). Essencialmente, o tratamento da diarreia diabética corresponde a um processo empírico cujo objetivo é o alívio sintomático, no qual se procura corrigir a falta de balanço nos níveis de eletrólitos e fluidos, aumentar a nutrição e o controlo da glucose sanguínea, tendo em atenção as possíveis causas associadas ao desenvolvimento deste efeito adverso.

Quanto à diarreia não diabética, associada à toma do fármaco metformina, a explicação farmacológica e bioquímica no que diz respeito aos seus mecanismos não é

conhecida. Algumas observações têm sido feitas ao longo dos anos, apesar de algumas serem contraditórias, e algumas hipóteses têm sido testadas. O aumento da motilidade intestinal e situações de má absorção são fatores que poderão contribuir para a diarreia não diabética provocada pela metformina.

Como referido anteriormente neste trabalho, a metformina é responsável por um atraso na absorção intestinal de glucose, sendo que, neste órgão, este fármaco não consegue atravessar os enterócitos, acumulando-se nos ductos lacteais linfáticos das vilosidades intestinais (Bailey et al., 1996), tendo sido demonstrado em animais que o processo de absorção intestinal passa a ocorrer na porção distal do trato GI. No intestino verifica-se igualmente um incremento na utilização de glucose, nomeadamente no metabolismo anaeróbio da glucose, podendo tal ser explicado pela acumulação de grandes concentrações de metformina na parede intestinal, o que contribui para uma diminuição da quantidade de glucose que passa da face luminal para a serosa do intestino (Bailey et al., 1992, Bailey et al., 1994). De acordo com estudos experimentais sabe-se que a acumulação de metformina no intestino induz um efeito inibitório na absorção de glucose (Ikeda et al., 2000), sendo tal dependente da dose. Mais recentemente, foi reportado que a metformina aumenta a produção de lactato na mucosa intestinal humana o que poderá significar que este tecido é uma fonte de lactato induzida pela metformina (Bailey et al., 2008). Para além disto, foi demonstrado que a metformina reduz rapidamente o número de dois transportadores de glucose, o co-transportador Na^+ /glucose tipo 1 (*Sodium/glucose cotransporter 1*, SGLT1), responsável pelo transporte de glucose e galactose do lúmen intestinal para os enterócitos, e o GLUT2 das membranas basolaterais plasmáticas dos enterócitos, via ativação da enzima AMPK (Sakar et al., 2010). É de realçar que as atividades destes dois transportadores de glucose se encontram aumentadas em situações de DMT2 (Dyer et al., 2002, Wong et al., 2009). Será portanto expectável que este fármaco possa levar a um decréscimo da absorção de glucose a nível intestinal, o que interfere com o processo de hiperglicémia no estado pós-prandial (Hundal and Inzucchi, 2003). Por outro lado, o aumento da utilização de glucose intestinal conduz a um consumo superior de glucose intracelular, podendo tal explicar igualmente a redução que se verifica no transporte de glucose (Ikeda et al., 2000).

Outro mecanismo explicativo da diarreia não diabética induzida pela metformina envolve a sua analogia estrutural com os agonistas seletivos do recetor 5-HT₃ (Wallis, 1981, Kilpatrick et al., 1990, Sepúlveda et al., 1991). A libertação de 5-HT a partir do intestino está associada a efeitos adversos como náuseas, vômitos e diarreia. De acordo com estudos experimentais, sabe-se que a metformina é responsável pela indução da libertação de 5-HT pela mucosa duodenal humana, mais propriamente a partir das

células enterocromafins (EC), principal depósito de 5-HT no intestino. Gebauer et al. (1993) sugerem a localização de recetores para a 5-HT nas células EC de íleo de cobaia, sendo que a ativação dos recetores 5-HT₃ induz um mecanismo de *feedback* positivo enquanto que os 5-HT₄ causam inibição da libertação de 5-HT. Coloca-se assim a hipótese de que parte das manifestações GI associadas à metformina possam ser explicadas pela libertação de 5-HT e de outras substâncias neurotransmissoras pela mucosa do duodeno, processo este que mais tarde se provou ser independente do recetor 5-HT₃ (Cubeddu et al., 2000). De facto, experiências anteriores do grupo, levadas a cabo com o MDL 72222 (antagonista seletivo dos recetores 5-HT₃), permitiram-nos excluir a intervenção deste tipo de recetores na resposta contráctil do intestino à metformina (Henriques, 2011).

1.3 O SISTEMA GASTROINTESTINAL

O sistema GI é composto pelo trato GI e pelos órgãos digestivos acessórios. O trato GI, cujo comprimento é de cerca de nove metros, compreende os órgãos que existem desde a boca até ao ânus, sendo estes a cavidade oral, faringe, esófago, estômago, intestino delgado e intestino grosso; no que diz respeito aos órgãos digestivos acessórios, estes são os dentes, língua, glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas (Fox, 2011). O trato GI apresenta como funções principais a digestão, absorção, excreção e proteção, sendo que cada órgão apresenta um papel específico (Cheng et al., 2010).

1.3.1 Estrutura da parede intestinal

O intestino delgado, correspondente à maior porção do trato GI, apresenta três secções diferentes: o duodeno, o jejuno, e uma porção final denominada de íleo. O íleo, que se encontra ligado ao intestino grosso através da válvula ileocecal, é o local de absorção de sais biliares, vitamina B₁₂, água e eletrólitos. Este processo de absorção ocorre rapidamente devido às várias dobras da mucosa intestinal, o que lhe permite maximizar a área onde ocorre este processo. Para além disto, existem estruturas especializadas, as vilosidades e microvilosidades, com o mesmo propósito, sendo estas mantidas por filamentos de actina. As vilosidades são projeções da mucosa que se estendem para o lúmen, e na superfície de cada uma destas vilosidades existe uma camada de células epiteliais cuja superfície membranar forma projeções, as microvilosidades. No intestino, assim como ao longo de todo o trato GI, existem quatro camadas diferentes – a mucosa, a submucosa, a camada muscular (*muscularis*) e a serosa. A mucosa é a principal camada secretora e absorptiva constituída pelo epitélio, lâmina própria e pela *muscularis mucosae*. O epitélio consiste numa camada simples de células epiteliais, existindo também células calciformes especializadas na secreção de muco ao longo da maior parte do trato GI. Esta camada é suportada pela lâmina própria, uma fina camada de tecido conjuntivo que contém nódulos linfáticos, ajudando na proteção contra situações de doença, pequenos vasos sanguíneos e fibras nervosas. Externa à lâmina própria encontra-se também uma camada fina de músculo liso, a *muscularis mucosae*, sendo esta responsável pelas inúmeras dobras existentes no trato GI, separando a mucosa da camada seguinte. A submucosa é a camada seguinte, sendo uma camada relativamente espessa e altamente vascularizada de tecido conjuntivo. Esta é constituída por vasos sanguíneos, glândulas e plexos nervosos, como

é o caso do plexo submucoso (ou plexo de *Meissner*), responsável pela inervação da *muscularis mucosae* dos intestinos delgado e grosso. A camada muscular é responsável pelos movimentos de contração do trato GI, que podem ser ou movimentos propulsivos ou de segmentação. Esta possui uma camada interior circular e uma camada exterior longitudinal de músculo liso, sendo que a primeira permite o estreitamento do lúmen e a segunda conduz ao encurtamento do trato GI. Entre estas duas camadas de músculo liso encontra-se o plexo mientérico (ou plexo de *Auerbach*), que fornece uma rede nervosa para o trato GI, incluindo fibras e gânglios das componentes simpática e parassimpática do SNA. A camada mais exterior, de carácter protetor, denomina-se serosa e é constituída por tecido conjuntivo areolar/frouxo coberto por uma camada fina de epitélio escamoso simples; esta é contínua com o mesentério, permitindo o suporte e proteção do trato GI na cavidade abdominal (Fox, 2011).

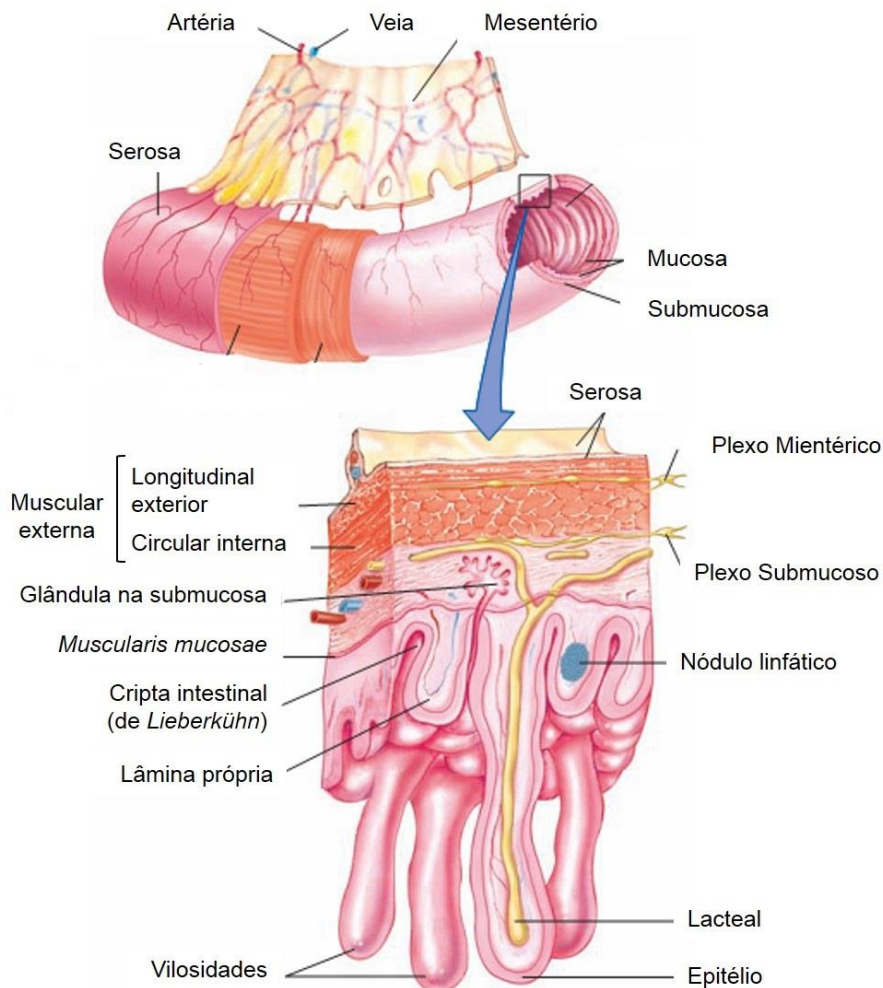


Figura 4. Camadas do trato GI. Adaptada de Fox (2011).

1.3.2 Movimentos de contração a nível intestinal

No intestino verifica-se a existência de dois tipos principais de contração, os movimentos propulsivos e os de segmentação. Os movimentos propulsivos são fracos neste órgão em relação ao que se verifica no esófago e estômago, pelo que a principal força de contração no intestino se deve à segmentação. O processo de segmentação ocorre com maior frequência na porção proximal do que na porção distal do intestino, sendo que este fenómeno corresponde a constrições musculares alternadas do lúmen que ocorrem simultaneamente em diferentes segmentos intestinais, sem que haja propulsão dos conteúdos luminais (Fox, 2011). Este processo tem o objetivo de misturar os conteúdos presentes no intestino delgado assim como maximizar a sua exposição a enzimas digestivas durante o processo de digestão.

A motilidade do trato GI é mantida por atividade elétrica, ocorrendo esta principalmente no estômago e intestino delgado. No músculo liso do intestino delgado verifica-se a existência de contrações fásicas marcadas por despolarizações graduais que se manifestam na forma de ondas lentas (Sanders et al., 2006, Cheng et al., 2010). Estes padrões elétricos vão-se alterando lentamente, de potenciais de membrana tónicos para potenciais de membrana quiescentes, em resposta às informações neuronais excitatórias e inibitórias que vão chegando às células musculares do trato GI, de forma rítmica. As ondas lentas são geradas na ausência de qualquer estímulo neuronal, sendo geradas e propagadas pelas células intersticiais de *Cajal* (CIC), que se encontram eletricamente acopladas a células do músculo liso, estando unidas anatomicamente ao nível do tecido através de uma rede de neurónios mientéricos. As células CIC, denominadas também de células *pacemaker* do trato GI, podem ser consideradas como células do músculo liso especializadas, uma vez que, tal como as células musculares lisas, derivam de células mesenquimais. Este tipo de células encontra-se em contacto entre si mas também com células musculares e terminais nervosos através de *gap junctions*, e é a partir destas estruturas que a despolarização se propaga de uma célula para a seguinte. Foram identificadas diferentes classes de células CIC de acordo com a sua morfologia, localização e função, e sabe-se que este tipo de células apresenta poucos elementos contrácteis, mitocôndrias em elevado número, retículo endoplásmico abundante e vários canais na sua membrana, para além de apresentarem recetores para neurotransmissores de taquicina excitatórios, recetores muscarínicos e recetores para o péptido intestinal vasoativo (*Vasoactive intestinal peptide*, VIP) mas também respondem ao monóxido de azoto (*Nitric oxide*, NO), um neurotransmissor inibitório (Hansen, 2003b, Mostafa, 2010). A perda destas células, assim como deformações nas mesmas, conduz a uma motilidade GI anormal (Camilleri,

2001, Porcher et al., 2002, Mostafa, 2010). É de salientar que populações de células CIC não são apenas encontradas no trato GI mas também na bexiga, junção uteropélvica, canal deferente, próstata, pênis, glândulas mamárias, útero, pâncreas, alguns vasos sanguíneos e vagina.

As ondas lentas resultam da oscilação do potencial de membrana destas células musculares lisas modificadas de um valor mais negativo para um valor mais positivo, à custa da abertura de canais de Ca^{2+} de baixa voltagem (potencial de repouso entre -80 a -55 mV). Assiste-se assim à passagem para um estado em que há elevada probabilidade de abertura de canais de Ca^{2+} de alta voltagem (potencial de repouso entre -40 a -25 mV) responsáveis pelo desenvolvimento de potenciais de ação em espiga, que se sobrepõem às ondas lentas, e que são a base das contrações fásicas. A alternância na abertura de canais de Ca^{2+} de baixa voltagem conduz ainda à entrada periódica de Ca^{2+} , conduzindo também à contração tónica das células do músculo liso (Sanders et al., 2006, Cheng et al., 2010, Mostafa, 2010, Fox, 2011). A propagação destas ondas lentas ocorre apenas ao longo de curtas distâncias (escassos centímetros) pelo que são regeneradas na zona *pacemaker* seguinte, o que produz as contrações de segmentação do intestino.

A contração alternada das camadas de músculo liso circulares e longitudinais no intestino leva à produção dos movimentos peristálticos. Como referido anteriormente, a contração das células musculares lisas é sinalizada por um aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma destas células. Tal é responsável apenas pela fase inicial do processo de contração, sendo necessária a difusão de Ca^{2+} extracelular para as células do músculo liso para que haja continuação do processo contráctil. A entrada de iões Ca^{2+} ocorre através de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem na membrana plasmática, sendo que a sua abertura depende do nível de despolarização, sendo que quanto maior for a despolarização, maior a quantidade de Ca^{2+} que entra nas células, e maior será a contração do músculo liso. Em seguida, o Ca^{2+} combina-se com a proteína calmodulina, formando o complexo calmodulina- Ca^{2+} , levando à ativação da cinase das cadeias leves da miosina (*Myosin light-chain kinase*, MLCK), enzima responsável pela catálise da reação de fosforilação das cadeias leves da miosina, componente das pontes cruzadas de miosina. Tal facto permite a ligação à actina, o que induz desenvolvimento de força e encurtamento do músculo, conduzindo à produção de uma contração. Por outro lado, o relaxamento do músculo liso deve-se ao encerramento dos canais de Ca^{2+} e à diminuição das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} , por ação de bombas de transporte ativo Ca^{2+} -ATPases. A calmodulina dissocia-se da MLCK, levando à inativação desta enzima. Por conseguinte, ocorre desfosforilação da miosina por ação

da miosina fosfatase, levando a que as pontes cruzadas não se liguem à actina (Bitar, 2003, Fox, 2011).

1.3.3 Regulação da motilidade intestinal

O trato GI é innervado pelas componentes simpática e parassimpática do SNA. Extrinsecamente, o trato GI é regulado pelo SNA e pelo sistema endócrino e, a nível intrínseco, pelo SNE e vários reguladores parácrinos.

O SNE, considerado como o sistema nervoso intrínseco do intestino, encontra-se ao longo de todo o trato GI, desde o esófago até ao ânus, e glândulas a ele associadas, como as glândulas salivares, o pâncreas, e a vesícula biliar. O SNE faz parte do SNA, funcionando de certa maneira, de forma independente do SNC, sendo responsável por integrar vários mecanismos como o controlo da motilidade, secreções endócrinas e exócrinas, fluxo sanguíneo e respostas imunitárias e inflamatórias, em padrões de comportamento organizados através de reflexos neuronais (Hansen, 2003a). No SNE encontram-se dois principais plexos ganglionados – o plexo mientérico (plexo de *Auerbach*) e o plexo submucoso (plexo de *Meissner*), assim como a mucosa, mas também existem vários plexos aganglionados. O plexo mientérico localiza-se nas camadas musculares circulares e longitudinais exteriores ao longo do trato GI. O plexo submucoso encontra-se na submucosa, sendo apenas proeminente ao nível dos intestinos. Por último, os plexos aganglionados encontram-se em todas as camadas do intestino (Costa et al., 2000).

O SNE Humano apresenta aproximadamente 100 milhões de neurónios, de diferentes tipos, classificados de acordo com as suas propriedades morfológicas, neuroquímicas ou funcionais, distribuídos diferentemente de acordo com o segmento ou tecido. O potencial de membrana de repouso dos neurónios entéricos costuma ser mais negativo que o dos neurónios do SNC (entre -40 e -70 mV), sendo em grande parte determinado pelos canais de K^+ . Sabe-se que a hiperpolarização induz inibição do neurónio, já a despolarização induz excitação do mesmo. Os potenciais de ação, no caso dos neurónios extrínsecos, são desencadeados pelo Na^+ e, no caso dos neurónios intrínsecos, devem-se ao Ca^{2+} (Furness, 2000). Até ao momento, foram identificados mais de trinta neurotransmissores e neuropéptidos no SNE podendo estes ser de vários tipos, nomeadamente, pequenas moléculas, moléculas de maior tamanho, como péptidos, e também gases. Existem, deste modo, neurotransmissores de ação excitatória, como a acetilcolina (ACh), considerada como o principal neurotransmissor excitatório do SNE, a serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) e a substância P. De ação

inibitória estão descritos a noradrenalina, o VIP, neuropeptídeo Y e o NO. O ATP pode ter uma ação tanto inibitória como excitatória, consoante a localização e o tipo de recetores em que atua.

Os neurónios entéricos podem ser classificados de acordo com a sua função. Estão incluídos neste grupo os neurónios sensoriais, interneurónios, neurónios motores, neurónios secretomotores e neurónios vasomotores. Sabe-se que os neurónios sensoriais comunicam entre si através de excitação sináptica lenta, constituindo uma rede complexa e densa. Apresentam-se em formas diferentes no intestino, estando incluídos neste grupo os neurónios extrínsecos bem como os neurónios aferentes primários intrínsecos (*Intrinsic primary afferent neurons*, IPANs). Este tipo de neurónios apresenta quimiorrecetores, termorreceptores e mecanorreceptores, sendo que estes últimos são ativados por distensão, sendo também responsáveis por gerar contração muscular tónica. No entanto, sabe-se que se esta distensão se mantiver, os mecanorreceptores respondem através da produção de atividade peristáltica, pelo que se assume que tais recetores constituem a componente sensorial dos reflexos regulatórios autonómicos normais. Já os interneurónios ascendentes e descendentes formam cadeias que se interligam entre si, enquanto que os neurónios motores musculares e os neurónios secretomotores são responsáveis pela inervação do músculo e da mucosa, respetivamente (Hansen, 2003a). Os neurónios motores estão englobados em três grandes tipos, os neurónios motores musculares, os neurónios secretomotores (vasodilatadores ou não) e os neurónios responsáveis pela enervação das células enteroendócrinas. Primeiramente, os neurónios motores musculares têm como função a inervação dos músculos circular e longitudinal assim como da *mucosae muscularis*. Podem ser do tipo excitatório ou inibitório, libertando neurotransmissores responsáveis pelas contrações musculares ou seu relaxamento. Por outro lado, os neurónios secretomotores e vasomotores apresentam função de controlo das secreções e fluxo sanguíneo, respetivamente. Os corpos celulares da maioria dos neurónios secretomotores encontram-se no plexo mucoso, sendo que alguns se projetam para o plexo mientérico, e outros se projetam para a *mucosae muscularis*. Para os neurónios vasomotores (dilatadores) o mesmo se verifica, estando os seus corpos celulares na camada submucosa. Para além disto, os neurónios secretomotores do intestino podem dividir-se em dois grandes grupos, neurónios colinérgicos e neurónios não colinérgicos. Nos neurónios do tipo colinérgico, ocorre libertação de ACh que atua em recetores muscarínicos no epitélio da mucosa. Relativamente aos neurónios do tipo não colinérgico, estes são responsáveis por mediar grande parte das respostas a reflexos locais, utilizando como neurotransmissor o VIP. O controlo das secreções e do fluxo sanguíneo realizado por esta classe de neurónios ocorre devido a circuitos de reflexos

locais, que se encontram sob modulação extrínseca por parte da via simpática (Furness, 2000).

Anteriormente à ativação do SNE e dos nervos aferentes extrínsecos, diferentes estímulos específicos ao nível do lúmen intestinal podem ativar células especializadas da mucosa, altamente innervadas, as células enteroendócrinas. Estes estímulos incluem hiperosmolaridade, presença de hidratos de carbono, distorção mecânica da mucosa, fármacos citostáticos e fármacos bacterianos. Estas células, que se encontram localizadas na mucosa de forma a conseguirem sinalizar a presença de conteúdos luminiais, são responsáveis por libertar os seus mediadores de forma a ativar os terminais dos nervos aferentes na lâmina própria, induzindo sinapses excitatórias ou inibitórias nos neurónios motores. Este tipo de células encontra-se com elevada frequência no intestino. Os principais neurotransmissores deste tipo de células são a colecistocinina, secretina, somatostatina, 5-HT e a hormona responsável por libertar corticotropina. É de realçar que a população de células contendo 5-HT se encontra presente em todas as regiões do intestino, constituindo a maior população de células endócrinas (Holzer, 2002). A passagem do quilo estimula os IPANs, cujos corpos celulares se encontram no plexo mientérico, conduzindo à ativação dos interneurónios entéricos, que estimulam, por sua vez, os neurónios do tipo motor. Estes últimos libertam neurotransmissores excitatórios e inibitórios nas células do músculo liso e nas células CIC: a contração do músculo liso é estimulada pelos neurotransmissores ACh e substância P ao passo que o relaxamento do mesmo é promovido pelo NO, pelo VIP e pelo ATP (Fox, 2011).

Existem vários reflexos intestinais controlados localmente, através do SNE e de reguladores parácrinos, e extrinsecamente através da ação de nervos e hormonas. Neste grupo de reflexos encontra-se o reflexo gastroileal, no qual o aumento de atividade gástrica conduz ao aumento da motilidade do íleo e aumento dos movimentos do quilo através do esfíncter ileocecal; o reflexo ileogástrico, no qual a distensão do íleo provoca a diminuição da motilidade gástrica; e o reflexo intestino-intestinal, no qual a sobredistensão de um segmento intestinal leva ao relaxamento ao longo do restante intestino (Fox, 2011).

1.3.3.1 A Acetilcolina e o Sistema Gastrointestinal

A Acetilcolina (ACh) é um dos principais reguladores biológicos do transporte iónico intestinal a nível epitelial, regulando desta forma os movimentos de água que originam a hidratação do intestino (Hirota and McKay, 2006), sendo também o principal mediador

parassimpático. A ACh pode funcionar como neurotransmissor mas também como molécula de carácter sinalizador em tecidos não-neuronais e em organismos não possuidores de qualquer tipo de sistema nervoso. Esta divisão é bastante visível no intestino, sendo que as vias colinérgicas exibem diferenças regionais ao longo de todo o intestino (Hirota and McKay, 2006). Esta molécula é sintetizada pela conversão catalítica de acetil-CoA e colina a CoA e ACh, por ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT) (Hebb and Whittaker, 1958). Após a sua síntese, a ACh é transportada através do transportador vesicular de ACh (VAChT) para as vesículas sinápticas, a partir das quais é libertada dos terminais nervosos como consequência dos potenciais de ação membranares. Quando libertada dos terminais nervosos, esta é quebrada em colina e acetato por ação da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima muito abundante na fenda sináptica.

O principal mecanismo de neurotransmissão excitatória no SNE resulta da atuação da ACh nos recetores de ACh neuronais (Hansen, 2003c). Existem dois tipos de recetores responsáveis por mediar a transmissão colinérgica no SNE: ligação da ACh a recetores muscarínicos, acoplados a proteínas G (mAChR), ou então a recetores nicotínicos neuronais, do tipo ionotrópico. Deste modo, a ligação da ACh gera potenciais pós-sinápticos muito variáveis dependentes do recetor presente na membrana celular, sendo que os recetores nicotínicos medeiam transmissão excitatória rápida e os recetores mAChR são responsáveis por uma transmissão excitatória de cariz lento. No SNE são necessários recetores nicotínicos para assegurar neurotransmissão rápida de modo a que os reflexos se propaguem rapidamente e produzam respostas rápidas ao estímulo (Galligan, 2002). No que diz respeito aos recetores mAChR, estes medeiam respostas à ACh pela ativação de cascatas de segundos mensageiros e vias de sinalização intracelular. Este tipo de recetores encontra-se amplamente distribuído a nível intestinal, apresentando diferentes tipos acoplados a proteínas G, levando a uma variabilidade de respostas intracelulares aquando da sua ativação. A ligação da ACh aos recetores mAChR pode levar a uma despolarização da célula, resultando na formação de mais um potencial de ação, ou então pode levar à hiperpolarização da mesma, inibindo a formação de mais potenciais de ação. Atualmente estão caracterizados cinco tipos de recetores muscarínicos: M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅, classificados com base nas suas características estruturais, mecanismos de transdução e perfil farmacológico, tendo como referência dados disponibilizados pela IUPHAR (Christopoulos et al., 2013).

De acordo com estudos realizados, os recetores M₂ e M₃ são os subtipos de recetores muscarínicos envolvidos na resposta contráctil do músculo liso GI, para além

de se encontrarem envolvidos, de modo indireto, no controlo parassimpático do músculo liso GI.

1.3.3.2 A Serotonina no Sistema Gastrointestinal

A Serotonina (5-HT) é um neurotransmissor/neuromodulador do tipo monoamina, bastante importante no trato GI, exercendo diferentes funções complexas no intestino: participa em funções motoras e secretoras assim como em processos de transdução sensorial da mucosa (Hansen, 2003c). Esta é sintetizada a partir do triptofano proveniente da dieta, por ação da enzima triptofano hidroxilase (TpH), sendo que esta enzima possui duas isoformas, a TpH1, localizada maioritariamente nas células EC, e a TpH2, encontrada principalmente nos neurónios do SNC e do SNE. Cerca de 95% da 5-HT do organismo é encontrada no trato GI, dos quais 90% são armazenados e libertados pelas células EC (em ratos, o armazenamento de 5-HT ocorre em mastócitos), em resposta a estímulos mecânicos e químicos, num processo dependente da pressão intraluminal, e 5% pelos neurónios entéricos; os restantes 5% correspondem à 5-HT armazenada no cérebro. Dado que a 5-HT é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, é necessário que o cérebro sintetize a sua própria 5-HT (Gershon and Tack, 2007, Lesurtel et al., 2008). Após a sua produção, é armazenada em vesículas por ação dos transportadores vesiculares de monoaminas tipo 1 (VMAT1).

A libertação de 5-HT a partir das células EC medeia funções a nível GI, como o peristaltismo, secreção, vasodilatação e perceção de dor e náusea, através da ativação dos seus vários recetores em IPANs e em fibras nervosas aferentes extrínsecas localizadas na lâmina própria (Mawe and Hoffman, 2013). No que diz respeito à terminação do sinal, não existem enzimas intracelulares com capacidade de degradação da 5-HT a pH fisiológico, pelo que é necessário um mecanismo de transporte especializado, realizado pelo transportador membranar de 5-HT (*Serotonin transporter*, SERT), transportador dependente de Na^+/Cl^- , que faz a captação da 5-HT para as células epiteliais, de modo a que esta molécula consiga atravessar a membrana plasmática para poder ser degradada por enzimas intracelulares. Quando a 5-HT chega às células epiteliais é degradada pela monoamina oxidase A (MAO_A), enzima presente nas células epiteliais do intestino, em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Em alternativa, quando a 5-HT é libertada na lâmina própria, pode entrar na sistema venoso portal, podendo ser encontrada na forma de 5-HT livre ou associada a plaquetas, mais uma vez via ações da proteína transportadora SERT. À medida que a circulação portal vai sendo processada pelo fígado, a 5-HT livre é rapidamente degradada por enzimas

hepáticas (Bertrand and Bertrand, 2010). Sabe-se que aproximadamente 2% dos neurónios no plexo mientérico são serotoninérgicos, sendo que estes estabelecem sinapses, de modo não exclusivo, com neurónios serotoninérgicos, formando uma rede de interneurónios serotoninérgicos que se projetam ao longo do trato GI. No plexo mientérico, as respostas sinápticas deste tipo de neurónios conduzem à formação de potenciais pós-sinápticos excitatórios lentos e também rápidos. Sabe-se que os potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos no SNE são mediados em grande parte pela ACh atuando em recetores nicotínicos; apesar deste facto, aproximadamente 10% deste tipo de potenciais pós-sinápticos apresentam também uma componente sensível a antagonistas dos recetores 5-HT₃ (Galligan et al., 2000). Foi demonstrado que a 5-HT neuronal entérica afeta tanto o crescimento como a manutenção da mucosa intestinal e do SNE (Gross et al., 2012). No íleo, a libertação de 5-HT está associada a reflexos motores, tendo tal sido demonstrado em espécies como cobaia (*guinea pig*), rato, ratinho e coelho (Dénes et al., 2003, Bertrand, 2006, Bertrand and Bertrand, 2010, Keating and Spencer, 2010).

Atualmente estão caracterizados sete tipos diferentes de recetores serotoninérgicos: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, classificados com base nas suas características estruturais, mecanismos de transdução e perfil farmacológico, tendo como referência dados disponibilizados pela IUPHAR (Andrade et al., 2013, Barnes et al., 2013).

Os recetores para a 5-HT encontram-se vastamente expressos no trato GI, nos neurónios entéricos, células EC e células do músculo liso GI, sendo que cinco das sete famílias conhecidas, recetores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇, se encontram expressas no intestino, podendo afetar as funções do mesmo (Hoyer et al., 2002). É de salientar os recetores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ e 5-HT₇, presentes nas células de músculo liso, e os recetores neuronais 5-HT_{1A}, 5-HT₃ e 5-HT₄ regulam a atividade GI uma vez que modulam a neurotransmissão. A atividade dos recetores 5-HT_{2A/2B} reflete-se na contração gástrica e intestinal uma vez que estão descritos nas células de músculo liso da parede do trato GI, havendo no entanto diferenças nas distribuições anatómicas consoante a espécie animal (Andrade et al., 2013). Os recetores 5-HT₃ têm sido bastante estudados neste órgão, tendo sido apontados como um possível alvo para o tratamento de diarreia (Mawe and Hoffman, 2013). A 5-HT atua nos recetores 5-HT₃ presentes nos terminais aferentes viscerais no trato GI (Kirkup et al., 2001), sendo estes recetores responsáveis pelas respostas de despolarização rápida em neurónios mientéricos, conduzindo a um aumento da libertação de ACh pelos neurónios colinérgicos, o que resulta na contração do músculo liso. Os recetores 5-HT₄ estão igualmente descritos em neurónios entéricos (plexo mientérico e submucoso),

umentando a transmissão sináptica de neurónios colinérgicos o que, por sua vez, aumenta a atividade de neurónios motores que inervam o músculo liso intestinal (Hoyer et al., 1994). No músculo liso, a ativação dos recetores 5-HT₄ traduz-se no relaxamento ou contração, consoante a espécie e a região do trato GI. O processo de relaxamento das células musculares, induzido pela 5-HT, é mediado pelos recetores 5-HT₇ (Costall et al., 1993, Tuladhar et al., 1996, Tuladhar et al., 1997, Tuladhar et al., 2003, Tonini et al., 2005).

1.3.3.2.1 As Células Enterocromafins

A denominação células enterocromafins (EC) foi efetuada por *Ciaccio* em 1907, devido à localização destas células no epitélio intestinal e ao facto de apresentarem afinidade para sais de crómio (Wade and Westfall, 1985). As células EC consistem num tipo de células enteroendócrinas que apresenta distribuição ao longo do epitélio digestivo, constituindo a maior população celular endócrina do trato GI, tendo estas sido as primeiras células endócrinas do intestino a ser identificadas (Ahlmán, 2001). Possuem um papel fundamental na regulação da secreção, da motilidade e da perceção da dor visceral (Schäfermayer et al., 2004). Estas células apresentam uma localização intraepitelial, encontrando-se assentes na lâmina basal, estando o domínio apical em contacto com o lúmen. O seu citoplasma apresenta um grande número de grânulos secretores, sendo estes o local de armazenamento dos seus produtos de secreção. O seu principal produto secretor é a 5-HT, sendo que estas células armazenam 90% da quantidade de 5-HT sintetizada no organismo, para além de armazenarem outras substâncias neuroativas, como as taquicininas, bradicinina e prostaglandinas. A libertação de 5-HT ocorre sob diferentes tipos de estímulos da mucosa, sendo que o estímulo fisiológico para a libertação da 5-HT é principalmente mecânico; contudo, a estimulação vagal e química também são responsáveis pela sua libertação (Hansen, 2003a). *In vivo*, a libertação de 5-HT é sensível à estimulação mecânica ou à acidificação do lúmen do intestino. Tal como se verifica noutros tipos de células enteroendócrinas, os grânulos secretores das células EC encontram-se predominantemente localizados na sua superfície basal, sendo nesta zona onde ocorre maior libertação da 5-HT; porém, também ocorre libertação de 5-HT na superfície apical destas células. A 5-HT secretada tem como alvo principal os IPANs que irão ativar outros circuitos neuronais que por sua vez iniciarão reflexos peristálticos e a atividade secretora intestinal.

Estudos levados a cabo por Schäfermayer et al. (2004) revelaram que existe um largo espectro de recetores especificamente expressos neste tipo de células, como é o caso dos recetores β -adrenérgicos, muscarínicos bem como os recetores GABA-érgicos. Mais, as células EC parecem expressar alguns recetores do olfato e do paladar, levando a crer uma função fisiológica como “célula sentinela” no intestino. Estas células são inervadas diretamente por neurónios colinérgicos e também por neurónios VIP e/ou do polipéptido ativador da adenilato ciclase pituitária, o que permite o controlo da libertação de 5-HT para o lúmen (Hansen, 2003a).

Por fim, a modulação da libertação de 5-HT endógena a partir das células EC tem vindo a ser relacionada com a ação conjunta dos recetores 5-HT₃ e 5-HT₄. Em íleo de cobaias, humano e suíno, estes recetores parecem, respetivamente, estimular e inibir a libertação de 5-HT (Gebauer et al., 1993, Schworer and Ramadori, 1998).

1.4 O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO: IMPACTO NO INTESTINO

O envelhecimento pode ser definido como um desenvolvimento de alterações graduais ao nível da estrutura não devidas à presença de patologia, mas sim associadas a um decréscimo da capacidade funcional do organismo (Wade, 2002), estando tal associado a uma perda de viabilidade e a um aumento de vulnerabilidade. Este processo, irreversível e inevitável, tem um carácter plástico, podendo ser modulado por fatores tanto genéticos, ambientais, moleculares e celulares, como orgânicos destacando-se, em particular, a dieta adotada pelo indivíduo. É acompanhado por uma degeneração fisiológica multidimensional progressiva na qual ocorrem alterações no Sistema Imunitário (SI) responsáveis pela regulação deste tipo de declínios.

O envelhecimento está, de certa forma, associado a uma condição pró-inflamatória crónica de baixo grau, sendo esta atividade composta por eventos locais e pela ativação sistémica do SI inato e adquirido (Zahn et al., 2007, de Magalhaes et al., 2009, Macaulay et al., 2013). Este estado pró-inflamatório pode dever-se a alterações na 5-HT relacionadas com o avanço da idade em vários tecidos e sistemas, sendo que as citocinas pró-inflamatórias podem alterar, quer o metabolismo da 5-HT, quer a síntese da 5-HT ao alterar o metabolismo do triptofano (Fidalgo et al., 2013). Por exemplo, vários estudos em humanos têm demonstrado uma diminuição da afinidade e do número de locais de ligação, expressão proteica e/ou expressão génica dos recetores 5-HT_{2A}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{1A} no cérebro com a progressão da idade; em contrapartida, tal não foi demonstrado ainda em modelos animais como ratos e ratinhos (Fidalgo et al., 2013).

Alterações relacionadas com a idade no sistema da 5-HT são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças ligadas ao envelhecimento, como a Diabetes, incontinência fecal e doenças do foro cardiovascular (Mattson et al., 2004). A idade avançada é considerada como um fator de risco para o desenvolvimento da grande maioria das patologias que afetam o ser humano, sendo que algumas destas, como é o caso de doenças do foro cardíaco, cancro e doenças neurodegenerativas, são das principais causas de morte nos países industrializados, com uma prevalência que tem tendência para aumentar (de Magalhaes et al., 2012).

Apesar de não se encontrar totalmente compreendido tal mecanismo, as ROS já são consideradas como uma das principais determinantes do processo de envelhecimento (Kregel and Zhang, 2007). O *stress* oxidativo é responsável por infligir danos diretos nas macromoléculas como os lípidos, ácidos nucleicos e proteínas, tendo sido identificado maior nível de dano em proteínas em indivíduos idosos, conduzindo muito provavelmente a disfunção enzimática e a vias metabólicas alternativas (de Gonzalo-Calvo et al., 2010).

1.4.1 O Envelhecimento e as perturbações gastrointestinais

O envelhecimento encontra-se associado a um aumento da incidência de perturbações GI, particularmente patologias relacionadas com a motilidade, como a disfagia, obstipação crónica, incontinência fecal e impacção fecal (Salles, 2007, Gallagher and O'Mahony, 2009, Hayden and Weiss, 2011, Korsak et al., 2012), exercendo efeitos negativos na qualidade de vida dos indivíduos. Contudo, é de salientar que apesar de se verificar uma maior prevalência deste tipo de patologias em indivíduos idosos, o envelhecimento por si só constitui apenas um efeito direto minoritário na maioria das funções GI. O processo de absorção de nutrientes a nível intestinal também se revela afetado pelo processo de envelhecimento, sendo que aquele diminui com a idade (Woudstra and Thomson, 2002, Bitar et al., 2011).

A idade avançada encontra-se associada a uma redução da quantidade de neurotransmissores e sua expressão, havendo perda substancial de neurónios e conexões dendríticas no córtex cerebral, mesencéfalo e tronco cerebral. O processo de envelhecimento também afeta significativamente a medula espinal (Bitar et al., 2011). Mais ainda, foi reportado, já por diversas vezes, que ocorre uma diminuição do número de neurónios do SNE tanto em humanos como em roedores, à medida que o envelhecimento dos indivíduos ocorre (Saffrey, 2004, Wade and Cowen, 2004). No que diz respeito a estudos realizados em roedores, sabe-se que a perda de neurónios mientéricos associada à idade no intestino de cobaias, ratos e ratinhos se encontra relacionada com a alimentação *ad libitum*, uma vez que tal não se observa em animais sujeitos a uma dieta com restrição calórica. No entanto, é de realçar que podem existir diferenças nas várias espécies de roedores (Cowen et al., 2000). Sabe-se também que esta perda de neurónios mientéricos é algo que ocorre seletivamente pois foi verificado que os neurónios do tipo colinérgico estão mais suscetíveis a serem afetados por tal fenómeno (Metzger, 2010). A redução do número de neurónios mientéricos permite inferir que existe um decréscimo na *pool* de neurotransmissores libertados, havendo menor quantidade de neurónios a responder aos sinais. Inclusive, foi também realizado um estudo no qual os autores procederam ao cálculo da taxa de perda neuronal para cada órgão do trato GI de ratos, conseguindo demonstrar que a perda neuronal se começa a verificar por volta dos doze meses de idade, sendo que esta degeneração se mantém, seguindo uma tendência linear, até ao fim da vida do animal (Phillips and Powley, 2001). Noutro estudo, verificou-se a existência de alterações de motilidade no trato GI superior e inferior em animais envelhecidos (Wade, 2002). Ao nível das células musculares lisas do trato GI verificam-se alterações dependentes da idade na neurotransmissão colinérgica assim como na resposta do músculo liso à ACh. Sabe-se

que o decréscimo dependente da idade na contração induzida por agonistas se deve a perturbações nas vias de transdução de sinal no músculo liso do trato GI (Bitar et al., 2011).

1.5 OBJETIVOS DO TRABALHO

Deste modo, tendo presente que a metformina é um antidiabético oral, que embora seja primeira escolha em indivíduos diabéticos tipo 2 obesos, é cada mais prescrita a diabéticos tipo 2 não-obesos pelos seus efeitos pleiotrópicos, é objetivo deste estudo averiguar e tentar compreender se o mecanismo subjacente à diarreia induzida pela metformina, será de facto uma diarreia não diabética, provocada pela administração do fármaco, ou se será uma diarreia diabética induzida pela patologia. Mais ainda, dado que a metformina é introduzida na terapêutica aquando do diagnóstico da DMT2, que normalmente se instala em idades mais avançadas da vida do indivíduo, considera-se a hipótese de que a diarreia, se de origem diabética, está provavelmente relacionada com o envelhecimento dos indivíduos. Pretende-se, então, relacionar o envelhecimento com a resposta contráctil intestinal à metformina, na ausência e na presença da doença.

Em estudos anteriores do grupo (Henriques, 2011), onde se procurou compreender os mecanismos farmacológicos subjacentes à diarreia induzida pela metformina, através de estudos funcionais de contração de músculo liso de íleo de rato, concluiu-se que a metformina, através de um mecanismo não neuronal, induziu a libertação de 5-HT a partir das células EC e consequente estimulação de recetores 5-HT₂ das células musculares lisas, sendo que na presença da DMT2 poderá haver um comprometimento na libertação da 5-HT endógena induzida pela metformina, enquanto que a ação pós-sináptica da 5-HT nas camadas musculares parece não ser afetada pela doença. Concluiu-se ainda que a contração basal do órgão na presença da doença pode ser determinante para um maior ou menor efeito da metformina como indutor de diarreia através da libertação de 5-HT.

Posto isto, foram estipulados como objetivos deste trabalho os seguintes:

- Estudar comparativamente a contração intestinal induzida pela metformina e pela 5-HT exógena em ratos *Wistar* controlo e em ratos *Goto-Kakizaki*, um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 2, em duas idades diferentes, 3 meses e 1 ano;
- Avaliar a contribuição das células enterocromafins para o mecanismo de contração intestinal induzido pela metformina nas duas idades, utilizando a reserpina, um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, cujo efeito se traduz na depleção dos grânulos de 5-HT destas células;
- Avaliar a função dos recetores serotoninérgicos pós-sinápticos no mecanismo de contração intestinal induzido pela metformina nas duas idades, utilizando a ritanserina, um antagonista seletivo para os recetores 5-HT₂;

- Realizar estudos imunohistoquímicos no íleo de rato isolado procurando a expressão da proteína S100 β (marcador de inflamação intestinal enteroglial);
- Avaliar a inflamação presente em íleo de rato isolado através de marcadores de inflamação, como é o caso do TNF- α .

CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos provenientes da *Charles River* (Barcelona, Espanha) com 10-12 semanas de idade (3 meses de idade) e com 1 ano de idade. Após a sua chegada, os animais foram mantidos em armários de biotério ventilados, com ciclos de luz/obscuridade de 12 horas, temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e humidade (50-60%) controladas. Durante o período de alojamento, tiveram livre acesso a água e a dieta *standard* para roedores.

Para o trabalho em causa foi ainda utilizado um modelo animal de DMT2, os ratos *Goto-Kakizaki* (GK), com 10-12 semanas de idade (3 meses de idade) e com 1 ano de idade, em colaboração com o Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Estes animais são desenvolvidos através do cruzamento seletivo de ratos *Wistar* que apresentam os níveis de glucose sanguínea mais elevados (tolerância à glucose anormal) ao longo de várias gerações (Goto et al., 1976). Estes ratos desenvolvem hiperglicémia moderada e estável ao longo da sua vida adulta, apresentando também RI assim como secreção de insulina deficiente (Rees and Alcolado, 2005). Contudo, são animais não-obesos (Srinivasan and Ramarao, 2007, Franconi et al., 2008). Sabe-se que, quando nascem, os ratos GK apresentam um número reduzido de ilhéus de *Langerhans* (Miralles and Portha, 2001). Neste rato em adulto, a massa total das células β pancreáticas encontra-se reduzida em 60%, verificando-se o mesmo grau de decréscimo nas reservas de insulina pancreáticas. Para além dos defeitos que ocorrem ao nível das células β pancreáticas, verifica-se sensibilidade à insulina deficiente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (Srinivasan and Ramarao, 2007). Esta estirpe desenvolve certas características que podem servir como objeto de comparação com as complicações associadas à Diabetes em humanos, tais como lesões renais, alterações estruturais em nervos periféricos e anormalidades na retina (Murakawa et al., 2002, Rees and Alcolado, 2005).

De acordo com dados fornecidos pelos nossos colaboradores do Instituto de Fisiologia, por norma, o peso dos animais GK é geralmente inferior ao dos *Wistar*, tanto aos 3 meses (ratos GK: $272,9\pm 5,1$ g, n=14; ratos *Wistar*: $334,2\pm 6,3$ g, n=12) como ao 1 ano de idade (ratos GK: $392,3\pm 7,6$ g, n=29; ratos *Wistar*: $599,8\pm 34,3$ g, n=20). Em relação ao valor das glicémias, avaliadas tanto em jejum como 2 horas após a administração intraperitoneal/oral de glucose, verificou-se o contrário: as glicémias dos animais GK (glicémia em jejum: $117,7\pm 5,04$, n=23) são superiores às dos animais *Wistar* (glicémia em jejum: $75,05\pm 2,27$, n=21). As determinações de glicémia foram realizadas nos animais diabéticos (Glucometer Elite, Bayer SA, Portugal) com sangue total, colhido

na veia da cauda, em jejum e 2 horas após a administração intraperitoneal/oral de glucose na dose de 1,75 g/kg de peso do animal – prova de tolerância à glucose intraperitoneal/oral (PtGIP/PtGO).

Sendo assim, no trabalho prático foram utilizados quatro grupos de animais com idades diferentes (Tabela II).

Tabela II. Grupos de animais utilizados no trabalho experimental.

Grupo	Idades	
Controlos: Ratos <i>Wistar</i>	3 meses de idade	1 ano de idade
Modelos da DMT2: Ratos GK	3 meses de idade	1 ano de idade

2.1.1. Recolha de amostras

Os animais foram depois sacrificados por decapitação. A porção intestinal correspondente ao íleo distal (junto da válvula ileocecal) foi isolada e removida. O íleo foi colocado imediatamente numa solução de *Krebs-Henseleit* (118,67 mM NaCl; 5,36 mM KCl; 0,57 mM MgSO₄.7H₂O; 1,90 mM CaCl₂; 0,90 mM KH₂PO₄.2H₂O; 25 mM NaHCO₃; 11,1 mM glicose; pH 7,4) gelada e oxigenada com carbogénio (mistura de 95% de O₂ – 5% de CO₂). O órgão foi lavado, sendo removido o conteúdo intestinal assim como as porções de mesentério adjacentes ao órgão. Em seguida, o íleo foi dividido em diversos segmentos de aproximadamente 1,5 cm a serem imediatamente utilizados nos estudos funcionais; outros foram fixados em formol, tamponado a pH 6,9, e processados de forma convencional para as técnicas de histologia e de imunohistoquímica; e ainda outros foram congelados a -80°C para posterior lise e homogeneização.

2.2. ESTUDOS FUNCIONAIS

2.2.1. Isolamento e montagem do órgão

Os segmentos intestinais foram suspensos em hastes, colocados em banhos de órgãos de 15 ml e mantidos em solução fisiológica a 37°C, sob a tensão basal de 29,4 mN, de acordo com a metodologia descrita por Santos (2005) (Figura 5). A tensão ótima basal foi determinada em experiências realizadas anteriormente nas quais se estudou a resposta contráctil do órgão a 100 µM de ACh sob diferentes tensões. A tensão basal

em cada experiência foi aquela que ocorreu espontaneamente no tecido submetido à tensão ótima, após o período de equilíbrio que se segue à montagem do órgão.

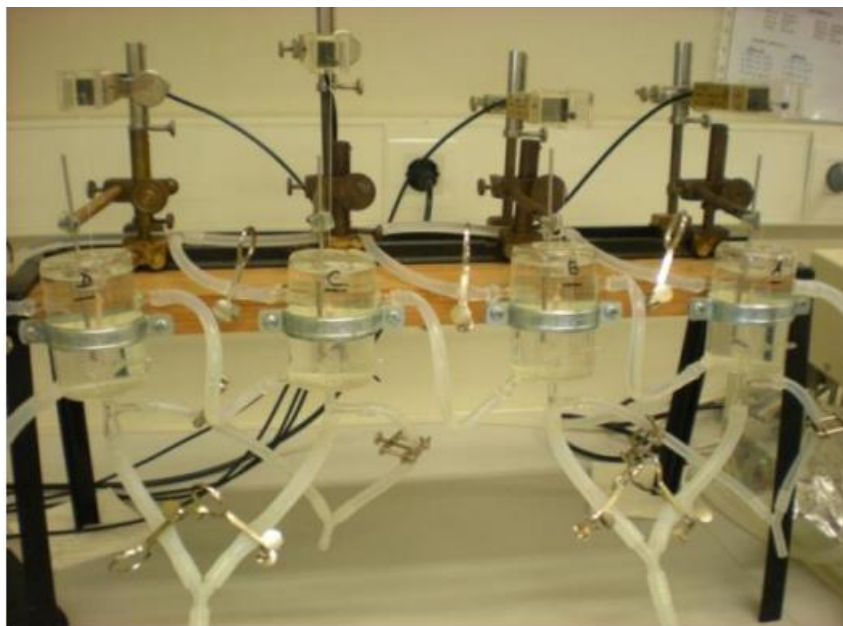


Figura 5. Segmentos de íleo montados em banhos de órgãos de 15 ml.

2.2.2. Protocolo experimental

Após um período de equilíbrio de duas horas com lavagens periódicas foram registradas, com recurso a transdutores eletrônicos de força (*Letica Scientific Instruments*) ligados a um polígrafo de quatro canais (*Polygraph 4006, Letica Scientific Instruments*), as contrações das curvas concentração-resposta (CR) de adições independentes de metformina ou 5-HT.

Inicialmente todos os segmentos intestinais foram sujeitos a 100 μM de ACh exógena para induzir diretamente a contração máxima do músculo liso do íleo e, desta forma, ser possível a comparação dos resultados de experiências diferentes. Em todas as experiências foram efetuadas duas curvas CR de adições independentes de metformina ou 5-HT (consoante o protocolo em execução), sendo a primeira curva efetuada na ausência de qualquer fármaco antagonista. Quinze minutos antes de cada dose da segunda curva CR à metformina (1-36 μM) ou 5-HT (0,1-60 μM) foram adicionados os seguintes compostos: 1 μM de ritanserina (antagonista não seletivo dos recetores 5-HT₂), ou 100 μM de reserpina (inibidor do transportador vesicular de monoaminas). Entre cada uma das adições, foram feitas lavagens repetidas com solução fisiológica até a preparação atingir novamente a linha de base.

Em todas as experiências foram utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionou apenas o solvente apropriados para cada fármaco antagonista/inibidor. Cada segmento serviu de controlo de si próprio: as respostas contrácteis da segunda curva CR foram expressas em percentagem da contração máxima obtida na primeira curva CR do respetivo segmento, executada sempre na ausência de qualquer antagonista/inibidor. Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta obtida nos segmentos controlo.

Os resultados foram igualmente analisados em mN de tensão de modo a traduzir em valores absolutos a eficácia/atividade intrínseca ($E_{máx}$, efeito máximo) da metformina e da 5-HT em induzir contração; a potência destes fármacos foi traduzida em termos de pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva não cumulativa CR em escala semilogarítmica (percentagem da contração máxima versus logaritmo da concentração em mol/L), com recurso ao programa informático *Curve Expert* (versão 1.4 para Windows).

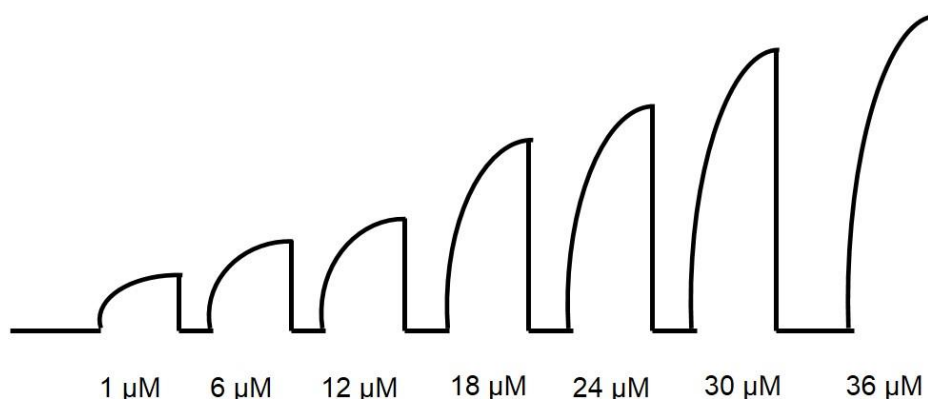


Figura 6. Representação de uma curva Concentração-Resposta (CR) de adições independentes à metformina.

2.2.3. Tratamento dos dados e análise estatística

Foram avaliadas as diferenças entre os valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} da primeira e segunda curvas CR de metformina e de 5-HT, assim como as diferenças entre as respostas contrácteis induzidas por cada dose de metformina e 5-HT na ausência (controlo) e na presença dos diferentes fármacos antagonista/inibidor utilizados. Para tal, foi utilizado o teste de *t* de *Student* para dados não emparelhados na determinação das diferenças estatísticas entre dois grupos de valores. Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da

média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de experiências (n) indicado. Toda a análise estatística foi feita com recurso ao programa informático IBM SPSS *Statistics*.

2.2.4. Reagentes e fármacos utilizados nos estudos funcionais

Os reagentes utilizados na preparação da solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* foram adquiridos na Panreac (Barcelona, Espanha) e foram produtos *pro analysi*. Os seguintes fármacos foram utilizados para os estudos funcionais: cloridrato de metformina, cloridrato de acetilcolina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina e reserpina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA); e ritanserina (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). As soluções foram preparadas com os solventes indicados pelos fabricantes, nomeadamente o dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

2.3. TÉCNICAS DE HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Com o objetivo de verificar possíveis sinais de inflamação nos segmentos de íleo de rato *Wistar* e GK, foram realizados estudos histoquímicos (coloração com hematoxilina/eosina – HE) e imunohistoquímicos, recorrendo a um marcador de inflamação intestinal enteroglial – a proteína S100 β . A proteína S100 β , pertencente à superfamília de proteínas S100 que ligam Ca²⁺-Zn²⁺, é um homodímero da subunidade β que no cérebro, em concentrações nanomolares, promove sobrevivência neuronal e proliferação de astrócitos. No entanto, em concentrações micromolares, esta proteína parece estar relacionada com patologias como a doença de *Alzheimer* e a síndrome de *Down*. No intestino humano esta proteína é expressa por células gliais entéricas. Dados recentes apontam a correlação entre a sobreexpressão e libertação de S100 β com estados inflamatórios intestinais. Esta proteína é considerada como uma citocina pró-inflamatória de fácil difusibilidade que ganha acesso ao compartimento extracelular especialmente em locais do intestino de reação inflamatória (Cirillo et al., 2011).

Os segmentos de íleo foram isolados e fixados em formol, tamponizado a pH 6,9 e processados de modo convencional, com posterior inclusão em parafina. Realizaram-se cortes histológicos de 3 μ m de espessura que foram sujeitos inicialmente a coloração com HE.

No que diz respeito aos estudos imunohistoquímicos, em primeiro lugar, os cortes foram desparafinados, rehidratados (xilol, álcool absoluto e álcool a 95°) e azulados em

água corrente. A peroxidase endógena foi inibida por incubação dos cortes com H₂O₂ a 3%, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, realizou-se a recuperação antigénica através de microondas, em tampão citrato de sódio 10% (v/v) e a pH 6, durante 20 minutos a 480 Watts. Arrefecido o tampão, e depois de lavar com tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*, PBS, LabVision) incubou-se com o anticorpo monoclonal primário de coelho anti-S100β de rato (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), na diluição de 1:250 durante 30 minutos; em seguida incubou-se com o pós primário durante 8 minutos, isto é, um ativador da penetração do polímero contendo soro animal a 10% (v/v) em soro tamponado com tris/ProClin™ 950 a 0,09%. A incubação com o polímero ligado à peroxidase (NovoLink™ Polymer, HRP Poli-IgG de anti-ratinho/coelho a 8μ/ml, contendo soro animal a 10% (v/v) em soro tamponado com tris/ProClin™ 950 a 0,09%) realizou-se posteriormente à temperatura ambiente e em câmara húmida e teve a duração de 8 minutos, de acordo com as recomendações do fabricante. Após lavagens dos cortes com PBS estes foram revelados através de uma solução de diaminobenzidina (DAB) a 1,74% p/v, numa solução estabilizadora, durante 10 minutos. Por fim, contrastaram-se as lâminas com hematoxilina a 0,02% durante 5 minutos, procedendo-se à diafanização, desidratação e montagem em meio sintético.

2.4. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO ÍLEO DE RATO

Segmentos de íleo de rato pertencentes aos quatro grupos de animais em estudo foram pesados e homogeneizados manual e mecanicamente com recurso a um homogeneizador *Potter-Elvehjem*, a 4°C, num volume variável de tampão de lise RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EGTA, 1% (v/v) *Triton X-100*, 0,5% (m/v) desoxicolato de sódio e 0,1% (m/v) SDS), suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (*Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks*, Roche) e de inibidores de fosfatases (*PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks*, Roche), consoante o tamanho e massa do segmento. Após incubação em gelo para solubilização durante 1 hora, os lisados foram sonicados (em vários pulsos de 5 segundos) e centrifugados a 13200 rpm, durante 10 min, a 4°C.

Após centrifugação, a fração de sobrenadante, correspondendo ao extrato total, foi recolhida e a concentração de proteína foi determinada usando o ensaio do ácido bicinconínico (BCA) (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Pierce Biotechnology, Rockfor, IL, USA). Este método, no qual ocorre redução do Cu²⁺ a Cu⁺ pela proteína em meio

alcalino, permite uma deteção colorimétrica seletiva e altamente sensível deste último cátion, usando um único reagente constituído pelo ácido bicinconínico. O produto de reação deste ensaio apresenta uma coloração roxa, resultante da quelatação de duas moléculas de BCA com um ião Cu^+ , sendo de realçar que este complexo é solúvel em água e apresenta forte absorvância a 562 nm, podendo a absorvância ser medida entre 540 e 590 nm. Uma das particularidades deste método é o de permitir a linearidade dos resultados, permitindo quantificar proteína numa escala alargada (20-2000 $\mu\text{g/ml}$). A leitura das absorvâncias foi realizada a 570 nm com recurso ao *Gen5 Data Analysis Software*.

2.5. ELISA - ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

A ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica baseada no princípio da “sandwich” de anticorpo. Nesta, um antigénio fica imóvel numa superfície sólida, sendo depois complexado a um anticorpo que se encontra ligado a uma enzima. A deteção do analito de interesse é possível pois ao incubar este complexo-enzima com um substrato, este produz um produto detetável.

No âmbito deste trabalho experimental, esta técnica foi realizada para medição quantitativa de $\text{TNF-}\alpha$ nos extratos totais de íleo de rato. Concentrações elevadas de $\text{TNF-}\alpha$ são encontradas em situações de inflamação crónica e aguda, uma vez que esta se trata de uma molécula mediadora de respostas inflamatórias e imunitárias. Esta molécula é produzida por diferentes tipos de células, como os monócitos, macrófagos, astrócitos, granulócitos, linfócitos T e B, células *Natural Killer* (NK), fibroblastos e certas células tumorais. Foi utilizado um *kit* – Rat $\text{TNF-}\alpha$ ELISA Development Kit (Peprotech, Reino Unido) e o protocolo realizado foi o recomendado pelo fabricante do mesmo. A leitura da placa foi feita no *Multiscan EX (Thermo Electron Corporation)* a 405 nm com correção do comprimento de onda a 630 nm; o *software* informático utilizado foi o *Ascent Software Version 2.6*.

2.5.1. Tratamento dos dados e análise estatística

A concentração de $\text{TNF-}\alpha$ foi calculada a partir da curva de calibração, realizada em duplicado, obtida através de uma série de diluições de $\text{TNF-}\alpha$ recombinante de rato de 3000 pg/ml a 0 pg/ml.

Para avaliar a significância das diferenças estatísticas entre os quatro grupos de animais foi utilizado o teste ANOVA (*Analysis of variance*) seguido do teste de *Tukey* de comparações múltiplas. Os valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de experiências (n) indicado. A análise estatística foi feita com recurso ao programa informático IBM SPSS *Statistics*.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

3.1. RESPOSTA CONTRÁCTIL À METFORMINA DO ÍLEO DE RATO COM UM ANO DE IDADE

3.1.1. Caracterização farmacológica da metformina em íleo de rato *Wistar* com um ano de idade

A metformina, testada em concentrações terapêuticas (1-36 μM) induziu contrações dependentes da concentração no íleo isolado de rato com 1 ano de idade. Foram efetuadas duas curvas sucessivas não cumulativas CR à metformina, cujos parâmetros farmacológicos se encontram descritos na tabela III. Observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$, teste t de *Student*) na eficácia do fármaco entre a primeira e a segunda curva CR como o traduzem os valores de $E_{\text{máx}}$ ($E_{\text{máx}}$ da 1ª curva CR: $4,56 \pm 0,33$ mN, $n=63$ vs $E_{\text{máx}}$ da 2ª curva CR: $7,49 \pm 0,66$ mN, $n=27$). Em relação à potência deste fármaco, observa-se que a mesma não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre a primeira e a segunda curvas CR, apesar de haver uma tendência para o aumento da potência na segunda curva.

Tabela III. Respostas contrácteis à metformina do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade.

	$E_{\text{máx}}$ (mN)	n	$p\text{EC}_{50}$	n
1ª Curva CR	$4,56 \pm 0,33$	63	$5,09 \pm 0,07$	32
2ª Curva CR	$7,49 \pm 0,66^*$	27	$5,50 \pm 0,31$	17

$E_{\text{máx}}$ = contração máxima em mN de tensão; $p\text{EC}_{50}$ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste t de *Student*. * $p < 0,05$ vs 1ª curva concentração-resposta (CR).

3.1.2. Ação da reserpina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato *Wistar* com um ano de idade

Como mencionado na introdução, cerca de 90-95% da 5-HT é sintetizada, armazenada e libertada pelas células EC localizadas na parede intestinal. Sendo assim, é pertinente avaliar a influência destas células na contractilidade intestinal induzida pela metformina.

Foram efetuadas curvas CR à metformina na ausência (controlo, $n=11$) e na presença de 100 μM de reserpina ($n=12$), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, cujo efeito se traduz na depleção do *pool* vesicular das células EC.

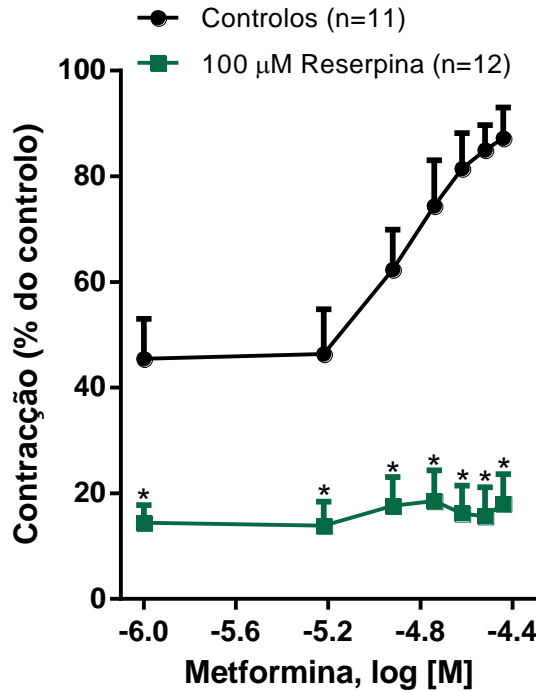


Figura 7. Resposta contráctil do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 µM de reserpina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo.

A reserpina bloqueou a resposta contráctil à metformina em 68,7%, neste modelo animal com 1 ano de idade, podendo observar-se diferenças estatisticamente significativas em todas as doses (Figura 7). Desta forma, é possível concluir que a metformina provoca contração intestinal indiretamente através da libertação da 5-HT a partir das células EC.

3.1.3. Ação da ritanserina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato *Wistar* com um ano de idade

Foram igualmente efetuadas curvas CR à metformina na ausência (controlo, n=15) e na presença de 1 µM de ritanserina (n=14), um antagonista não seletivo dos recetores 5-HT₂. Verificou-se que a ritanserina antagonizou de forma não competitiva a resposta

contráctil da metformina, com redução da resposta máxima em 39,8%, tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas em todas as doses da curva CR (Figura 8).

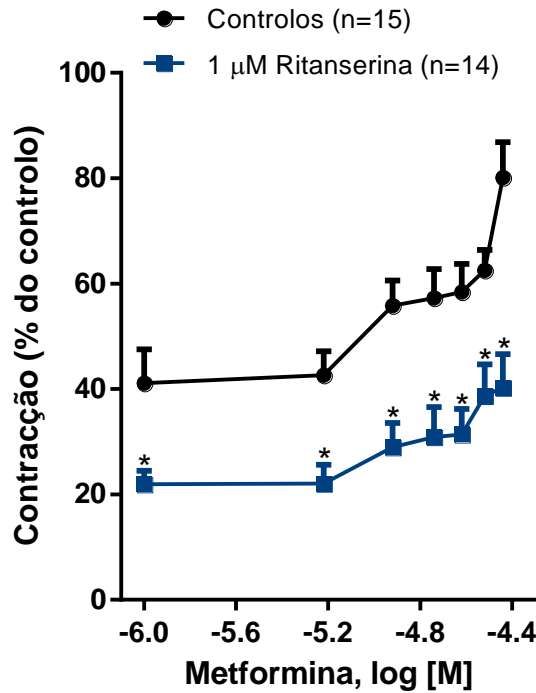


Figura 8. Resposta contráctil do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de ritanserina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo.

3.1.4. Caracterização farmacológica da metformina em íleo de rato GK com um ano de idade

Os parâmetros farmacológicos da metformina em íleo de rato GK com 1 ano de idade encontram-se descritos na Tabela IV. Observa-se um aumento bastante significativo ($p < 0,05$, teste *t* de *Student*) na eficácia do fármaco da primeira para a segunda curva CR, traduzido pelos valores de $E_{máx}$ ($E_{máx}$ da 1ª curva CR: $5,80 \pm 0,45$ mN, $n=32$ vs $E_{máx}$ da 2ª curva CR: $12,28 \pm 1,68$ mN, $n=15$). Em relação à potência deste fármaco, não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre a primeira e a segunda curvas CR, havendo uma tendência para uma diminuição da potência da metformina da primeira para a segunda curva CR.

Tabela IV. Respostas contrácteis à metformina do íleo de rato GK com 1 ano de idade.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
1ª Curva CR	5,80±0,45	32	5,33±0,19	14
2ª Curva CR	12,28±1,68*	15	5,00±0,12	12

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * *p* < 0,05 vs 1ª curva concentração-resposta (CR).

3.1.5. Ação da reserpina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato GK com um ano de idade

No íleo de rato GK efetuaram-se também curvas CR à metformina na ausência (controlo, n=7) e na presença de 100 µM de reserpina (n=8). A reserpina bloqueou a resposta contráctil da metformina em 70,6%, tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas em todas as doses da curva CR (Figura 9).

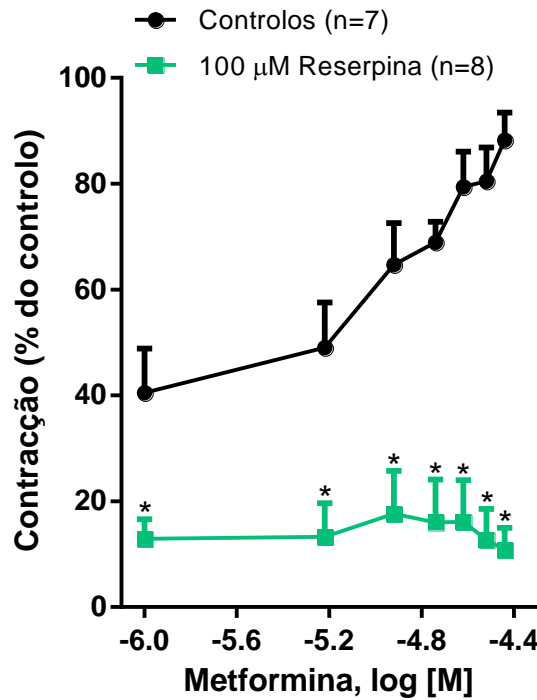


Figura 9. Resposta contráctil do íleo de rato GK com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 µM de reserpina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

3.1.6. Ação da ritanserina na resposta contráctil à metformina do íleo de rato GK com um ano de idade

De igual modo, no íleo isolado de rato GK foram também efetuadas curvas CR à metformina na ausência (controlo, n=7) e na presença de 1 µM de ritanserina (n=8). A ritanserina não alterou significativamente a resposta contráctil da metformina. Embora com uma redução não significativa da resposta máxima de 24,7% e diferenças estatisticamente significativas na quinta e sexta doses da curva CR, não se observou um desvio para a direita da curva CR, que podia indiciar um antagonismo do tipo competitivo (pEC_{50} $4,78 \pm 0,05$, n=7 vs pEC_{50} $5,18 \pm 0,29$, n=7, na presença de 1 µM de ritanserina) (Figura 10).

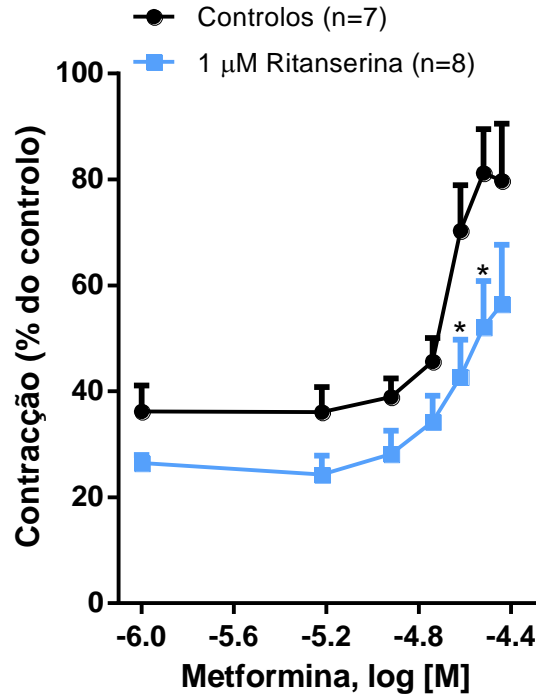


Figura 10. Resposta contráctil do íleo de rato GK com 1 ano de idade à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de ritanserina (■); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

3.2. RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO *Wistar* E *GK* À METFORMINA: IMPACTO DA PATOLOGIA E DA IDADE

Em estudos anteriores do grupo, como já mencionado anteriormente, foi feita a caracterização farmacológica da contração intestinal induzida pela metformina em íleo isolado de rato *Wistar* e *GK* (Henriques, 2011) (Tabela V).

Tabela V. Respostas contrácteis à metformina do íleo de ratos *Wistar* e GK com 3 meses de idade. Retirado de Henriques (2011).

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos <i>Wistar</i> 3 meses	12,20±0,80	48	4,89±0,03	47
Ratos GK 3 meses	8,92±0,94*	14	4,96±0,08	11

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs ratos *Wistar* 1 ano.

Tabela VI. Respostas contrácteis à metformina do íleo de ratos *Wistar* e GK com 1 ano de idade.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos <i>Wistar</i> 1 ano	7,49±0,66	27	5,50±0,31	17
Ratos GK 1 ano	12,28±1,67*	15	5,00±0,12	12

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs ratos *Wistar* 1 ano.

Quando comparados com os resultados obtidos nos mesmos modelos animais, mas com um ano de idade (Tabela VI) verificou-se que nos ratos *Wistar* com 3 meses a metformina apresentou maior eficácia (E_{máx} 12,20±0,80 mN, n=48) comparativamente aos animais diabéticos da mesma idade (E_{máx} 8,92±0,94 mN, n=14). Nos animais mais velhos verifica-se o contrário: nos animais GK, diabéticos, a metformina apresenta maior eficácia (E_{máx} 12,28±1,68 mN, n=15) quando comparados com os animais controlo da mesma idade (E_{máx} 7,49±0,66 mN, n=27). Tal sugere que a presença da patologia aumenta a eficácia da metformina.

No que diz respeito à potência deste fármaco, traduzida em valores de pEC₅₀, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos de dados comparativos.

Visto que o foco principal deste trabalho é o papel do envelhecimento na resposta contráctil induzida pela metformina, é importante estudar comparativamente as respostas contrácteis do íleo à metformina em animais de 3 meses de idade, com as de animais envelhecidos, isto é, com 1 ano de idade.

Nos animais *Wistar* (situação controlo), verifica-se uma redução substancial da eficácia da metformina com a idade, tendo sido observadas diferenças estatisticamente

significativas entre o grupo dos animais com 3 meses e o grupo dos animais com 1 ano. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à potência da metformina (Tabela VII).

Tabela VII. Impacto da idade na potência e eficácia da metformina em animais *Wistar*.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos <i>Wistar</i> 3 meses	12,20±0,80	48	4,89±0,03	47
Ratos <i>Wistar</i> 1 ano	7,49±0,66*	27	5,50±0,31	17

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * *p* < 0,05 vs ratos *Wistar* 3 meses.

Já nos animais diabéticos, verifica-se um aumento da eficácia da metformina nos animais GK com 1 ano em comparação com os animais diabéticos com 3 meses. Em relação à potência deste fármaco neste modelo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de idades (Tabela VIII).

Tabela VIII. Impacto da idade na potência e eficácia da metformina em animais GK.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos GK 3 meses	8,92±0,94	14	4,96±0,08	11
Ratos GK 1 ano	12,93±1,66*	14	5,00±0,12	12

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * *p* < 0,05 vs ratos GK 3 meses.

3.3. RESPOSTA CONTRÁCTIL À 5-HT DO ÍLEO DE RATO COM UM ANO DE IDADE

Tendo sido verificado em trabalhos anteriores (Henriques, 2011) o envolvimento da 5-HT na resposta contráctil de segmentos de íleo de rato à metformina, considerou-se importante estudar também a resposta contráctil à 5-HT exógena em íleo isolado de animais envelhecidos, controlos (*Wistar*) e diabéticos (GK). A 5-HT (0,1-60 µM) induziu contrações dependentes da concentração, tanto na ausência, como na presença da doença (Figuras 11 e 12).

3.3.1. Caracterização farmacológica da 5-HT em íleo de rato *Wistar* com um ano de idade

Os parâmetros farmacológicos da 5-HT em íleo de rato *Wistar* encontram-se na Tabela IX. Nesta situação controlo verifica-se que a atividade intrínseca da 5-HT é significativamente superior na segunda curva CR ($E_{máx}$ 6,06±0,89 mN, n=17) em comparação com a primeira curva CR ($E_{máx}$ 3,73±0,30, n=47). Quanto à potência da 5-HT nesta situação, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas curvas CR, sendo os valores de pEC_{50} bastante similares.

Tabela IX. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade .

	$E_{máx}$ (mN)	n	pEC_{50}	n
1ª Curva CR	3,73±0,30	47	6,00±0,25	13
2ª Curva CR	6,06±0,89*	17	5,88±0,18	16

$E_{máx}$ = contração máxima em mN de tensão; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*.
* $p < 0,05$ vs 1ª curva concentração-resposta (CR).

3.3.2. Ação da ritanserina na resposta contráctil à 5-HT do íleo de rato *Wistar* com um ano de idade

Foram efetuadas curvas CR à 5-HT na ausência (controlo, n=19) e na presença de 1 μ M de ritanserina (n=15). A ritanserina alterou significativamente a curva CR à 5-HT, indicando um antagonismo de tipo não competitivo, com redução da resposta máxima de 34,4% e um desvio para a direita estatisticamente significativo (pEC_{50} 5,88±0,18, n=16 vs pEC_{50} 5,23±0,23, n=9, na presença de 1 μ M de ritanserina, $p=0,039$).

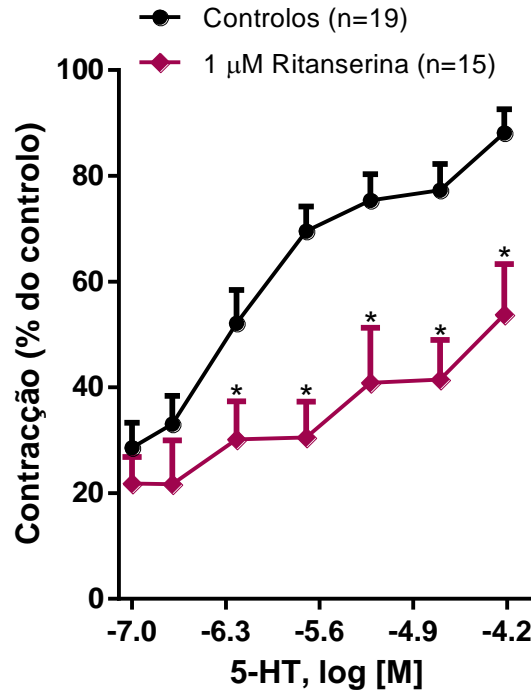


Figura 11. Resposta contráctil do íleo de rato *Wistar* com 1 ano de idade à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de ritanserina (◆); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo.

3.3.3. Caracterização farmacológica da 5-HT em íleo de rato GK com um ano de idade

Os parâmetros farmacológicos traduzidos em termos de atividade intrínseca ($E_{máx}$) e potência (pEC_{50}) da 5-HT estão representados na Tabela X. Verifica-se um ligeiro aumento da atividade intrínseca da 5-HT na segunda curva CR ($E_{máx}$ $12,53 \pm 2,27$ mN, $n=7$) em relação à primeira curva CR ($E_{máx}$ $9,15 \pm 1,35$ mN, $n=16$), embora não estatisticamente significativo. No que diz respeito à potência da 5-HT, também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas curvas CR.

Tabela X. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de rato GK com 1 ano de idade.

	$E_{m\acute{a}x}$ (mN)	n	pEC_{50}	n
1ª Curva CR	9,15±1,35	16	6,42±0,18	12
2ª Curva CR	12,53±2,27	7	6,17±0,20	7

$E_{m\acute{a}x}$ = contração máxima em mN de tensão; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*.

3.3.4. Ação da ritanserina na resposta contráctil à 5-HT do íleo de rato GK com um ano de idade

No íleo isolado de rato GK foram igualmente efetuadas curvas CR à 5-HT na ausência (controlo, n=8) e na presença de 1 μ M de ritanserina (n=8).

A ritanserina alterou significativamente a curva CR à 5-HT, indicando um antagonismo de tipo não competitivo, com um desvio para a direita estatisticamente significativo (pEC_{50} 6,17±0,20, n=7 vs pEC_{50} 5,36±0,28, n=7, na presença de 1 μ M de ritanserina, $p=0,038$) e com uma redução significativa da resposta máxima (36,4%).

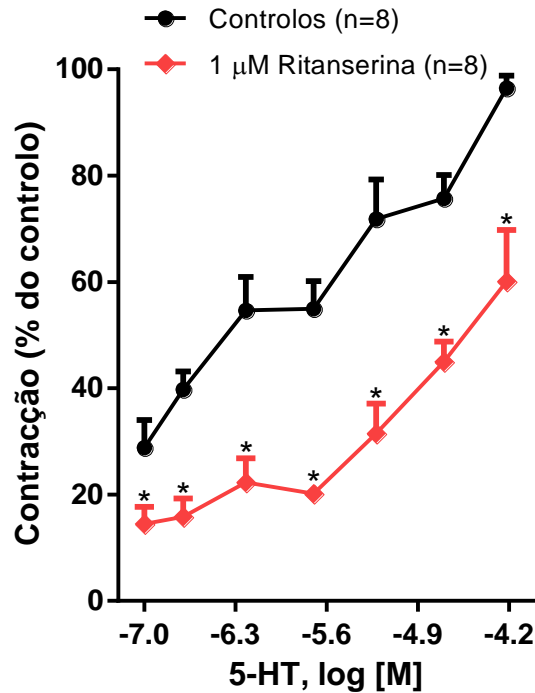


Figura 12. Resposta contráctil do íleo de rato GK com 1 ano de idade à 5-HT na ausência (●, controlo) e na presença de 1 µM de ritanserina (◆); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M; as barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

3.4. RESPOSTA CONTRÁCTIL DO ÍLEO DE RATO *Wistar* E *GK* À 5-HT: IMPACTO DA PATOLOGIA E DA IDADE

Também em estudos anteriores do grupo foram realizadas curvas CR à 5-HT exógena em íleo isolado de rato *Wistar* e *GK* com 3 meses de idade (Henriques, 2011) (Tabela XI), não se tendo verificado diferenças significativas, quer na atividade intrínseca, quer na potência da 5-HT, com a presença da patologia. Resultados idênticos foram obtidos nos mesmos modelos animais, mas com um ano de idade (Tabela XII), embora nos diabéticos se tenha observado uma maior tendência para uma atividade intrínseca da 5-HT superior comparativamente ao grupo controlo ($E_{máx} 11,11 \pm 2,43$ mN, $n=8$ vs $E_{máx} 6,73 \pm 1,25$ mN, $n=19$).

Tabela XI. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de ratos *Wistar* e GK com 3 meses de idade. Retirado de Henriques (2011).

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos <i>Wistar</i> 3 meses	15,91±2,13	14	5,76±0,21	14
Ratos GK 3 meses	18,11±2,46	4	6,37±0,25	4

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*.

Tabela XII. Respostas contrácteis à 5-HT do íleo de ratos *Wistar* e GK com 1 ano de idade.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos <i>Wistar</i> 1 ano	6,73±1,25	19	5,88±0,18	16
Ratos GK 1 ano	11,11±2,43	8	6,17±0,20	7

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*.

Uma vez mais, como o tema desta dissertação se relaciona com o papel do envelhecimento, é importante também estudar comparativamente as respostas contrácteis do íleo à 5-HT exógena em animais com 3 meses e com 1 ano de idade.

Nos animais *Wistar* (situação controlo) envelhecidos, verifica-se uma redução substancial ($p=0,000..$) da atividade intrínseca da 5-HT, tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo dos animais com 3 meses e o grupo dos animais com 1 ano. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito à potência da 5-HT (Tabela XIII).

Tabela XIII. Impacto da idade na atividade intrínseca e potência da 5-HT exógena em animais *Wistar*.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos <i>Wistar</i> 3 meses	15,91±2,13	14	5,76±0,21	14
Ratos <i>Wistar</i> 1 ano	6,73±1,25*	19	5,88±0,18	16

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs ratos *Wistar* 3 meses.

Nos animais diabéticos, embora se tenha verificado igualmente uma diminuição da atividade intrínseca da 5-HT nos animais com 1 ano de idade em comparação com os animais com 3 meses, esta não foi tão substancial quanto a observada nos animais controlo. Mais uma vez, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na potência da 5-HT entre os animais com 3 meses e os animais com 1 ano (Tabela XIV).

Tabela XIV. Impacto da idade na atividade intrínseca e potência da 5-HT exógena em animais GK.

	E_{máx} (mN)	n	pEC₅₀	n
Ratos GK 3 meses	18,11±2,46	4	6,37±0,25	4
Ratos GK 1 ano	11,11±2,43	8	6,17±0,20	7

E_{máx} = contração máxima em mN de tensão; pEC₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contração máxima; n = número de experiências; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*.

3.5. ESTUDOS HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS SEGMENTOS DE ÍLEO DE RATO *WISTAR* E GK

Nos painéis das Figuras 13 e 14 estão apresentadas secções representativas de segmentos de íleo de ratos *Wistar* e GK pertencentes aos dois grupos de idades. Foram submetidos a técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas amostras de íleo de sete ratos de cada grupo. O padrão de imunoreactividade foi consistente em todas as secções obtidas do número de amostras. Utilizou-se como controlo positivo da proteína S100β a marcação obtida em secções de cólon humano.

Foram observadas diferenças entre os animais controlo (*Wistar*) e os diabéticos (GK), sendo que estas foram mantidas com a idade. Identificaram-se células com expressão nuclear para a proteína S100β, na lâmina própria da mucosa, bem como em placas de *Peyer* ou tecido linfoide associado à mucosa (*Mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT), podendo corresponder a histiócitos de *Langerhans* pela localização, morfologia celular e imunomarcação.

Tabela XV. Imunomarcação à proteína S100 β no íleo de rato isolado.

	<i>Wistar</i> 3 meses	<i>Wistar</i> 1 ano	GK 3 meses	GK 1 ano
Epitélio	+	-	-	-
Células musculares lisas	+	+	+	++
Células ganglionares	Plexo Submucoso	++	++	+
	Plexo Mientérico	+++	+++	++
Histiócitos de <i>Langerhans</i> (lâmina própria da mucosa)	+	+	+++	+++
Tecido linfoide associado à mucosa (MALT)	+	-	++	+++

Cut-off semi-quantitativamente (- (0), + (<10%), ++ (10-50%), +++ (>50%)).

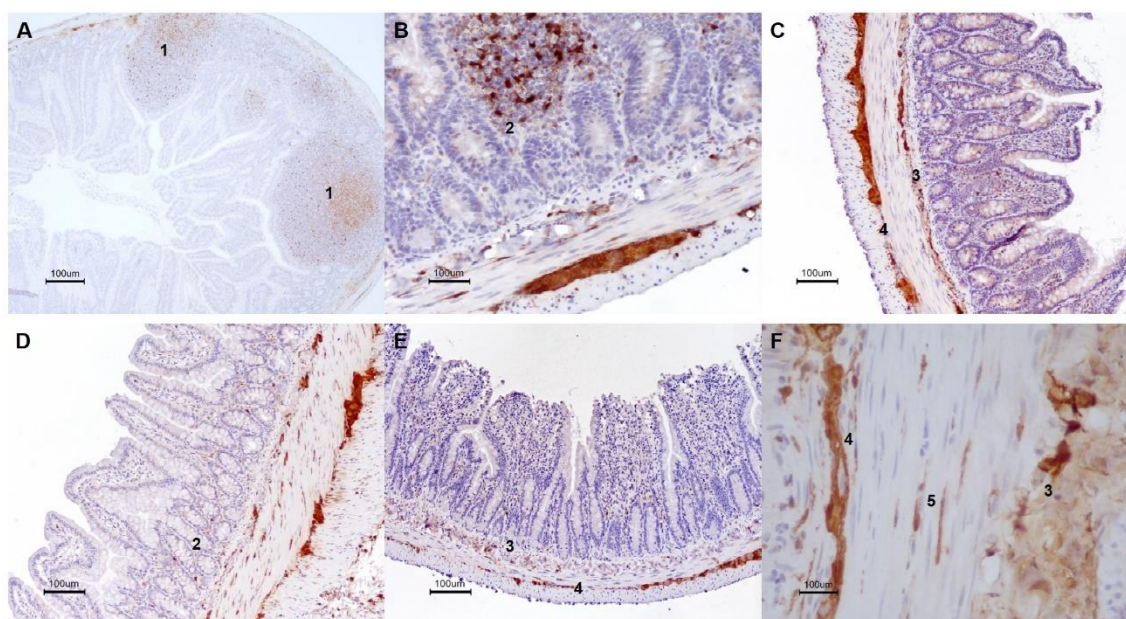


Figura 13. Técnica de imunohistoquímica no íleo isolado de rato. Os seis painéis (A, X40; B, X200; C, X100; D, X100; E, X100; F, X400) referem-se a secções com imunoreactividade à proteína S100 β (a castanho). A, B e C, rato *Wistar* com 3 meses de idade; D, E e F, rato *Wistar* com 1 ano de idade. Células S100 β positivas em placas de *Peyer* (1), na lâmina própria da mucosa (2), células ganglionares do plexo submucoso (3) e mientérico (4), e células musculares lisas (5).

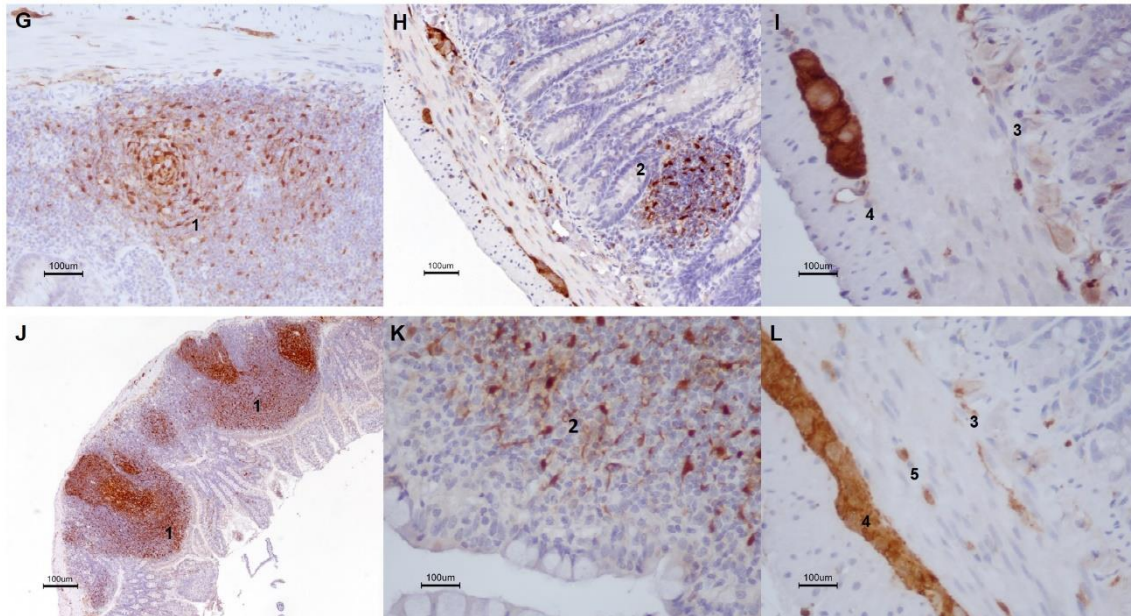


Figura 14. Técnica de imunohistoquímica no íleo isolado de rato. Os seis painéis (G, X200; H, X200; I, X400; J, X40; K, X400; L, X400) referem-se a secções com imunoreactividade à proteína S100 β (a castanho). G, H e I, rato GK com 3 meses de idade; J, K e L, rato GK com 1 ano de idade. Células S100 β positivas em placas de *Peyer* (1), na lâmina própria da mucosa (2), células ganglionares do plexo submucoso (3) e mientérico (4), e células musculares lisas (5).

3.6. NÍVEIS DE TNF- α EM ÍLEO DE RATO *WISTAR* E GK

A partir de um grupo de 6-12 animais representativos dos quatro grupos em estudo foram avaliados os níveis de TNF- α de dez experiências independentes realizadas em dias diferentes. Os níveis desta citocina inflamatória no íleo de rato *Wistar* com 3 meses de idade são bastante similares aos níveis no íleo de rato GK de idade correspondente. Os ratos *Wistar* com 1 ano de idade apresentam os níveis mais elevados desta citocina inflamatória; por outro lado, o grupo dos ratos GK com a mesma idade apresenta os menores níveis de TNF- α . Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os 4 grupos, excetuando entre os ratos *Wistar* de 1 ano de idade e os GK de igual idade ($p < 0,05$).

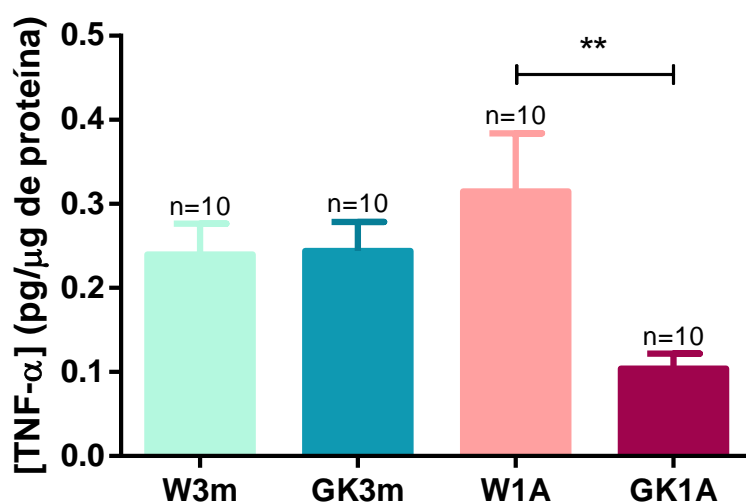


Figura 15. Níveis de TNF- α (pg/ μ g de proteína) no fígado de rato. W3m, rato *Wistar* com 3 meses de idade; GK3m, rato GK com 3 meses de idade; W1A, rato *Wistar* com 1 ano de idade; GK1A, rato GK com 1 ano de idade. Todos os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M. do número de experiências (n) indicado. As barras verticais representam S.E.M.. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. * $p < 0,05$ *Wistar* 1 ano vs GK 1 ano.

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO

A DMT2 em indivíduos não-obesos é cada vez mais um fenómeno que assola a população a nível mundial, com principal foco nos continentes Europeu e Asiático (Vaag and Lund, 2007). Tem-se verificado uma crescente preocupação em contrariar esta tendência, que não passa apenas por alterações dos hábitos e estilos de vida, mas também pelo recurso a fármacos antidiabéticos, como é o caso da metformina. Esta biguanida é o fármaco antidiabético de primeira linha em indivíduos diabéticos obesos, mas tem-se revelado também eficaz em não-obesos (Ong et al., 2006, Ito et al., 2010), possuindo igual eficácia nestas duas circunstâncias. Contudo, à toma de metformina estão associadas complicações GI, como é o caso da diarreia (diarreia não diabética), tendo no entanto presente que a diarreia é prevalente já por si em doentes diabéticos devendo discriminar-se da primeira como diarreia diabética (Bytzer et al., 2002). Paralelamente poderemos dizer que o envelhecimento é, atualmente, um fenómeno mundial que afeta uma elevada percentagem da população. Este, e as patologias a si associadas, como é o caso da Diabetes, tem sido alvo de diversos estudos por toda a comunidade científica, numa tentativa de compreender melhor quais os mecanismos envolvidos em todo o processo, dada a sua complexidade.

A estratégia experimental do trabalho, realizada anteriormente pelo grupo, consistiu, numa primeira fase, na caracterização farmacológica da resposta contráctil do íleo de rato à metformina, com a realização de estudos funcionais de contração de músculo liso em segmentos de íleo isolados. Numa segunda fase, e numa tentativa de explicar as bases farmacológicas subjacentes à diarreia associada à toma do fármaco, foram realizados estudos funcionais comparativos em segmentos de íleo isolados de ratos *Wistar* (controlo) e de ratos *Goto-Kakizaki* (GK), um modelo animal de DMT2 não-obeso. Impunha-se agora a realização dos mesmos estudos, mas desta feita em segmentos de íleo dos mesmos modelos animais mas com 1 ano de idade. A vantagem deste tipo de estudos farmacológicos *in vitro*, comparativamente com os estudos *in vivo*, passa pelo facto de se conseguir manipular a concentração efetiva do fármaco no órgão, para além de que se torna mais simples a quantificação da resposta do mesmo. De forma a não haver interferência na contractilidade do órgão, os animais foram sacrificados por decapitação, evitando-se a utilização de substâncias anestésicas. A preferência por animais machos para a realização dos estudos funcionais deveu-se ao facto de as fêmeas, em ciclos de difícil determinação/previsão, possuírem níveis elevados de estrogénios, passíveis de alterar a resposta GI de modo indireto. Já a escolha do íleo para preparação biológica utilizada como modelo experimental *in vitro* deveu-se a este ser a porção intestinal com maior reatividade farmacológica, para além de que é considerado um modelo *standard* para estudos da ação farmacológica de compostos no intestino (Liu and Coupar, 1997).

Nos estudos funcionais nestes animais envelhecidos procurou-se investigar os mecanismos farmacológicos subjacentes ao efeito da metformina, mas também subjacentes ao efeito da 5-HT exógena, para numa fase posterior se poder estabelecer comparações com o que se verifica em animais adultos jovens. Isto sucede na sequência dos resultados anteriores do grupo, nos quais se observou que na presença da DMT2 poderá haver um comprometimento na libertação da 5-HT endógena induzida pela metformina a partir das células EC, enquanto que a ação 5-HT exógena nas camadas musculares parece não ser afetada pela doença. À semelhança de trabalhos anteriores, foram realizadas curvas CR de sete adições independentes pois as contrações induzidas tanto pela metformina como pela 5-HT exógena, de acordo com estudos preliminares, são contrações do tipo fásicas, não possuindo um *plateau* estável que permita a adição sucessiva de doses de modo a construir-se uma curva CR cumulativa.

Após estabilização do órgão e lavagem dos banhos, o primeiro passo do protocolo foi a adição de ACh (100 μ M), com o objectivo de induzir a contração máxima do músculo liso do íleo. Após o término do protocolo, procedeu-se novamente à adição de ACh (100 μ M) para avaliar se a contração máxima do órgão se manteve, ou se deteriorou ao longo do tempo de ensaio. Geralmente, a contração do órgão induzida pela ACh (100 μ M) apresentava a mesma amplitude antes e após o estudo funcional. Em todos os estudos funcionais realizados foram sempre executadas duas curvas CR de sete adições independentes, pois havia sido verificado anteriormente que o perfil de ação do fármaco era mais eficaz na segunda curva CR. A incubação com reserpina e ritanserina foi sempre realizada 15 minutos antes de cada uma das doses da segunda curva CR, tendo sido utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionaram apenas os solventes apropriados para cada fármaco. Tanto a metformina (1-36 μ M) como a 5-HT exógena (0,1-60 μ M) induziram contrações dependentes da concentração nos segmentos de íleo de ratos *Wistar* controlo e ratos GK diabéticos (Tabelas VI e XII). A reserpina é um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, cujo efeito se traduz na depleção dos grânulos de 5-HT; já a ritanserina é um antagonista não seletivo dos recetores 5-HT₂ ($pK_i=8,8$ para recetores 5-HT_{2A}; $pK_i=8,3$ para recetores 5-HT_{2B}; $pK_i=8,9$ para recetores 5-HT_{2C}) (Baxter et al., 1995). Nos animais *Wistar* e GK, a reserpina bloqueou a resposta contráctil à metformina em 68,7% e 70,6%, respetivamente, à semelhança do que foi observado nos dois modelos animais com 3 meses de idade (73,4% e 71,6%, respetivamente; dados não apresentados), o que evidencia a contribuição das células EC e do seu conteúdo em 5-HT endógena para a contractilidade intestinal induzida pela metformina; já a ritanserina apenas bloqueou a resposta contráctil à metformina em 39,8% nos animais *Wistar*, não tendo alterado

significativamente a curva CR à metformina nos animais GK. Embora nos animais adultos jovens controlo, a ritanserina tenha reduzido mais significativamente a resposta máxima à metformina (67,8%, dados não apresentados), resultados semelhantes foram obtidos nos animais adultos jovens diabéticos, isto é, na presença da patologia, há um comprometimento do efeito da 5-HT libertada pelas células EC em recetores 5-HT₂, que medeia a resposta contráctil intestinal induzida pela metformina.

Como já observado anteriormente, tanto no grupo controlo como no grupo diabético com 1 ano de idade, a eficácia da metformina foi sempre superior na segunda curva CR. A potência do fármaco nos dois grupos manteve-se praticamente inalterada em curvas CR sucessivas. Tais resultados foram igualmente observados nos animais adultos jovens controlo, mas não nos diabéticos, onde a eficácia da metformina foi constante ao longo do tempo de ensaio.

Quando comparamos a eficácia da metformina entre animais controlo e animais diabéticos verificamos resultados antagónicos nos dois grupos de idades, isto é, enquanto que com 3 meses a eficácia da metformina é maior nos ratos *Wistar*, os animais GK com 1 ano de idade apresentam uma maior eficácia do fármaco em induzir contração intestinal. Tais resultados sugerem que, a uma diarreia não diabética sucede-se, com a idade, uma diarreia diabética. Resta saber se será de facto o impacto da doença ou o impacto da idade. Se compararmos dentro do mesmo modelo animal a eficácia da metformina em função da idade, verificamos que, de facto, com a idade há uma perda de eficácia, como se pode constatar pelos resultados obtidos nos ratos *Wistar*. Assim, concluímos que a presença da patologia mais uma vez contribui para uma maior contractilidade intestinal em resposta à metformina.

Sabe-se que a Diabetes exerce efeitos prejudiciais na função e regulação GI, ocorrendo perda das CIC, neuropatia autonómica e desequilíbrios no número de neurónios entéricos excitatórios e inibitórios, tal refletindo-se em alterações drásticas nos fenómenos de peristalse, relaxação reflexiva, tónus do esfíncter, fluxo vascular e segmentação intestinal, associadas, entre outros, ao aparecimento de complicações GI como a diarreia (Sellin and Chang, 2008). Ora, nesta situação em particular, a diarreia será, muito provavelmente, de origem diabética, associada a complicações da própria patologia, não estando associada ao fármaco.

Ainda observando estes resultados, é interessante verificar que a potência da metformina se mantém inalterada independentemente do grupo animal e da sua idade, ou seja, independentemente da presença ou ausência da doença e da sua idade. Em retrospectiva, com estes resultados, pode afirmar-se que, com o envelhecimento dos animais, uma diarreia não diabética poderá tornar-se diabética.

Relativamente à resposta contráctil do íleo à 5-HT exógena foram executadas curvas CR à 5-HT na ausência e na presença da ritanserina. Tanto no grupo controlo como no grupo dos animais diabéticos verificámos, à semelhança do que se observou para a metformina, um aumento da atividade intrínseca do agonista ao longo do tempo de ensaio. A ritanserina provocou um antagonismo do tipo não competitivo, tendo reduzido a resposta contráctil à 5-HT em 34,4% no grupo controlo, e 36,4% no grupo dos animais diabéticos. Uma redução mais substancial foi observada anteriormente pelo grupo nos mesmos modelos animais, mas com 3 meses de idade (62,4% e 57,8%, respetivamente; dados apresentados).

Sendo a ritanserina um antagonista não-seletivo dos recetores 5-HT₂ (Briejer et al., 1997) estes resultados evidenciam que os efeitos da 5-HT na contractilidade intestinal são por eles mediados, sendo que estes recetores estarão muito provavelmente presentes na camada de músculo liso do íleo, tal como comprovado por Javid and Naylor (1998), e contribuirão muito mais para essa contractilidade nos animais adultos jovens que nos adultos envelhecidos. No entanto, em trabalhos anteriores do grupo (Francisco, 2012), constatou-se imunoreatividade aos recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B} apenas em células ganglionares do plexo mientérico e submucoso, e não em células musculares lisas da camada muscular circular e longitudinal intestinal. Na altura, não se descartou a hipótese de a ativação destes recetores induzir a libertação de um terceiro neurotransmissor (que não a ACh, Henriques (2011)) libertado a partir das células ganglionares e que atuasse, por sua vez, em recetores específicos nas células musculares lisas.

Confrontando os resultados obtidos anteriormente com animais de 3 meses de idade, com os de animais com 1 ano de idade, a 5-HT exógena apresentou sempre uma tendência para uma maior atividade intrínseca nos animais diabéticos (GK), em comparação com os controlos (*Wistar*), o que sugere que, à semelhança da metformina, não ocorre perda de atividade com a presença da Diabetes. A patologia parece aumentar a contractilidade intestinal. Contudo, quando avaliado o possível efeito do envelhecimento na resposta à 5-HT nestes grupos de animais, verifica-se que a atividade intrínseca da 5-HT exógena é o parâmetro mais afetado por tal pois ocorre um decréscimo deste valor nos animais de 1 ano, tanto controlos como diabéticos, quando comparados com os mais jovens; por outro lado, a potência não sofre alterações com o envelhecimento, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Tal comprometimento da resposta contráctil do intestino com a idade parece ser comum à 5-HT exógena e à metformina, como foi observado em animais controlo, isto é, a idade compromete a contractilidade. Tal comprometimento parece envolver perda de recetores 5-HT₂ ou perda da sua funcionalidade dado que, como já

referido acima, os recetores 5-HT₂ contribuirão muito mais para a contractilidade intestinal nos animais adultos jovens que nos adultos velhos. No entanto, dado que a ritanserina não alterou a curva CR à metformina em ratos GK com 3 meses e 1 ano de idade, significa que na presença da patologia, há igualmente um comprometimento do efeito da 5-HT libertada pelas células EC em recetores 5-HT₂.

Estes recetores encontram-se expressos tanto no intestino delgado como no estômago, especialmente pelo músculo e pelos neurónios entéricos (Fiorica-Howells et al., 2000). Num estudo conduzido por Tharayil et al. (2010) foi demonstrado que a falta de sinalização para o recetor 5-HT_{2B} levava a uma diminuição das redes de CIC em ratinho, o que evidenciava a importância destes recetores na manutenção destas redes celulares, onde a 5-HT desempenha um papel relevante. Mais ainda, outro estudo, desta vez no cólon humano, demonstrou que os mesmos recetores medeiam as respostas excitatórias da 5-HT neste órgão, contribuindo para a hipersensibilidade associada à síndrome do cólon irritável (Borman et al., 2002). Dada a evidente e elevada relevância que os recetores 5-HT_{2B} possuem no intestino, alterações como perda de neurónios ao nível do SNE, que se verificam acontecer em roedores e humanos com o envelhecimento, mas também com a Diabetes, poderão afetar a expressão e/ou a sinalização destes mesmos recetores, contribuindo, deste modo, para o verificado neste estudo: a perda de atividade intrínseca da 5-HT exógena com o envelhecimento.

Dado o comprometimento da via serotoninérgica com a idade, o aumento da contractilidade intestinal induzida pela metformina em animais diabéticos velhos, que se poderá traduzir numa diarreia denominada de diabética, terá que ter subjacente outros mecanismos que não os envolvendo recetores 5-HT₂, nomeadamente fenómenos inflamatórios associados à idade ou associados à Diabetes.

Tendo em consideração que o processo de envelhecimento se encontra associado a uma condição pró-inflamatória crónica de baixo grau, tornou-se imperativo avaliar o estado de inflamação do íleo de rato pertencente aos quatro grupos de animais em estudo. Posto isto, foram realizados estudos imunohistoquímicos utilizando o anticorpo contra a proteína S100β, um marcador de inflamação intestinal enteroglial. A expressão e libertação da proteína S100β tem sido correlacionada com processos inflamatórios no intestino (doença celíaca e colite ulcerosa), sendo que, no intestino humano, apenas a proteína S100β é expressa fisiologicamente e especificamente pelas células da glia entéricas (Esposito et al., 2007, Cirillo et al., 2009, Cirillo et al., 2011). Como esperado, verificaram-se diferenças entre os animais controlo (*Wistar*) e os animais diabéticos (GK), tendo sido identificadas células com expressão nuclear para a proteína S100β, na lâmina própria da mucosa, podendo corresponder a histiócitos de *Langerhans* pela localização, morfologia celular e imunomarcção. Para confirmar a marcação de

histiócitos de *Langerhans*, teria de ser utilizado um marcador específico de células apresentadoras de antígeno, o CD1a.

Observou-se a existência/inexistência de imunomarcagem ao nível do MALT. O MALT, ou neste caso específico, o tecido linfóide associado ao intestino (*Gut-associated lymphoid tissue*, GALT), consiste em folículos linfóides agregados ou isolados, que formam placas de *Peyer*. Estas placas são geralmente denominadas de sensores imunitários do intestino pela sua capacidade em transportar antígenos e bactérias (Jung et al., 2010). Nos animais controlo jovens (3 meses de idade), a marcação para o MALT foi fraca (+, <10%); nos animais controlo com 1 ano de idade a marcação foi ausente (-, 0%); já nos animais diabéticos jovens, a marcação foi homogénea moderada (++, 10-50%); e, no último grupo, os animais diabéticos com 1 ano de idade, a marcação foi homogénea intensa (+++, >50%). Neste último grupo verificou-se imunomarcagem de elevado número de placas de *Peyer* em comparação com o observado nos outros grupos de animais, traduzindo hiperplasia e hipertrofia do MALT. Adicionalmente, aquando da colheita de amostras de íleo e preparação das mesmas para os estudos funcionais e outras técnicas laboratoriais, foi possível observar, a olho nu, a presença de elevado número de placas de *Peyer* neste último grupo, em comparação com o observado nos outros três grupos.

Desta análise imunohistoquímica, fica a ideia de que, nos animais controlo, a defesa imunitária é adaptada consoante a necessidade, havendo marcação nervosa homogénea, mantida ao longo da vida. Por outro lado, os animais diabéticos apresentam uma defesa imunitária deficiente que vão reforçando ao longo da vida (hiperplasia e hipertrofia do MALT), sendo que nestes animais, a marcação nervosa é menor e mantida.

Foram ainda quantificados os níveis de TNF- α no íleo de rato dos quatro grupos de animais, através da técnica de ELISA. Os animais jovens (3 meses de idade), controlos e diabéticos, apresentaram níveis equivalentes de TNF- α , o que sugere que apenas se verificam alterações nos níveis desta citocina com o envelhecimento dos indivíduos. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas entre os ratos *Wistar* com 1 ano de idade e os ratos GK da mesma idade, em que os animais controlo apresentavam os níveis mais elevados desta citocina inflamatória. Os níveis elevados de TNF- α detetados no íleo dos ratos *Wistar* com 1 ano de idade estão em concordância com o estado pró-inflamatório que ocorre durante o processo de envelhecimento. Em indivíduos diabéticos não-obesos, o papel da inflamação aparenta não ser tão relevante devido à existência de menores quantidades de tecido adiposo, em oposição com o que se verifica em indivíduos diabéticos obesos, onde a inflamação do tecido adiposo

desempenha um papel fulcral na patogénese da RI (Wisse, 2004). O facto de os animais GK com 1 ano de idade, animais não-obesos, apresentarem os menores níveis de TNF- α , encontra-se em concordância com esta ideia.

Não deixa de ser importante referir que será de grande utilidade a quantificação da expressão da sintetase do óxido nítrico induzida (iNOS) nos quatro grupos de animais, dado que a proteína S100 β pode estar associada à ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), que por sua vez leva à transcrição de diversas citocinas e de iNOS (Cirillo et al., 2011). O NO produzido neste estado inflamatório, alterando o tónus basal do órgão, poderá potenciar a resposta contráctil do intestino à metformina e a maior eficácia do fármaco observada nos animais diabéticos comparativamente com os animais controlo com 1 ano de idade.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A associação da metformina, um antidiabético oral, a complicações GI, como é o caso da diarreia, serviu como ponto de partida para este estudo. Como era objetivo do trabalho avaliar qual o papel do envelhecimento na resposta contráctil do íleo de rato à metformina e à 5-HT exógena, foram utilizados animais controlo e diabéticos com 1 ano de idade, de forma a comparar-se com os resultados obtidos anteriormente pelo grupo nos mesmos modelos animais, mas com 3 meses de idade.

Tanto a metformina como a 5-HT, testadas em concentrações terapêuticas, induziram contrações dependentes da concentração no íleo de ratos *Wistar* controlos e GK diabéticos. O facto de, na presença da patologia se observar uma maior contractilidade intestinal em resposta à metformina em ratos GK com 1 ano de idade comparativamente com os GK de 3 meses, verificando-se exatamente o oposto nos animais controlo, sugere que, a uma diarreia não diabética sucede-se, com a idade, uma diarreia diabética. Mais ainda, na presença da patologia, verificou-se que ocorre um comprometimento do efeito da 5-HT libertada pelas células EC em recetores 5-HT₂, responsáveis por mediar a resposta contráctil intestinal induzida pela metformina. Tal foi demonstrado com a não alteração da curva CR à metformina pela ritanserina, um antagonista não seletivo de recetores 5-HT₂, facto esse mais uma vez não observado nos animais controlo.

Dado que foi igualmente observado o comprometimento da via serotoninérgica com a idade, a denominada diarreia diabética, traduzida pelo aumento da contractilidade intestinal à metformina e à 5-HT exógena em ratos GK com 1 ano de idade, terá que ter subjacente outros mecanismos que não os envolvendo recetores 5-HT₂, nomeadamente fenómenos inflamatórios associados à idade ou associados à Diabetes. De facto, verificaram-se níveis elevados de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória no íleo dos *Wistar* controlo envelhecidos. Estes estão em concordância com o estado pró-inflamatório que ocorre durante o processo de envelhecimento. Já a imunomarcação para a proteína S100 β no MALT foi mais acentuada nos animais GK, o que sugere uma diarreia de características inflamatórias em animais diabéticos.

Em conclusão, os resultados obtidos permitem inferir que, com o envelhecimento, a diarreia que se possa declarar na sequência da toma de metformina, não se deve a um aumento da contractilidade intestinal induzida pelo fármaco em si, como demonstrado nos animais diabéticos adultos, uma vez que se verifica um comprometimento da via serotoninérgica com a idade, mas será mais uma diarreia que terá subjacente um processo inflamatório decorrente da idade ou da patologia em si.

No futuro, será importante realizar estudos imunohistoquímicos para averiguar alterações com a idade na imunomarcação dos recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B} nos animais controlo, no sentido de avaliar qual a influência da idade nestes recetores presentes nas

células ganglionares do SNE. Também será relevante quantificar a iNOS nos quatro grupos em estudo de forma a verificar como o estado inflamatório pode contribuir, não só para o tónus basal do órgão, como também para a resposta contráctil do órgão a fármacos que alteram a contractilidade intestinal.

**CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Ahlman HN, O (2001) The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of Oncology* 12:S63-S68.
- Aljada A, Mousa SA (2012) Metformin and neoplasia: implications and indications. *Pharmacology & therapeutics* 133:108-115.
- Andrade R, Barnes NM, Baxter G, Bockaert J, Branchek T, Cohen ML, Dumuis A, Eglen RM, Göthert M, Hamblin M, Hamon M, Hartig PR, Hen R, Herrick-Davis K, Hills R, Hoyer D, Humphrey PPA, Latté KP, Maroteaux L, Martin GR, Middlemiss DN, Mylecharane E, Peroutka SJ, Saxena PR, Sleight A, Villalon CM, Yocca F 5-Hydroxytryptamine receptors. Last modified on 14/11/2013. Accessed on 23/01/2014. IUPHAR database (IUPHAR-DB). <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=1>
- Ashcroft FM, Rorsman P (2012) Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 148:1160-1171.
- Bailey CJ (2008) Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 22:215-224.
- Bailey CJ, Mynett KJ, Page T (1994) Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br J Pharmacol* 112:671-675.
- Bailey CJ, Path MRC, Turner RC (1996) Metformin. *The New England Journal of Medicine* 334:574-579.
- Bailey CJ, Wilcock C, Day C (1992) Effect of metformin on glucose metabolism in the splanchnic bed. *Br J Pharmacol* 105:1009-1013.
- Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JH (2008) Metformin and the intestine. *Diabetologia* 51:1552-1553.
- Barnes NM, Hales TG, Lummis SCR, Peters JA 5-HT₃ receptors, introduction. Last modified on 30/08/2013. Accessed on 22/01/2014. IUPHAR database (IUPHAR-DB). <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=68>
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological reviews* 89:27-71.
- Bastard J, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17:4-12.
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T (1995) 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited? *Trends in Pharmacological Sciences* 16:105-110.
- Bertrand PP (2006) Real-time measurement of serotonin release and motility in guinea pig ileum. *The Journal of physiology* 577:689-704.

- Bertrand PP, Bertrand RL (2010) Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 153:47-57.
- Bitar K, Greenwood-Van Meerveld B, Saad R, Wiley JW (2011) Aging and gastrointestinal neuromuscular function: insights from within and outside the gut. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23:490-501.
- Bitar KN (2003) Function of gastrointestinal smooth muscle: from signaling to contractile proteins. *The American Journal of Medicine* 115:15-23.
- Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M (2010) The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends in molecular medicine* 16:407-416.
- Borman RA, Tilford NS, Harmer DW, Ellis ES, Sheldrick RLG, Carey J, Coleman RA, Baxter GS (2002) 5-HT_{2B} receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *British journal of pharmacology* 135:1144-1151.
- Bosi E (2009) Metformin - the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us? *Diabetes, obesity & metabolism* 11 Suppl 2:3-8.
- Briejer MR, Mathis C, Schuurkes JAJ (1997) 5-HT receptor types in the rat ileum longitudinal circular muscle: focus on the 5-HT₂ receptors mediating contraction. *Neurogastroenterol Mot* 9:231-237.
- Bytzer P, Talley NJ, Hammer J, Young LJ, Jones MP, Horowitz M (2002) GI Symptoms in Diabetes Mellitus Are Associated With Both Poor Glycemic Control and Diabetic Complications. *The American journal of gastroenterology* 97:604-611.
- Bytzer P, Talley NJ, Jones MP, Horowitz M (2001a) Oral hypoglycaemic drugs and gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus. *Aliment Pharmacol Ther* 15:137-142.
- Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M (2001b) Prevalence of Gastrointestinal Symptoms Associated With Diabetes Mellitus. *Archives Intern Med* 161:1989-1996.
- Camilleri M (2001) Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insights for the neurogastroenterologist. *Neurogastroenterol Mot* 13:277-295.
- Chandrasekharan B, Srinivasan S (2007) Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 19:951-960.
- Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ (2012) The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nature reviews Endocrinology* 8:228-236.
- Cheng LK, O'Grady G, Du P, Egbuji JU, Windsor JA, Pullan AJ (2010) Gastrointestinal system. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 2:65-79.
- Christopoulos A, Birdsall NJM, Brown DA, Eglén RM, Ehlert F, Felder CC, Langmead C, Mitchelson F, Nathanson NM, Tobin A, Wess J, Buckley NJ, Hammer R, Kilbinger

- HJ, Lambrecht G, Mutschler E, Schwarz RD Acetylcholine receptors (muscarinic). Last modified on 09/12/2013. Accessed on 21/01/2014. IUPHAR database (IUPHAR-DB). <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=2>.
- Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Grosso M, Petruzzelli R, Izzo P, Cali G, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Iuvone T, Steardo L, Cuomo R (2009) Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 21:1209-e1112.
- Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Turco F, Steardo L, Cuomo R (2011) S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. *World journal of gastroenterology : WJG* 17:1261-1266.
- Cnop M (2008) Fatty acids and glucolipototoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36:348-352.
- Costa M, Brookes SH, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47:iv15-iv19.
- Costall B, Naylor RJ, Tuladhar BR (1993) 5-HT₄ receptor mediated facilitation of the emptying phase of the peristaltic reflex in the guinea-pig isolated ileum. *Br J Pharmacol* 110:1572-1578.
- Cowen T, Johnson RJR, Soubeyre V, Santer RM (2000) Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut* 47:653-660.
- Davidson MB, Peters AL (1997) An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine* 102:99-110.
- de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernandez M, Vega-Naredo I, Caballero B, Garcia-Macia M, Suarez FM, Rodriguez-Colunga MJ, Solano JJ, Coto-Montes A (2010) Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free radical biology & medicine* 49:733-737.
- de Magalhaes JP, Curado J, Church GM (2009) Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics* 25:875-881.
- de Magalhaes JP, Wuttke D, Wood SH, Plank M, Vora C (2012) Genome-environment interactions that modulate aging: powerful targets for drug discovery. *Pharmacological reviews* 64:88-101.
- Dénes V, Lazar Z, Bartho L, Gabriel R (2003) Serotonin in the rabbit ileum: localization, uptake, and effect on motility. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 271:368-376.
- Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA (2004) Diabetic Neuropathy: An Intensive Review. *Am J Healthg-Syst Pharm* 61:160-176.

- Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Schirazi-Beechey SP (2002) Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G241-G248.
- Ebert EC (2005) Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. *Disease-a-month : DM* 51:620-663.
- Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL (2008) Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & therapeutics* 120:1-34.
- Espósito G, Cirillo C, Sarnelli G, De Filippis D, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, Petruzzelli R, Grosso M, Izzo P, Iuvone T, Cuomo R (2007) Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* 133:918-925.
- Evans JL (2007) Antioxidants: Do they have a role in the treatment of insulin resistance. *Indian J Med Res* 125:355-372.
- Fidalgo S, Ivanov DK, Wood SH (2013) Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology* 14:21-45.
- Fine KD, Schiller LR (1999) AGA Technical Review on the Evaluation and Management of Chronic Diarrhea. *Gastroenterology* 116:1464-1486.
- Fiorica-Howells E, Maroteaux L, Gershon MD (2000) Serotonin and the 5-HT_{2B} Receptor in the Development of Enteric Neurons. *The journal of Neuroscience* 20:294-305.
- Foss MT, Clement KD (2001) Metformin as a case of late-onset chronic diarrhea. *Pharmacotherapy* 21:1422-1424.
- Fox SI (2011) *Human Physiology Twelfth Edition*. New York: McGraw Hill.
- Francisco JFH (2012) O efeito da anfetamina na contractilidade do íleo de rato: estudos in vitro e in vivo. In: Departamento Ciências da Vida Coimbra: Universidade de Coimbra.
- Franconi F, Seghieri G, Canu S, Straface E, Campesi I, Malorni W (2008) Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 57:6-18.
- Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81:87-96.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 114:1752-1761.
- Gallagher P, O'Mahony D (2009) Constipation in old age. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 23:875-887.

- Galligan JJ (2002) Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Mot* 14:611-623.
- Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X (2000) Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81:97-103.
- Garber AJ, Duncan TG, Goodman AM, Mills DJ, Rohlf JL (1997) Efficacy of metformin in type II diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled, dose-response trial. *The American Journal of Medicine* 103.
- Gaundalini S, Vaziri H (2011) *Diarrhea: Diagnostic and Therapeutic Advances*: Humana Press.
- Gebauer A, Merger M, Kilbinger H (1993) Modulation by 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347:137-140.
- Gershon MD, Tack J (2007) The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132:397-414.
- Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE (2012) Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics* 22:820-827.
- Goto Y, Kakizaki M, Masaki N (1976) Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J exp Med* 119:85-90.
- Graham GJ, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM (2011) Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clin Pharmacokinet* 50:82-98.
- Gross ER, Gershon MD, Margolis KG, Gertsberg ZV, Li Z, Cowles RA (2012) Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology* 143:408-417 e402.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hansen MB (2003a) The Enteric Nervous System I - Organisation and Classification. *Pharmacology & Toxicology* 92:105-113.
- Hansen MB (2003b) The Enteric Nervous System II - Gastrointestinal Functions. *Pharmacology & Toxicology* 92:249-257.
- Hansen MB (2003c) The Enteric Nervous System III: A Target for Pharmacological Treatment. *Pharmacology & Toxicology* 93:1-13.
- Hardie DG, Carling D (1997) The AMP activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246:259-273.

- Hayden DM, Weiss EG (2011) Fecal incontinence: etiology, evaluation, and treatment. *Clinics in colon and rectal surgery* 24:64-70.
- Hebb CO, Whittaker VP (1958) Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J Physiol* 142:187-196.
- Henriques AMPSD (2011) Caracterização farmacológica da contração intestinal induzida pela metformina. In: Departamento de Ciências da Vida Coimbra: Universidade de Coimbra.
- Hermans MP, Ahn SA, Rousseau MF (2013) What is the phenotype of patients with gastrointestinal intolerance to metformin? *Diabetes & metabolism* 39:322-329.
- Hirota CL, McKay DM (2006) Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British journal of pharmacology* 149:463-479.
- Holzer P (2002) Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. *Neurogastroenterology and Motility* 14:459-475.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane E, Saxena PR, Humphrey PPA (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews* 46:157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71:533-554.
- Hundal RS, Inzucchi SE (2003) Metformin New Understandings, New Uses. *Drugs* 63:1879-1894.
- Ikeda T, Iwata K, Murakami H (2000) Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. *Biochemical Pharmacology* 59:887-890.
- Prontuário Terapêutico - 11; 2012; Ministério de Saúde; INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP.
- Ito H, Ishida H, Takeuchi Y, Antoku S, Abe M, Mifune M, Togane M (2010) Long-term effect of metformin on blood glucose control in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition & metabolism* 7:83.
- Javid FA, Naylor RJ (1998) Characterisation of the 5-HT receptors mediating the contractile effect of 5-HT in the proximal region of the rat small intestine. *British journal of pharmacology* 123:189.
- Jung C, Hugot JP, Barreau F (2010) Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International journal of inflammation* 2010:823710.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2012) *Basic & Clinical Pharmacology*: Mc Graw Hill Medical.

- Keating DJ, Spencer NJ (2010) Release of 5-hydroxytryptamine from the mucosa is not required for the generation or propagation of colonic migrating motor complexes. *Gastroenterology* 138:659-670
- Kilpatrick GJ, Bunce KT, Tyers MB (1990) 5-HT₃ receptors *Medicinal Research Reviews* 10:441-475.
- Kim JH, Park SH, Ko SY, Hong SN, Sung I, Shim CS, Song K, Kim SK, Oh J (2010) Diabetic factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with type 2 diabetes. *World Journal of Gastroenterology* 16:1782-1787.
- Kirkpatrick CL, Marchetti P, Purrello F, Piro S, Bugliani M, Bosco D, de Koning EJP, Engelse MA, Kerr-Conte J, Wollheim CB, Pattou F (2010) Type 2 Diabetes Susceptibility Gene Expression in Normal or Diabetic Sorted Human Alpha and Beta Cells: Correlations with Age or BMI of Islet Donors. *PLoS One* 5:1-11.
- Kirkup AJ, Brunnsden AM, Grundy D (2001) Receptors and Transmission in the Brain-Gut Axis: Potential for Novel Therapies. I. Receptors on visceral afferents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G787-794.
- Koch CA, Uwaifo GI (2008) Are gastrointestinal symptoms related to diabetes mellitus and glycemic control? *European journal of gastroenterology & hepatology* 20:822-825.
- Korsak K, Dolatshad NF, Silva AT, Saffrey MJ (2012) Ageing of enteric neurons: oxidative stress, neurotrophic factors and antioxidant enzymes. *Chemistry Central Journal* 6:80.
- Kregel KC, Zhang HJ (2007) An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R18-R36.
- Krentz AJ, Bailey CJ (2005) Oral Antidiabetic Agents Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs* 65:385-411.
- Krishnan B, Babu S, Walker J, Walker AB, Pappachan JM (2013) Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. *World journal of diabetes* 4:51-63.
- Kwon H, Pessin JE (2013) Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in endocrinology* 4:71.
- Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien PA (2008) Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 65:940-952.
- Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE (2005) The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 280:4617-4626.

- Lin Y, Sun Z (2010) Current views on type 2 diabetes. *The Journal of endocrinology* 204:1-11.
- Liu L, Coupar IM (1997) Characterization of pre- and post-synaptic α -adrenoceptors in modulation of the rat ileum longitudinal and circular muscle activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356:248-256.
- Luca Cd, Olefsky JM (2006) Stressed out about obesity and insulin resistance. *Nature Medicine* 12:41-42.
- Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjögren M, Ling C, Eriksson K, Lethagen A, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L (2007) Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 117:2155-2163.
- Lysy J, Israeli E, Goldin E (1999) The Prevalence of Chronic Diarrhea Among Diabetic Patients. *The American journal of gastroenterology* 94:2165-2170.
- Macaulay R, Akbar AN, Henson SM (2013) The role of the T cell in age-related inflammation. *Age* 35:563-572.
- Majithia AR, Florez JC (2009) Clinical translation of genetic predictors for type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16:100-106.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing research reviews* 3:445-464.
- Mawe GM, Hoffman JM (2013) Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 10:473-486.
- McCarthy MI (2010) Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. *The New England Journal of Medicine* 363:2339-2350.
- Metzger M (2010) Neurogenesis in the enteric nervous system. *Archives Italiennes de Biologie* 148:73-83.
- Miralles F, Portha B (2001) Early Development of B-Cells Is Impaired in the GK Rat Model of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 50:S84-S88.
- Misbin RI (1977) Phenformin-associated lactic acidosis: Pathogenesis and Treatment. *Annals of Internal Medicine* 87:591-595.
- Mostafa RM (2010) Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World Journal of Gastroenterology* 16:3239.
- Murakawa Y, Zhang W, Pierson CR, Brismar T, Ostenson CG, Efendic S, Sima AA (2002) Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK-rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes/metabolism research and reviews* 18:473-483.

- Ong CR, Molyneaux LM, Constatino MI, Twigg SM, Yue DK (2006) Long term efficacy of metformin therapy in non obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:2361-2364.
- Papanas N, Maltezos E, Mikhailidis D (2010) Metformin and cancer: license to heal? *Expert Opin Investig Drugs* 19:913-917.
- Pernicova I, Korbonits M (2014) Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature reviews Endocrinology* 1-14.
- Phillips RJ, Powley TL (2001) As the Gut Ages: Timetables for Aging of Innervation Vary by Organ in the Fischer 344 Rat. *The Journal of Comparative Neurology* 434:358-377.
- Porcher C, Baldo M, Henry M, Orsoni P, Julé Y, Ward SM (2002) Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 97:118-125.
- Proctor WR, Bourdet DL, Thakker DR (2008) Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36:1650-1658.
- Quan C, Talley NJ, Jones MP, Spies J, Horowitz M (2008) Gain and loss of gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus: associations with psychiatric disease, glycemic control, and autonomic neuropathy over 2 years of follow-up. *The American journal of gastroenterology* 103:2023-2030.
- Raju B, Resta C, Tibaldi JT (2000) Metformin and late gastrointestinal complications. *The American Journal of Medicine* 109:260-261.
- Rayner CK, Samson M, Jones KL, Horowitz M (2001) Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 24:371-381.
- Rees DA, Alcolado JC (2005) Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22:359-370.
- Rena G, Pearson ER, Sakamoto K (2013) Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* 56:1898-1906.
- Rhodes CJ (2005) Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307:380-384.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H (2003) Glucose Toxicity in Beta-Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. *Diabetes* 52:581-587.
- Rutter GA, Hodson DJ (2013) Minireview: intraislet regulation of insulin secretion in humans. *Molecular Endocrinology* 27:1984-1995.

- Saffrey MJ (2004) Ageing of the enteric nervous system. Mechanisms of ageing and development 125:899-906.
- Sakar Y, Meddah B, Faouzi M, Bado A, Ducroc R (2010) Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporter. Journal of Physiology and Pharmacology 61:301-307.
- Salles N (2007) Basic mechanisms of the aging gastrointestinal tract. Digestive diseases 25:112-117.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414:799-806.
- Sanders KM, Koh SD, Ward SM (2006) Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. Annual review of physiology 68:307-343.
- Santos SAPRS (2005) Efeitos adversos dos triptanos: suas bases farmacológicas. Coimbra: Universidade de Coimbra.
- Scarpello JHB, Hodgson E, Howlett HCS (1998) Effect of metformin on bile salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. Diabet Med 15:651-656.
- Schäfermayer A, Zanner R, Graztl M, Sachs G, Prinz C (2004) Characterization of enterochromaffin cells isolated from the rat ileum. Cell Biology of the Chromaffin cell 175-186.
- Schiller LR, Pardi DS, Spiller R, Semrad CE, Surawicz CM, Giannella RA, Krejs GJ, Farthing MJ, Sellin JH (2014) Gastro 2013 APDW/WCOG Shanghai Working Party Report: Chronic diarrhea: Definition, classification, diagnosis. Journal of gastroenterology and hepatology 29:6-25.
- Schworer H, Ramadori G (1998) Autoreceptors can modulate 5-hydroxytryptamine release from porcine and human small intestine in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 357:548-552.
- Sellin JH, Chang EB (2008) Therapy Insight: gastrointestinal complications of diabetes-pathophysiology and management. Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology 5:162-171.
- Sepúlveda M, Lummis SCR, Martin IL (1991) The agonist properties of mchlorophenylbiguanide and 2-methyl-5-hydroxytryptamine on 5-HT₃ receptors in n1e-115 neuroblastoma cells. British journal of pharmacology 104:536-540.
- Shakil A, Church RJ, Rao SS (2008) Gastrointestinal Complications of Diabetes. American Family Physician 77:1697-1702.
- Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM (2007) Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. The Journal of clinical investigation 117:1422-1431.

- Skrha J, Prazny M, Hilgertova J, Kvasnicka J, Kalousova M, Zima T (2007) Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *European journal of clinical pharmacology* 63:1107-1114.
- Soumaya K (2013) Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes In: *Diabetes* (Ahmad, S. I., ed): Springer New York.
- Spangueus A, El-Salhy M, Suhr O, Lithner F (1999) Prevalence of Gastrointestinal Symptoms in Young and Middle-Aged Diabetic Patients. *Scandinavian University Press* 12:1196-1202.
- Srinivasan K, Ramarao P (2007) Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res* 125:451-472.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* 365:1333-1346.
- Suen CS, Burn P (2012) The potential of incretin-based therapies in type 1 diabetes. *Drug discovery today* 17:89-95.
- Surampudi PN, John-Kalarickal J, Fonseca VA (2009) Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mount Sinai Journal of Medicine* 76:216-226.
- Tahrani AA, Varughese GI, Scarpello JH, Hanna FW (2007) Metformin, heart failure, and lactic acidosis: is metformin absolutely contraindicated? *Bmj* 335:508-512.
- Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F (2011) Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovascular diabetology* 10:1-15.
- Tharayil VS, Wouters MM, Stanich JE, Roeder JL, Lei S, Beyder A, Gomez-Pinilla PJ, Gershon MD, Maroteaux L, Gibbons SJ, Farrugia G (2010) Lack of serotonin 5-HT_{2B} receptor alters proliferation and network volume of interstitial cells of Cajal in vivo. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 22:462-469, e109-410.
- Tonini M, Vicini R, Cervio E, De Ponti F, De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, Dellabianca A, Sternini C (2005) 5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 129:1557-1566.
- Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ (1996) 5-HT₃ and 5-HT₄ receptor-mediated facilitation of the emptying phase of the peristaltic reflex in the marmoset isolated ileum. *British journal of pharmacology* 117:1679-1684.
- Tuladhar BR, Ge L, Naylor RJ (2003) 5-HT₇ receptors mediate the inhibitory effect of 5-HT on peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *British journal of pharmacology* 138:1210-1214.

- Tuladhar BR, Kaiser M, Naylor RJ (1997) Evidence for a 5-HT₃ receptor involvement in the facilitation of peristalsis on mucosal application of 5-HT in the guinea pig isolated ileum. *British journal of pharmacology* 122:1174-1178.
- Vaag A, Lund SS (2007) Non-obese patients with type 2 diabetes and prediabetic subjects: distinct phenotypes requiring special diabetes treatment and (or) prevention? *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 32:912-920.
- Venables MC, Jeukendrup AE (2009) Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism research and reviews* 25 Suppl 1:S18-23.
- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* 122:253-270.
- Wade PR (2002) Aging and Neural control of the GI tract I. Age-related changes in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G489-G495.
- Wade PR, Cowen T (2004) Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 16:19-23.
- Wade PR, Westfall JA (1985) Ultrastructure of enterochromaffin cells and associated neural and vascular elements in the mouse duodenum. *Cell and Tissue Research* 241:557-563.
- Wallis D (1981) Neuronal 5-hydroxytryptamine receptors outside the central nervous system. *Life Sciences* 29:2345-2355.
- Wellen KE (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 115:1111-1119.
- White MF, Kahn CR (1994) The Insulin Signaling System. *The Journal of biological chemistry* 269:1-4.
- WHO Committee (1999) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization.
- Wisse BE (2004) The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15:2792-2800.
- Wong TP, Debnam ES, Leung PS (2009) Diabetes mellitus and expression of the enterocyte renin-angiotensin system: implications for control of glucose transport across the brush border membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C601-C610.
- Wood JD (2007) Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World journal of gastroenterology : WJG* 13:1313-1332.

- Woudstra T, Thomson ABR (2002) Nutrient absorption and intestinal adaptation with ageing. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 16:1-15.
- Zahn JM, Poosala S, Owen AB, Ingram D, Lustig A, Carter A, Weeraratna AT, Taub DD, Gorospe M, Mazan-Mamczarz K, Lakatta E, Boheler KR, Xu X, Mattson MP, Falco G, Ko MSH, Schlessinger D, Firman J, Kummerfeld SK, Wood W, Longo DL, Zonderman AB, Kim SK, Becker KG (2007) AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS Genetics* preprint:e201.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation* 108:1167-1174.