

pEC50
Emax
RATO GK
SNP EX-3 PERDA DE PESO
GLP-IR FUNDO GÁSTRICO
MOTILIDADE GÁSTRICA
SENSIBILIDADE PERIFÉRICA À INSULINA
DIABETES MELLITUS TIPO II
CONTRAÇÃO GLP-I
L-NNAL LIRAGLUTIDO
ÓXIDO NÍTRICO NA COL TG IMUNOHISTOQUÍMICA
p-nNOS nNOS WESTERN BLOTTING GLI
RELAXAMENTO
ESTUDOS FUNCIONAIS
INGESTÃO CALÓRICA

Ana Catarina Lourenço Carrêlo

Alterações da motilidade gástrica na Diabetes *Mellitus* tipo II: O efeito dos agonistas do recetor do glucagon-*like peptide* I (GLP-1RA)

Dissertação para obtenção ao grau de Mestre em Farmacologia Aplicada sob a orientação da Professora Doutora Sónia Silva Santos e pelo Professor Doutor Paulo Matafome e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra

Alterações da motilidade gástrica na Diabetes *Mellitus* tipo II: o efeito dos agonistas do recetor do glucagon-like peptide I (GLP-1RA)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia Aplicada e realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Silva Santos do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental e do Professor Doutor Paulo Matafome do Laboratório de Fisiologia, do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Setembro de 2016

*“Remember to look up at the stars and not down at your feet.
Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious.
And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It
matters that you don’t just give up.”*

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Professora Doutora Sónia Silva Santos, por me ter aceitado como sua mestranda, por todos os ensinamentos técnico-científicos, conselhos e críticas construtivas que me transmitiu, pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho e por todo o apoio e total disponibilidade prestados no decorrer deste projeto. Agradeço também os bons momentos que partilhámos no laboratório, assim como, a sua compreensão e a sua amizade que foram uma preciosa ajuda em alguns momentos mais complicados.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Matafome, também por me ter aceitado como sua aluna de Tese de Mestrado, pelos ensinamentos técnico-científicos e conselhos que me transmitiu, pela confiança depositada na minha pessoa e no meu trabalho, por todo o apoio e disponibilidade prestados, pela sua amizade e por todos os bons e divertidos momentos passados no laboratório.

Às minhas colegas do laboratório de Farmacologia e amigas Beatriz Martins e Carlota Nóbrega, por todo o apoio e ajuda, pelo companheirismo e amizade e por todos os bons e divertidos momentos que partilhámos.

Ao meu colega do laboratório de Fisiologia e amigo Tiago Rodrigues, por todos os conhecimentos técnico-científicos que me transmitiu, por toda a ajuda e apoio no decorrer deste projeto, pelos seus preciosos conselhos e pela sua amizade.

Às minhas colegas do laboratório de Fisiologia e amigas Diana Ribeiro, Daniela Marques e Elodie Baptista, por todos os bons e divertidos momentos que partilhámos juntas e que nunca esquecerei e pela preocupação e apoio nos momentos mais difíceis. A vossa amizade é algo que “levarei comigo prá-vida”!

À Professora Doutora Raquel Seíça, do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela colaboração neste projeto de Tese de Mestrado.

À Professora Doutora Bárbara Oliveiros, do Laboratório de Bioestatística e Informática Médica (IBILI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela contribuição na análise estatística ANOVA a dois fatores.

À Professora Doutora Lina Carvalho, do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pelo tempo despendido e ajuda prestada neste projeto. E um agradecimento especial à Lia pelos ensinamentos técnico-científicos que me

transmitiu, pela ajuda e disponibilidade prestadas, e também, pela simpatia com que me recebeu.

Aos meus amigos de faculdade, Diana Santos, Beatriz Naia, Mariana Manso e Márcia Rénio pela preocupação com o meu bem-estar e com o meu trabalho, por estarem sempre presentes e por acreditarem nas minhas capacidades.

Ao meu amigo de há mais de uma década, João Gregório, pela sua preocupação comigo e com o meu trabalho, pela confiança depositada em mim, por ter ouvido todos os meus desabafos nos momentos mais complicados, e por fim, pela sua amizade que muito estimo e que espero que dure por muitos mais anos.

Aos meus amigos da adolescência, Filipe Cabeleira, Ana Miguel Henriques e Guilherme Vieira, pelos bons momentos que partilhamos há já alguns anos e por não deixarem que a distância que nos separa e o facto de nos vermos poucas vezes, afete a nossa amizade.

À minha família, avô, avó, padrinho, tias, madrinha e primas, pelos bons e preciosos momentos em família que partilhámos, embora não tenham sido tantos quanto gostaria, pela preocupação demonstrada com o meu bem-estar e o meu trabalho e pela confiança que depositam em mim e nas minhas capacidades.

À minha irmã Carolina, pela preocupação, pelo apoio, pela confiança que sempre depositou na sua irmã mais velha e pela sua amizade. Desejo-te muita sorte agora que vais iniciar uma das mais importantes etapas da tua vida e que será, sem dúvida, uma das melhores!

Aos meus pais, José Carlos e Maria da Piedade, por me terem dado a oportunidade de prosseguir os meus estudos no ensino universitário, por todo o apoio e ajuda, pela confiança que sempre depositaram em mim e no meu trabalho e por acreditarem que consigo sempre chegar mais longe e alcançar os meus objetivos.

E por fim, não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à minha mãe, pelo seu apoio incondicional, por ter ouvido todos os meus desabafos e preocupações, por ter tentado ajudar-me no que lhe fosse possível nos momentos mais complicados, por nunca ter duvidado das minhas capacidades e pela compreensão e preocupação com o meu bem-estar e com o meu trabalho, todos os dias. És sem dúvida a melhor mãe do mundo! E muito obrigada por tudo!

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xv

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. DIABETES MELLITUS TIPO II	3
1.1 Caraterização fisiopatológica da Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II	3
1.2 Terapêutica da Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II.....	7
2. GLUCAGON-LIKE PEPTIDE I (GLP-I)	9
2.1 Caraterização biológica e fisiológica do GLP-I	9
2.2 O efeito do GLP-I na Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II.....	14
2.2.1 Incretino-miméticos: agonistas do GLP-1R e inibidores da DPP-IV	15
3. SISTEMA GASTRINTESTINAL	19
3.1 Fisiologia do sistema gastrointestinal.....	19
3.2 Motilidade do sistema gastrointestinal	21
3.2.1 Regulação da motilidade gastrointestinal	24
3.2.2 Alterações da motilidade gastrointestinal na Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II.....	27
3.2.3 O efeito do GLP-I na motilidade gastrointestinal	30

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

Objetivos.....	35
-----------------------	-----------

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Modelos animais.....	39
2. Estudos funcionais.....	40

2.1 Isolamento e preparação do órgão	40
2.2 Protocolo experimental de caracterização da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato ao GLP-I	41
2.3 Protocolo experimental de caracterização da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato ao Liraglutido.....	42
2.4 Tratamento dos resultados dos estudos de caracterização da resposta contrátil de tiras de fundo gástrico aos GLP-IRA.....	42
3. Estudos <i>in vivo</i> com Liraglutido em rato Wistar e em rato Goto-Kakizaki	43
3.1 Descrição do tratamento com Liraglutido	43
3.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos de rato Wistar e de rato GK tratados com Liraglutido.....	43
3.3 Colheita de sangue e isolamento do órgão.....	44
3.4 Protocolo experimental de estudo da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar e rato GK tratados com Liraglutido	44
3.4.1 Tratamento dos resultados do estudo da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar e rato GK tratados com Liraglutido	45
3.5 Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais	46
3.6 Reagentes e Soluções usados nos estudos funcionais	46
4. Estudos moleculares	47
4.1 Protocolo experimental de determinação da densidade de GLP-IR, nNOS e p-nNOS por Western Blotting.....	47
4.1.1 Reagentes e Soluções usados na técnica Western Blotting.....	49
4.1.2 Análise estatística dos resultados obtidos na técnica Western Blotting	50
4.2 Protocolo experimental de determinação da localização celular do GLP-IR por Imunohistoquímica	50
 CAPÍTULO 4 - RESULTADOS	
1. Caracterização da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato aos agonistas do recetor do glucagon-like peptide I (GLP-IRA)	55
2. Avaliação do efeito do tratamento com Liraglutido sobre o perfil bioquímico de rato Wistar e de rato GK (estudos <i>in vivo</i>)	59
3. Estudo da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar e de rato GK tratados com Liraglutido	64
3.1 Resposta contrátil ao Carbacol (CCh).....	64
3.2 Resposta contrátil ao nitroprussiato de sódio (SNP) e à noradrenalina (NA).....	65

4. Determinação da densidade do GLP-IR, da nNOS e da p-nNOS por Western Blotting71

5. Determinação da localização celular do recetor do GLP-I por Imunohistoquímica.....73

CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO

Discussão77

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Conclusões e Perspetivas futuras89

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas93

Lista de Abreviaturas

AC – adenil ciclase

ACh – acetilcolina

Akt/PKB – *Activated protein kinase / protein kinase B*

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

AMPK – *5-AMP-activated protein kinase*

ATP – adenosina trifosfato

BSA – *Bovine Serum Albumin*

Ca²⁺ – íão cálcio

CCh – carbacol

CCK – colecistoquinina

CR – concentração-resposta

Cl⁻ – íão cloreto

DAG – diacilglicerol

DM II – *Diabetes Mellitus* tipo II

DPP-IV – dipeptidil peptidase IV

EGFR – *epidermal growth factor receptor*

E_{máx} – efeito máximo

eNOS – sintase do óxido nítrico endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*)

Epac2 – *exchange protein activated by cAMP 2*

ERK1/2 – *extracelular-signal-regulated kinase 1/2*

GC – guanilato ciclase

GI – gastrointestinal

GIP – *glucose-dependent insulintropic peptide*

GLP-1 – *glucagon-like peptide I*

GLP-IR – recetor do glucagon-like peptide I

GLP-IRA – agonista do recetor do glucagon-like peptide I

GLUT – transportador de glucose

GK – Goto-Kakizaki

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

HbA1c – hemoglobina glicosilada

5-HT – 5-hidroxitriptamina (ou serotonina)

K⁺ – ião potássio

IGF – insulin-like growth factor

IP₃ – inositol trifosfato

IR – recetor da insulina

IRS – substrato do recetor da insulina (*insulin receptor substrate*)

K⁺ – ião potássio

L-NNA – N^G-nitro-L-arginina (*N^G-nitro-L-Arginine*)

MLCK – cinase das cadeias leves de miosina (*myosin light chain kinase*)

MLCP – fosfatase das cadeias leves de miosina (*myosin light chain phosphatase*)

Mg²⁺ – ião magnésio

Na⁺ – ião sódio

NA – noradrenalina

nNOS – sintase do óxido nítrico neuronal (*neuronal nitric oxide synthase*)

NO – óxido nítrico (*nitric oxide*)

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

Pdx-I – *pancreatic and duodenal homeobox I*

pEC₅₀ – logaritmo negativo da concentração molar de agonista necessária para a indução de 50% da resposta máxima

PKA – proteína cinase A (*protein kinase A*)

PKC – proteína cinase C (*protein kinase C*)

PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*)

PYY – peptídeo YY (*peptide YY*)

p-nNOS – forma fosforilada da sintase do óxido nítrico neuronal

SGLT2 – co transportadores de sódio/glicose do tipo 2 (*sodium-glucose cotransporter 2*)

SNA – Sistema Nervoso Autónomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SNP – nitroprussiato de sódio (*sodium nitroprusside*)

TBS – *Tris Buffer Saline*

VIP – *Vasoactive Intestinal Polypeptide*

Lista de Figuras

Figura 1	Aumento da taxa de mortalidade e da prevalência global associadas à DM II; Retirado de: "Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2014"; Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes.	Página 3
Figura 2	Ilustração das principais características fisiopatológicas da DM II e sua evolução.	Página 4
Figura 3	Efeitos fisiológicos do GLP-I e seus análogos (GLP-IRA); Adaptado de ¹	Página 11
Figura 4	Via de sinalização do GLP-IR na célula beta-pancreática; Adaptado de ²	Página 13
Figura 5	Estrutura do GLP-I e seus análogos, Exenatido e Liraglutido; Adaptado de ¹	Página 16
Figura 6	Comparação entre os agonistas do GLP-IR de curta duração de ação (A) e os GLP-IRA de longa duração de ação (B); Adaptado de ³	Página 17
Figura 7	Ilustração da histologia do trato gastrointestinal; Adaptado de ⁴	Página 20
Figura 8	Contração da célula muscular lisa; Adaptado de ⁵	Página 22
Figura 9	Relaxamento da célula muscular lisa; Adaptado de ⁵	Página 23
Figura 10	Sistema de banho de órgãos e polígrafo de quatro canais.	Página 41
Figura 11	Registo representativo de curvas cumulativas CR ao GLP-I (A) e ao Liraglutido (B) em fundo gástrico isolado de rato após pré-contracção com CCh 5 µM.	Página 42
Figura 12	Esquema temporal ilustrativo dos estudos <i>in vivo</i> com Liraglutido.	Página 44
Figura 13	Registo representativo de curvas CR ao SNP em fundo gástrico isolado de rato Wistar não tratado (A) e rato Wistar tratado com Liraglutido (B) após pré-contracção com CCh 5 µM.	Página 45
Figura 14	Resposta contráctil ao GLP-I de tiras de estômago isolado de rato Wistar, na presença e na ausência de 300 nM de Exendin-3, antagonista seletivo do GLP-IR; os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; a significância das	Página 57

	diferenças estatísticas foi analisada pelo teste <i>t</i> de Student; * $p < 0,05$ vs GLP-I.	
Figura 15	Resposta contráctil ao Liraglutido de tiras de estômago isolado de rato Wistar, na presença e na ausência de 250 μM de N^{G}-nitro-L-arginina (L-NNA), inibidor não seletivo da NOS; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M; as barras verticais representam o S.E.M.; $n = 6-11$.	Página 58
Figura 16	Comparação da perda de peso no final do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); $n=4-7$ por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; * vs W salino; # vs GK salino.	Página 61
Figura 17	Evolução do peso corporal ao longo do período de tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); $n=4-7$ por grupo.	Página 61
Figura 18	Prova de tolerância à insulina antes do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); $n=4-8$ por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; * vs W salino; # vs GK salino.	Página 62
Figura 19	Prova de tolerância à insulina depois do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, duas vezes por dia); $n=4-7$ por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; * vs W salino; # vs GK salino.	Página 62
Figura 20	Comparação entre a área debaixo da curva (AUC) da prova de tolerância à insulina (PTI) no final do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar	Página 63

	administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n = 4-7 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p <0,05 * vs W salino.	
Figura 21	Resposta contrátil ao CCh nos ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido ao longo de duas curvas cumulativas CR sucessivas; os valores estão apresentados como média ± S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student. * p<0,05 vs Wistar (salino) e Wistar (Liraglutido).	Página 64
Figura 22	Relaxamento induzido pelo SNP (em % de inibição da contração induzida pelo CCh) em tiras de fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; os resultados estão expressos como média ± S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M; n constante na tabela 8.	Página 65
Figura 23	Gráfico de perfil do efeito do tratamento com Liraglutido sobre as médias marginais estimadas de E_{máx} do SNP nos dois modelos animais; C = sem tratamento (situação controlo), L = tratamento com Liraglutido; as diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste ANOVA a 2 fatores (rato e tratamento); F (1,58) = 5,02; p = 0,029.	Página 67
Figura 24	Gráfico de perfil do efeito do modelo animal (W e GK) sobre as médias marginais estimadas de pEC₅₀ do SNP; C = sem tratamento (situação controlo), L = tratamento com Liraglutido; as diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste ANOVA a 2 fatores (rato e tratamento); F (1,51) = 35,06; p < 0,001.	Página 68
Figura 25	Relaxamento induzido pela NA (em % de inibição da contração induzida pelo CCh) em tiras de fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; os resultados estão expressos como média ± S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; n constante na tabela 9.	Página 68
Figura 26	Gráficos de perfil do efeito do modelo animal e do tratamento sobre as médias marginais estimadas de pEC₅₀ da NA; C = sem tratamento (situação controlo), L = tratamento com Liraglutido; as diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste ANOVA a 2 fatores (rato e tratamento); F (1,55) = 12,45; p = 0,001.	Página 70

Figura 27	<p>Expressão do GLP-IR, em fundo gástrico isolado de rato, quantificada por Western Blotting; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p <0,05; * vs W salino; # vs GK salino.</p>	Página 71
Figura 28	<p>Expressão da nNOS e da p-nNOS, em fundo gástrico isolado de rato, quantificada por Western Blotting; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo.</p>	Página 72
Figura 29	<p>Localização celular do GLP-IR, em fundo gástrico isolado de rato, determinada por Imunohistoquímica (DAB); O painel A refere-se a um corte de pâncreas isolado de rato GK salino, x200. O painel B refere-se a um corte de fundo gástrico isolado de rato GK tratado com Liraglutido, x200. Os painéis C e D referem-se a cortes de fundo gástrico isolado de rato Wistar salino, x200 e x400 respetivamente. Visualização da imunomarcação do GLP-IR a castanho, no ilhéu de Langerhans (1), nas células parietais das glândulas fúndicas (2), nas células musculares lisas (3), nas células ganglionares do plexo nervoso (4) e nas células endoteliais de vasos sanguíneos (5).</p>	Página 73

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparação entre as principais classes farmacológicas para a terapêutica da DM II; Adaptado de ⁶	Página 8
Tabela 2	Os efeitos do GLP-I na DM II; Adaptado de ⁷	Página 14
Tabela 3	Comparação entre o GLP-I, os agonistas do GLP-IR e os inibidores da DPP-IV; Adaptado de ¹	Página 18
Tabela 4	Protocolos para preparação das soluções usadas na Eletroforese e em Western Blotting.	Página 49
Tabela 5	Valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} para os GLP-IRA em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e de ratos GK; $E_{máx}$ = contração máxima em mN de tensão; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de GLP-IRA necessária para induzir 50% da resposta máxima; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student; * p <0,05 vs GLP-I; # p <0,05 vs Wistar.	Página 56
Tabela 6	Efeito do antagonista seletivo do GLP-IR na resposta contrátil de fundo de estômago isolado de rato Wistar ao GLP-I; $E_{máx}$ = efeito máximo em percentagem de contração induzida pelo GLP-I; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de agonista que induz 50% do efeito máximo; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student; * p <0,05 vs GLP-I.	Página 57
Tabela 7	Avaliação e comparação do perfil bioquímico de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 μ g/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato <i>Goto-Kakizaki</i> administrado com Liraglutido (200 μ g/kg, duas vezes por dia); os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M.; n = 4-8 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p <0,05; * vs W salino; # vs GK salino.	Página 59

Tabela 8	<p>Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para o SNP em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; $E_{m\acute{a}x}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pelo Carbacol (CCh); pEC_{50} = logaritmo da concentração molar de SNP necessária para induzir 50% da resposta máxima; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas; # $p < 0,05$ vs Wistar (salino), Wistar (Liraglutido) e GK (salino).</p>	Página 66
Tabela 9	<p>Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para a NA em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; $E_{m\acute{a}x}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pelo Carbacol (CCh); pEC_{50} = logaritmo da concentração molar de NA necessária para induzir 50% da resposta máxima; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas; * $p < 0,05$ vs Wistar (salino).</p>	Página 69

RESUMO

O glucagon-like peptide I (GLP-I) corresponde a um dos principais, e mais recentes, alvos terapêuticos para o tratamento da Diabetes *Mellitus* tipo II, pois desempenha várias funções metabólicas benéficas para o tratamento desta patologia, tais como, a potenciação da secreção de insulina induzida pela entrada de nutrientes no organismo (“efeito incretina”), a estimulação da biossíntese de insulina, a inibição da secreção de glucagina e a melhoria da função das células beta-pancreáticas. O GLP-I é também caracterizado por promover cardioproteção, induzir a saciedade, inibir o esvaziamento gástrico e a secreção ácida gástrica, e ainda, inibir a motilidade gastrointestinal através da ativação de recetores (GLP-IR) presentes em neurónios entéricos e por via da libertação de óxido nítrico.

Têm sido desenvolvidos novos fármacos agonistas do recetor do GLP-I (GLP-IRA) que mimetizam os efeitos do agonista endógeno e que são resistentes à degradação enzimática pela DPP-IV. Os GLP-IRA também têm sido aplicados na terapêutica da obesidade devido ao efeito significativo desta classe farmacológica na inibição do apetite e consequente perda de peso.

O objetivo deste projeto consistiu no estudo do efeito dos GLP-IRA, GLP-I e Liraglutido, sobre a motilidade gástrica e de que forma esta está alterada na presença da diabetes tipo II.

Para esse fim, foram usadas tiras de fundo de estômago isolado de ratos Wistar (grupo controlo) e *Goto-Kakizaki* (rato GK, modelo animal diabético do tipo II não obeso), com dezasseis semanas de idade, para a realização de estudos funcionais de registo da contração isométrica de curvas cumulativas concentração-resposta (CR) dos GLP-IRA (0,05 nM - 111,1 nM) após pré-contração com carbacol 5 µM.

Ambos os GLP-IRA induziram contração tónica, não colinérgica e dependente da concentração, sendo que o GLP-I foi mais eficaz na indução da contração de fundo gástrico isolado de rato GK comparativamente ao rato Wistar, enquanto os dois GLP-IRA foram equivalentes no rato Wistar. Por outro lado, o Liraglutido foi o mais potente nos animais controlo, sendo que ambos os GLP-IRA foram equipotentes nos animais diabéticos.

Comparando ambos os modelos animais, o GLP-I foi mais eficaz em rato diabético (comparado com rato Wistar). Este aumento de eficácia da resposta contrátil ao agonista

endógeno pode relacionar-se com a tendência para o aumento da expressão do GLP-1R observada por Western Blotting em lisados de fundo de estômago isolado de rato GK. O aumento da expressão do recetor pode ser promovido pela patologia como mecanismo compensatório, uma vez que foi comprovada anteriormente por outro grupo de investigadores a diminuição dos níveis plasmáticos e pós-prandiais de GLP-1 em rato GK (comparado com o rato Wistar).

Para a caracterização farmacológica da resposta contrátil aos GLP-1RA, realizaram-se segundas curvas CR ao GLP-1 em tiras de estômago de ratos Wistar, na presença e na ausência de 300 nM de Exendin-3 (antagonista seletivo do recetor do GLP-1) e curvas cumulativas CR ao Liraglutido na presença e na ausência de 250 μ M de N^G-nitro-L-arginina (L-NNA, inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico), ambos adicionados ao banho de órgãos trinta minutos antes da execução das curvas.

Na presença do antagonista Exendin-3, foi observada uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 55% do efeito máximo de contração induzida pelo GLP-1, sem alteração da potência, concluindo-se que a resposta contrátil aos GLP-1RA é mediada parcialmente pelo seu recetor específico.

Na presença do inibidor L-NNA, não foram observadas alterações estatisticamente significativas na resposta contrátil ao Liraglutido, e portanto, esta não parece ser dependente da sintase do óxido nítrico.

Procurando compreender melhor o observável efeito contrátil dos GLP-1RA na nossa preparação, procedeu-se à avaliação do efeito do Liraglutido no relaxamento induzido por um dador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio e pela noradrenalina, em tiras de fundo de estômago isoladas a partir de ratos Wistar e ratos GK tratados com o fármaco.

Para tal, animais com catorze semanas de idade foram divididos em quatro grupos: ratos Wistar e ratos GK administrados com Liraglutido (200 μ g/kg s.c.), duas vezes por dia e durante catorze dias; paralelamente ratos Wistar e ratos GK foram administrados com soro fisiológico NaCl 0,9% (grupo controlo). Foram realizadas medições diárias do peso corporal e a ingestão calórica foi avaliada semanalmente. Os parâmetros bioquímicos, glicemia em jejum (de seis horas), triglicerídeos e colesterol total, e a sensibilidade periférica à insulina foram avaliados no primeiro e no último dia de tratamento com Liraglutido.

Após o tratamento e sacrifício dos animais, foram realizadas curvas cumulativas CR de relaxamento isométrico ao SNP e à NA (0,01 μ M - 631 μ M) em tiras de fundo de estômago

isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido e pré-contraídas com carbacol 5 μ M.

Comprovámos que este GLP-IRA induziu melhorias no perfil glicémico e lipídico e na sensibilidade periférica à insulina nos animais diabéticos sujeitos ao fármaco, e também, redução da ingestão calórica e perda de peso nos ratos tratados. Portanto, estes resultados são bons indicadores dos efeitos benéficos dos GLP-IRA para o tratamento da diabetes tipo II e da obesidade.

Quanto à resposta contrátil do órgão isolado, uma diminuição no relaxamento induzido pelo SNP foi observada em ratos Wistar e GK tratados com Liraglutido (este efeito foi mais acentuado nos animais controlo).

A perda de eficácia do efeito do SNP com o tratamento pode resultar de um possível efeito do Liraglutido na diminuição da libertação ou na degradação do óxido nítrico, sendo que um efeito direto do GLP-IRA sobre a síntese deste neurotransmissor é improvável, uma vez que não foram observadas alterações significativas na expressão da nNOS e da p-nNOS em lisados de fundo gástrico isolado de ratos controlo e diabéticos, tratados e não tratados com Liraglutido.

Além disso, é possível que os GLP-IRA atuem por via da ativação da eNOS, em detrimento da nNOS. Deste modo, a redução da expressão do GLP-IR, como foi demonstrada em ratos Wistar e GK tratados com Liraglutido, pode resultar numa redução da ativação da eNOS, o que por sua vez, resultaria numa diminuição da síntese e da libertação de óxido nítrico e na consequente inibição do relaxamento do músculo liso gástrico. De fato observou-se imunomarcagem do GLP-IR em células endoteliais de vasos sanguíneos co-localizados no plexo nervoso deste órgão. Contudo, há que salientar que não foram observadas alterações significativas na curva CR ao Liraglutido na presença de L-NNA, um inibidor não seletivo da NOS.

Sobre a redução da expressão do GLP-IR em fundo gástrico isolado de ratos tratados com Liraglutido, esta pode ser consequência de uma possível internalização do GLP-IR induzida por uma estimulação prolongada por parte do GLP-IRA. Além disso, também é possível que a perda de peso e a inibição do apetite observada nos ratos tratados com Liraglutido resulte num aumento da secreção de GLP-I e consequente diminuição da expressão de GLP-IR (mecanismo de *feedback* negativo).

O efeito do SNP é equipotente em ratos Wistar tratados e não tratados com Liraglutido, no entanto, foi observada perda de potência do efeito relaxante do SNP em animais diabéticos tratados com o GLP-IRA, sendo que esta pode ser explicada pela perda de neurónios nitrérgicos, como consequência da diabetes tipo II, e deste modo, diminui o relaxamento por diminuição da síntese e libertação de óxido nítrico endógeno. De facto no nosso estudo observou-se uma tendência para diminuição da expressão da nNOS e/ou p-nNOS no rato GK, relativamente ao rato Wistar.

No caso da noradrenalina, foi observada uma perda significativa de potência relativamente à situação controlo, determinada quer pela patologia, quer pelo tratamento.

Sendo que a perda de potência da noradrenalina com o tratamento pode relacionar-se com a sub-regulação da expressão do GLP-IR observada nos ratos tratados com Liraglutido, o que por sua vez, pode resultar numa redução da ativação de vias nervosas adrenérgicas. Enquanto a perda de potência da noradrenalina com a patologia pode ser explicada por uma possível sub-regulação da expressão de recetores beta-adrenérgicos em fundo gástrico isolado de rato diabético. Em ambos os casos, a ação da NA estaria diminuída, assim como, o relaxamento induzido por esta.

Por fim, a imunomarcção do GLP-IR foi detetada nas células parietais das glândulas gástricas, nas células musculares lisas, nas células ganglionares do plexo nervoso e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, em fundo gástrico isolado de rato.

Finalmente, a realização de novos estudos é necessária para compreender melhor a real contribuição do óxido nítrico no mecanismo de ação subjacente ao efeito dos GLPI-RA sobre a motilidade gástrica. E além disso, o uso de animais diabéticos com uma idade mais avançada, ou até mesmo o uso de um outro modelo animal de diabetes tipo II, poderia ajudar a entender melhor as alterações promovidas pela patologia na motilidade gástrica.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus* tipo II, motilidade gástrica, GLP-I, Liraglutido, GLP-IR, óxido nítrico, nNOS.

ABSTRACT

Glucagon-like peptide I (GLP-I) has been studied in the development of new therapeutic strategies for the treatment of type II diabetes because of its metabolic effects, like stimulation of insulin secretion induced by nutrients (incretin effect), stimulation of insulin biosynthesis, inhibition of glucagon secretion and improvement of beta-cell function. GLP-I also promotes cardioprotection, induces satiety, delays gastric emptying, inhibits acid gastric secretion and inhibits gut motility through activation of GLP-IR on enteric neurons and via nitric oxide release.

GLP-IR agonists (GLP-IRA) are drugs that mimic the effects of GLP-I and they are resistant to enzymatic degradation by DPP-IV. GLP-IRA have also been used in the treatment of obesity because of its significant effects in inhibition of appetite and weight loss.

The main aim of this project was to study the effects of GLP-IRA, GLP-I and Liraglutide, in gastric motility and its alterations in the presence of type II diabetes.

To this end, gastric fundus strips from Wistar rats (control group) and *Goto-Kakizaki* rats (GK rat, animal model of spontaneous type II diabetes and non-obese), with sixteen weeks of age, were used in functional studies. Isometric contractile cumulative concentration-response (CR) curves for GLP-IRA were performed (0,05 nM - 111,1 nM) and all gastric fundus strips were pre-contracted with carbachol 5 μ M.

Both GLP-IRA induced concentration-dependent, non-cholinergic and tonic contraction of isolated rat gastric fundus. GLP-I was the most effective in GK rat (compared to Wistar rat) and both GLP-IRA were equivalent in Wistar rat. Inversely, Liraglutide was the most potent in the control group and both agonists were equipotent in diabetic rats.

Comparing both animal models, GLP-I was more effective in diabetic rats than in control rats. This increased efficacy of GLP-I in diabetic rats can be explained, in part, by the tendency of up-regulation of the GLP-IR expression determined, by Western Blotting, in lysates from isolated gastric fundus from GK rat (compared to Wistar rat). This increased GLP-IR expression can be promoted by type II diabetes and can result from a compensation mechanism since a reduction in plasma and post-prandial levels of GLP-I was reported in GK rat (compared to Wistar rat).

For pharmacological characterization of the contractile response to GLP-IRA, second cumulative CR curves for GLP-I in gastric fundus strips from Wistar rats were performed in the absence and in the presence of Exendin-3, 300 nM (selective GLP-IR antagonist) and cumulative CR curves for Liraglutide were performed in the absence and in the presence of N^G-nitro-L-Arginine, 250 μM (L-NNA, non-selective inhibitor of nitric oxide synthase). Both (Exendin-3 and L-NNA) were added to the organ bath thirty minutes before the CR curves.

The GLP-IR antagonist, Exendin-3, caused a statistically significant ($p < 0,05$) reduction of the contractile response induced by GLP-I, without changes in potency, so we can conclude that contraction of gastric fundus induced by GLP-IRA is partially mediated by its specific receptor.

No significant alterations in contractile response to Liraglutide were observed in the absence and in the presence of inhibitor L-NNA, therefore gastric fundus contraction induced by GLP-IRA is independent of nitric oxide synthase.

To better understand the contractile response to GLP-IRA, the effect of the treatment with Liraglutide in isometric relaxation induced by a nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP) and by noradrenaline, in isolated gastric fundus from Wistar and GK rats was evaluated.

To this end, Wistar and GK rats with fourteen weeks of age were divided into four groups: Wistar and GK rats treated with Liraglutide (200 μg/kg s.c.) twice daily and for fourteen days; and Wistar and GK rats treated with saline (NaCl 0,9% s.c.) during the same period.

Body weight and caloric intake were evaluated daily and weekly, respectively. Biochemical analyses (fasting glycaemia, triglycerides and total cholesterol) and insulin tolerance evaluation were performed on the first and on the last day of the treatment.

After treatment with Liraglutide, cumulative CR curves for SNP and NA were performed (0,01 μM - 631 μM) and all gastric fundus strips from Wistar and GK, treated and non-treated, rats were pre-contracted with carbachol 5 μM.

We proved that Liraglutide induced an improvement of biochemical profile and peripheral insulin tolerance in diabetic rats, and also, a significant decrease in caloric intake and body weight in treated-rats. Therefore, we can conclude that GLP-IRA are beneficial for the treatment of type II diabetes and obesity.

A decrease in relaxation induced by SNP was observed in Wistar and GK rats treated with Liraglutide and this effect was more significant in Wistar rats.

The loss of efficacy of SNP effect determined by the treatment with Liraglutide can be explained by a possible effect of this GLP-1RA in reduction of release or in degradation of nitric oxide. A direct effect in nitric oxide synthesis is unlikely to occur because no significant alterations were observed in nNOS and p-nNOS expression in isolated gastric fundus from treated and non-treated rats.

Besides that, if GLP-1RA could act through eNOS activation, instead of nNOS, a reduction in GLP-1R expression (demonstrated, in this study, in Wistar and GK rats treated with Liraglutide) could result in a reduction of eNOS activation and consequently, in a reduction of nitric oxide release and relaxation of gastric smooth muscle. In fact GLP-1R was detected (by immunohistochemical studies) in endothelial cells of blood vessels co-localized in nervous plexus of gastric fundus. But no significant alterations were observed in CR curves to Liraglutide in the presence of L-NNA (a non-selective inhibitor of NOS).

About the significant reduction of GLP-1R expression in isolated gastric fundus from rats treated with Liraglutide (compared to non-treated rats), it can be explained by a compensation mechanism between a probable increase of plasmatic levels of GLP-1 induced by weight loss and inhibition of appetite and the reduction of GLP-1R expression in treated-rats (negative feedback mechanism). Besides that, it's possible that Liraglutide could promote GLP-1R internalization induced by a prolonged stimulation to this GLP-1RA.

SNP was equipotent in Wistar treated and non-treated rats, but a loss of potency of SNP effect was observed in diabetic and treated-rats and it can be explained by the fact that diabetes promotes loss of nitrergic neurons and subsequent reduction of nitric oxide synthesis and release, so relaxation of gastric smooth muscle is inhibited. In fact, in our study, a tendency to decreased nNOS and p-nNOS expression in lysates from gastric fundus was observed in GK rat (compared to Wistar rat).

Noradrenaline was less potent in Wistar and GK rats treated with Liraglutide, indicating loss of potency with the treatment. Comparing control and diabetic rats, NA was significantly less potent in GK rat, suggesting loss of potency determined by type II diabetes.

Loss of potency of noradrenaline with the treatment can be related to the down-regulation of GLP-1R expression in gastric fundus from treated-rats, since GLP-1RA can act

through GLP-IR and subsequent sympathetic adrenergic pathways activation. In this case, a decrease in GLP-IR expression could result in a decrease in activation of sympathetic adrenergic pathways and consequently, in inhibition of noradrenaline action.

Loss of potency of NA with the pathology can be explained by a possible down-regulation of beta-adrenergic receptors in gastric fundus induced by type II diabetes and therefore, noradrenaline action would be reduced and also relaxation induced by NA.

Finally, GLP-IR immunoreactivity was observed in parietal cells of gastric glands, in smooth muscle cells, in ganglion cells of nervous plexus and in endothelial cells of blood vessels, in isolated rat gastric fundus.

To conclude, new studies are necessary to better understand the real contribution of nitric oxide in the action mechanism of GLP-IRA effect in gastric motility. And the use of older diabetic animals or even using another animal model of type II diabetes could help understanding gut motility alterations caused by diabetes.

Keywords: Type II diabetes, gastric motility, GLP-I, Liraglutide, GLP-IR, nitric oxide, nNOS.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I. DIABETES MELLITUS TIPO II

I.1 Caracterização fisiopatológica da Diabetes Mellitus tipo II

A Diabetes Mellitus tipo II (DM II) é uma doença metabólica crónica cuja prevalência global tem vindo a aumentar nos últimos anos e que corresponde a cerca de 90% dos casos diagnosticados de Diabetes Mellitus (os restantes 10% correspondem a casos de Diabetes Mellitus tipo I). Esta patologia é classificada como multifatorial e destacam-se os seguintes fatores etiológicos: hábitos alimentares não saudáveis (dieta hipercalórica, por exemplo) e o sedentarismo que contribui para um decréscimo no dispêndio energético.

O aumento da taxa de mortalidade e os elevados custos socioeconómicos (maior dispêndio monetário e diminuição da qualidade de vida) resultam sobretudo das consequências fisiopatológicas da Diabetes Mellitus tipo II, as complicações microvasculares (neuropatia, retinopatia, nefropatia, disfunção endotelial) e macrovasculares (doenças cardiovasculares, como por exemplo enfarte agudo do miocárdio). Além disso, o aumento da prevalência da diabetes tipo II também pode correlacionar-se com o aumento da obesidade, sendo esta uma das comorbilidades mais comuns desta patologia.

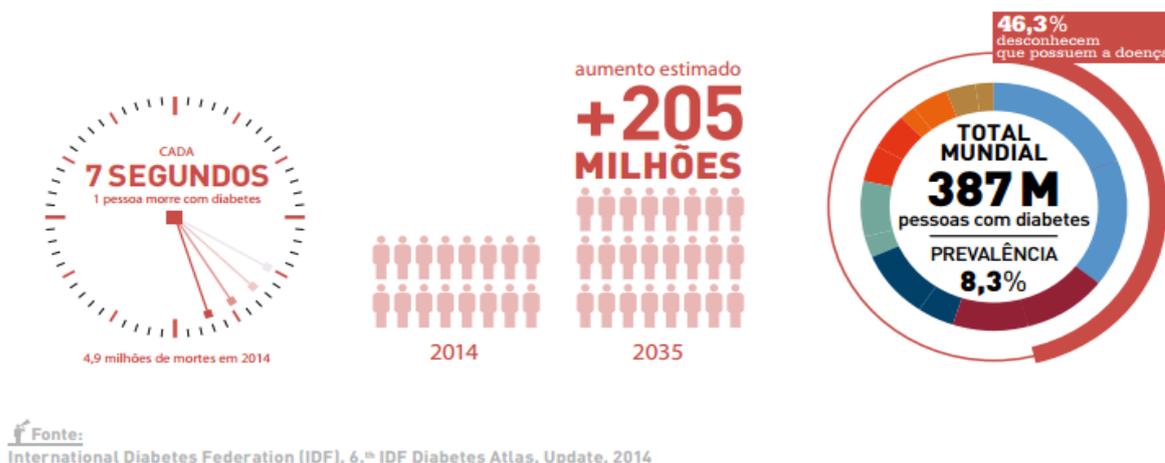


Figura I – Aumento da taxa de mortalidade e da prevalência global associadas à DM II; Retirado de: "Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2014"; Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes.

A Diabetes *Mellitus* tipo II é caracterizada principalmente por insulinoresistência e/ou deficiente secreção de insulina e, por conseguinte, há uma desregulação da homeóstase da glicose que evolui para uma hiperglicemia crônica, e deste modo, para as complicações características desta patologia.⁸

Os indivíduos diabéticos do tipo II podem apresentar inicialmente uma hiperinsulinemia como resultado de uma fraca capacidade de “resposta” à insulina por parte dos tecidos periféricos e de uma demanda contínua sobre as células beta-pancreáticas dos ilhéus de Langerhans, responsáveis pela biossíntese e secreção de insulina em resposta ao aumento de glicose no plasma.^{9,10}

A deficiente secreção de insulina resulta de uma disfunção das células beta-pancreáticas. Por sua vez, esta disfunção resulta do aumento da apoptose das células beta-pancreáticas, sendo que esta é induzida pela glucotoxicidade, pela lipotoxicidade, pelo *stress* oxidativo e disfunção mitocondrial, pelo aumento de citocinas inflamatórias e pela disfunção dos mecanismos de *clearance* celular (autofagia, por exemplo).⁹

A disfunção das células-beta caracteriza-se por uma incapacidade destas células em sintetizar as quantidades adequadas de insulina, em resposta ao aumento da glicemia, e/ou por um aumento na secreção desta hormona de modo a compensar e a manter os níveis de glicemia “controlados”. Consequentemente, a *clearance* de glicose é insuficiente e tal resulta numa intolerância à glicose ou hiperglicemia. A disfunção das células-beta vai progredindo à medida que a Diabetes *Mellitus* tipo II evolui.

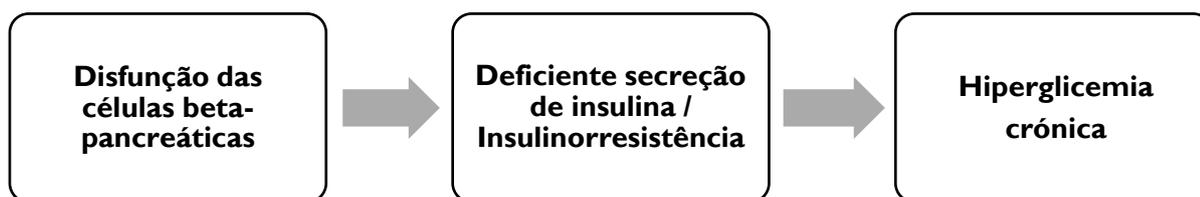


Figura 2 – Ilustração das principais características fisiopatológicas da DM II e sua evolução.

Além das alterações metabólicas, também observam-se alterações estruturais nos ilhéus pancreáticos de indivíduos diabéticos do tipo II, nomeadamente arteriosclerose, formação de agregados de próamilina e a deposição de amilóide nos ilhéus de Langerhans, “infiltrações” de adipócitos, entre outros.⁹

A insulina é a principal hormona hipoglicemiante do organismo e promove a manutenção dos níveis de glicemia e a regulação do metabolismo da glicose. A sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina corresponde a um dos fatores fundamentais para um controlo glicémico efetivo.

O estímulo para a secreção de insulina consiste na interação da glicose com o seu respetivo transportador GLUT2 (*glucose transporter 2*) presente na membrana da célula beta-pancreática; após esta interação, a glicose difunde para o meio intracelular; no citoplasma, ocorre a glicólise, e de seguida ocorre o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa na mitocôndria o que resulta num balanço positivo do rácio ATP/ADP; o aumento de ATP intracelular promove o bloqueio de canais de potássio (K^+) sensíveis ao ATP induzindo a despolarização membranar; por sua vez, esta induz a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes da voltagem; deste modo, o influxo de cálcio para o meio intracelular aumenta e é induzida a desgranulação de vesículas secretoras que armazenam a insulina; estas fundem-se com a membrana citoplasmática e conseqüentemente, a insulina é libertada por exocitose.

Existe o conceito de um “*cross-talk*” entre as células beta-pancreáticas e os tecidos periféricos que pode ser descrito do seguinte modo: a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas medeia a captação de glicose pelos tecidos periféricos, e por conseguinte, os tecidos periféricos “comunicam”, através de sinais neuronais e humorais, com os ilhéus pancreáticos para que estes iniciem ou cessem a secreção de insulina de acordo com as suas “necessidades” metabólicas.¹⁰

Como referido acima, a obesidade é uma das comorbilidades da diabetes tipo II e é caracterizada por uma inflamação sistémica que pode contribuir para a disfunção das células beta-pancreáticas. A acrescentar a isto, a expansão do tecido adiposo está associada à deposição e ativação de macrófagos, o que por conseguinte, resulta num aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias para a circulação sanguínea, sendo que estas vão atuar em tecidos periféricos, como o músculo e o fígado, promovendo a insulinoresistência destes por interrupção da via de sinalização da insulina. Também podem ocorrer processos inflamatórios a nível central, nomeadamente no hipotálamo, e tal pode contribuir, por exemplo, para a resistência à leptina e o aumento de peso.¹⁰

Em relação à regulação do controlo glicémico, esta é efetuada diretamente por vias neuronais e indiretamente por via humoral (o exemplo mais comum consiste no balanço entre a secreção de insulina e glucagona). O nervo vago participa na regulação da secreção hormonal pelos ilhéus pancreáticos.¹⁰ E no sistema nervoso central, o hipotálamo desempenha um papel fundamental na regulação do peso corporal.

No que diz respeito ao sistema nervoso, as alterações metabólicas características da diabetes tipo II podem causar lesões a nível neuronal que a longo prazo, podem evoluir para uma neuropatia diabética ou disfunção dos processos de aprendizagem, memória e cognição. A diabetes tipo II também compromete a plasticidade sináptica e induz diminuição da neurogénese e disfunção da neurotransmissão. Tal explica a correlação positiva entre a Diabetes *Mellitus* tipo II e a progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.¹¹

A hiperinsulinemia crónica e a insulinoresistência induzem diminuição da expressão de recetores da insulina presentes na barreira hemato-encefálica e conseqüente diminuição da captação de insulina pelo cérebro, tal pode culminar numa insulinoresistência cerebral. Além disso, a insulinoresistência e a desregulação do metabolismo da glicose a nível central induzem decréscimo do fluxo sanguíneo cerebral.¹¹

Concluindo e tendo em conta que atualmente a Diabetes *Mellitus* tipo II é considerada uma patologia epidémica global, pois o número de casos diagnosticados tem vindo a aumentar e esta patologia surge a uma idade cada vez mais precoce, é essencial o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas ou a otimização das já existentes.

1.2 Terapêutica da Diabetes *Mellitus* tipo II

Devido ao aumento da incidência e da prevalência da Diabetes *Mellitus* tipo II nos últimos anos, a necessidade de prescrever terapêutica medicamentosa e de desenvolver novos fármacos e novas estratégias terapêuticas com o objetivo de prevenir e tratar a diabetes tipo II tem vindo a aumentar exponencialmente.

Um dos fármacos antidiabéticos de “primeira linha” na terapêutica da Diabetes *Mellitus* tipo II é a Metformina. Este pertence à classe das biguanidas, é um insulino-sensibilizador, promovendo a ação da insulina e a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Inibe igualmente a neoglucogénese hepática, diminui os níveis de hemoglobina glicosilada, previne o aumento da oxidação proteica e lipídica e tem efeito anti-inflamatório. A Metformina também estimula a biossíntese e a secreção de glucagon-like peptide I (GLP-I) pelas células enteroendócrinas do tipo L em roedores e nos humanos.^{7,12,13} É eficaz em indivíduos diabéticos do tipo II obesos e não-obesos.

As principais classes de fármacos antidiabéticos incluem os sensibilizadores da insulina, como as biguanidas e glitazonas; os essencialmente insulinosecretores, como as sulfonilureias e meglitinidas; os inibidores da alfa-glucosidase; os incretino-miméticos, como os agonistas do recetor do GLP-I (GLP-IRA) e os inibidores da dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV); e os inibidores dos co transportadores de sódio/glicose do tipo 2 (*sodium-glucose cotransporter 2*, SGLT2). A insulinoterapia também pode ser aplicada na terapêutica da diabetes tipo II.¹⁰

Além da terapêutica medicamentosa referida, a adoção de hábitos alimentares mais saudáveis e a prática de exercício físico também contribuem para a prevenção e o tratamento da Diabetes *Mellitus* tipo II e para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos. É igualmente importante educar a população e alertá-la para os riscos e consequências desta patologia.

Por fim, novas estratégias e alvos terapêuticos têm sido estudados, como exemplo, o desenvolvimento de novas formulações de agonistas do GLP-IR que possibilitem a sua administração por via oral e/ou inalatória.^{10,13}

	Sulfonil- ureias	Metformina	Glitazonas	Inibidores da DPP-IV	Agonistas do GLP-1R	
					Curta duração de ação	Longa duração de ação
Secreção de insulina	Aumento	Sem efeito	Sem efeito	Aumento dependente da glicose	Aumento dependente da glicose	Aumento dependente da glicose
Sensibilidade das células-beta à glicose	Sem efeito	Aumento	Sem efeito	Aumento	Aumento	Aumento
Insulino-sensibilidade periférica	Sem efeito	Aumento	Aumento	---	---	---
Proliferação das células beta-pancreáticas	---	---	---	---	Aumento	Aumento
HbA1c	Redução	Redução	Redução	Redução	Redução	Redução
Saciedade	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Aumento	Aumento	Aumento
Esvaziamento gástrico	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Inibição	Inibição	Inibição
Peso	Aumento	Sem efeito	Aumento	Sem efeito	Redução	Redução
Reações adversas gastrintestinais	Sim	---	---	Sim	Sim	Sim
Risco de hipoglicemia	Sim	Sim (risco baixo)	Não	Não	Não	Não

Tabela I – Comparação entre as principais classes farmacológicas para a terapêutica da DM II;
Adaptado de ⁶

2. GLUCAGON-LIKE PEPTIDE I (GLP-I)

2.1 Caracterização biológica e fisiológica do GLP-I

O glucagon-like peptide I (GLP-I) é um péptido sintetizado e secretado pelas células enteroendócrinas do tipo L localizadas maioritariamente no íleo (região distal do intestino delgado).¹² Este resulta da clivagem do proglucagon, pela prohormona convertase 1/3 (PC1/3), em duas formas equipotentes, GLP-I (7-36) e GLP-I (7-37), sendo que a última referida representa a maioria da forma bioativa do GLP-I que difunde para a circulação sanguínea.^{6,7}

A secreção desta incretina ocorre em resposta à entrada de nutrientes no organismo, principalmente quando os hidratos de carbono e a glicose entram em contacto com o lúmen intestinal.^{6,12,14} No entanto, há outros fatores, de natureza neuronal e endócrina, que também influenciam a secreção pós-prandial de GLP-I e esta caracteriza-se pela ocorrência de dois picos em tempos distintos: o primeiro ocorre dez a quinze minutos após a ingestão de alimentos e pode ser explicado pela chegada de nutrientes à região proximal do trato gastrointestinal, estômago e intestino proximal, e por conseguinte, são ativadas vias neuronais aferentes (do nervo vago, por exemplo) que estimulam por sua vez a secreção de GLP-I pelas células enteroendócrinas do tipo L; também o *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP) e alguns neurotransmissores (a acetilcolina, por exemplo) podem estimular a secreção de GLP-I;¹² o segundo pico de secreção do GLP-I ocorre durante a segunda hora do período pós-prandial e é explicado pelo contacto direto dos nutrientes com as referidas células enteroendócrinas localizadas no íleo. Após o término da estimulação da secreção de GLP-I, a concentração deste péptido decresce até níveis basais.^{6,8,12,15}

O GLP-I desempenha inúmeras funções metabólicas que são benéficas para o organismo, nomeadamente, potenciação da secreção de insulina induzida pela glicose (que corresponde ao denominado “efeito incretina”), aumento da biossíntese de insulina, inibição da secreção de glucagon (hormona hiperglicemiante) pelas células alfa-pancreáticas, estimulação da proliferação e inibição da apoptose de células beta-pancreáticas, melhoria da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, estimulação da glicogénese nas células musculares, nos hepatócitos e nos adipócitos e inibição do apetite.^{1-3,7,8,14}

No caso particular do trato gastrointestinal, o GLP-I inibe a motilidade deste, inibe o esvaziamento gástrico e diminui a secreção ácida gástrica por ativação do GLP-IR presente nas células parietais.

A nível cardiovascular, este péptido promove cardioproteção e melhoria da função cardíaca, pois protege os vasos sanguíneos do stress oxidativo e da apoptose, além de melhorar também a disfunção endotelial.

Os efeitos protetivos do GLP-I são dependentes da inibição da Rho-cinase através de uma via de sinalização mediada pelo AMPc e pela proteína cinase A (*protein kinase A*, PKA). Foi já demonstrado que o Liraglutido (agonista do GLP-IR) induz aumento da fosforilação da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) e a consequente libertação deste gás, por ativação de uma via de sinalização dependente da *5-AMP-activated protein kinase* (AMPK), em cultura de células.¹⁶

Em relação ao efeito do óxido nítrico sobre os vasos sanguíneos, este gás induz relaxamento das células musculares lisas vasculares. A síntese de óxido nítrico pela eNOS é mediada pela fosforilação desta enzima e depende da ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K)/ *Activated protein kinase B* (Akt). Este gás difunde para o espaço entre o endotélio e a camada muscular lisa vascular e estimula a ativação da enzima guanilato ciclase (GC) e consequente síntese de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) no meio intracelular, o que por fim, induz o efeito do óxido nítrico sobre a musculatura lisa dos vasos sanguíneos.¹⁷

No tecido adiposo branco, o GLP-I inibe a lipogénese e diminui os níveis de triglicéridos. Enquanto no tecido adiposo castanho, promove indiretamente termogénese por via da ativação de recetores do GLP-I localizados no cérebro.¹⁴

Esta incretina também possui efeitos anti-inflamatórios, nomeadamente no pâncreas, no sistema cardiovascular e no sistema nervoso através da inibição da ação de citocinas pró-inflamatórias e da inibição da ativação da microglia.

O GLP-I “comunica” com o Sistema Nervoso Central através de vias sensoriais aferentes do nervo vago, é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e estimula a neurogénese e a proliferação de células neuronais, e por outro lado, inibe a sua apoptose.

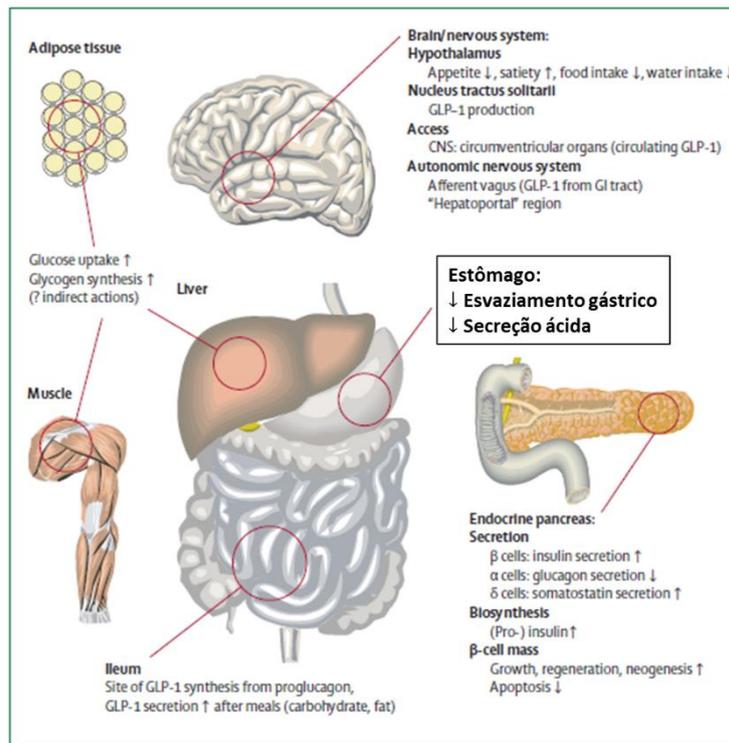


Figura 3 – Efeitos fisiológicos do GLP-1 e seus análogos (GLP-1RA); Adaptado de ¹

O GLP-1 é metabolizado rapidamente na circulação sanguínea pela enzima DPP-IV, e por essa razão, possui um tempo de semi-vida muito curto (aproximadamente, dois minutos).^{1,3,7,8}

O recetor do GLP-1 (GLP-1R) pertence à classe dos recetores transmembranares associados a proteína G (recetores metabotrópicos) e é caracterizado estruturalmente por um domínio extracelular que corresponde a um terminal amino (NH₂) responsável pelo reconhecimento e interação ligando-recetor, por três pontes dissulfeto e vários locais de glicosilação no domínio extracelular.^{6,14}

O GLP-1R é também um recetor adenil ciclase (AC) positivo, e portanto, quando o GLP-1 interage com o seu recetor, o aumento do AMPc intracelular é induzido através da ativação da enzima.

No que diz respeito à via de sinalização do GLP-1 na célula beta-pancreática, a interação deste com o GLP-1R induz aumento do AMPc, conseqüentemente a PKA é ativada induzindo o bloqueio de canais de potássio dependentes do ATP, e por conseguinte, ocorre despolarização membranar; esta promove a abertura de canais de cálcio dependentes da

voltagem induzindo o influxo de cálcio; o aumento deste catião no meio intracelular estimula a fusão das vesículas secretoras e armazenadoras de insulina com a membrana citoplasmática, e por fim, ocorre a exocitose da insulina.^{6,13,14}

Na via de sinalização descrita acima, também é ativada a proteína *exchange protein activated by cAMP* (Épac) 2 que estimula a fusão das vesículas secretoras com a membrana citoplasmática da célula beta-pancreática e que está envolvida diretamente na transcrição génica da proinsulina.^{6,14}

Porém existem outras vias de sinalização, independentes da ativação da PKA, que explicam e contribuem para a potenciação da secreção de insulina induzida pelo GLP-1.

Em relação ao efeito desta incretina sobre a proliferação das células beta-pancreáticas, este depende da expressão génica do *pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx-1), pois o aumento da síntese deste gene inibe vias de sinalização pró-apoptóticas na célula-beta, contribuindo assim para o efeito anti-apoptótico do GLP-1.¹³

A ativação do GLP-1R também promove a ativação do *epidermal growth factor receptor* (EGFR), da PI3K e do *extracellular-signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), da via de sinalização do IRS-2 (*insulin receptor substrate-2*) e da translocação nuclear da proteína cinase C (*protein kinase C*, PKC), e deste modo, o GLP-1 medeia a proliferação e diferenciação das células-beta e induz a transcrição génica da insulina.²

A β -arrestina-1 regula a internalização e a dessensibilização do GLP-1R, mas também é necessária para o efeito insulínico e citoprotetivo do GLP-1 na célula beta-pancreática.

O GLP-1 também aumenta a expressão do *insulin-like growth factor receptor 1* (IGF-1R) por mecanismos dependentes do AMPc e da PKA e o ligando *insulin-like growth factor 2* (IGF-2) regula os efeitos biológicos do GLP-1 na célula-beta. A estimulação das vias de sinalização do IGF-1R/IGF-2 pelo GLP-1 estimula a proliferação das células beta-pancreáticas. Portanto, o GLP-1 promove a sobrevivência celular aumentando a secreção de IGF-2 e estimulando a via de sinalização IGF-1R/IGF-2.^{14,16}

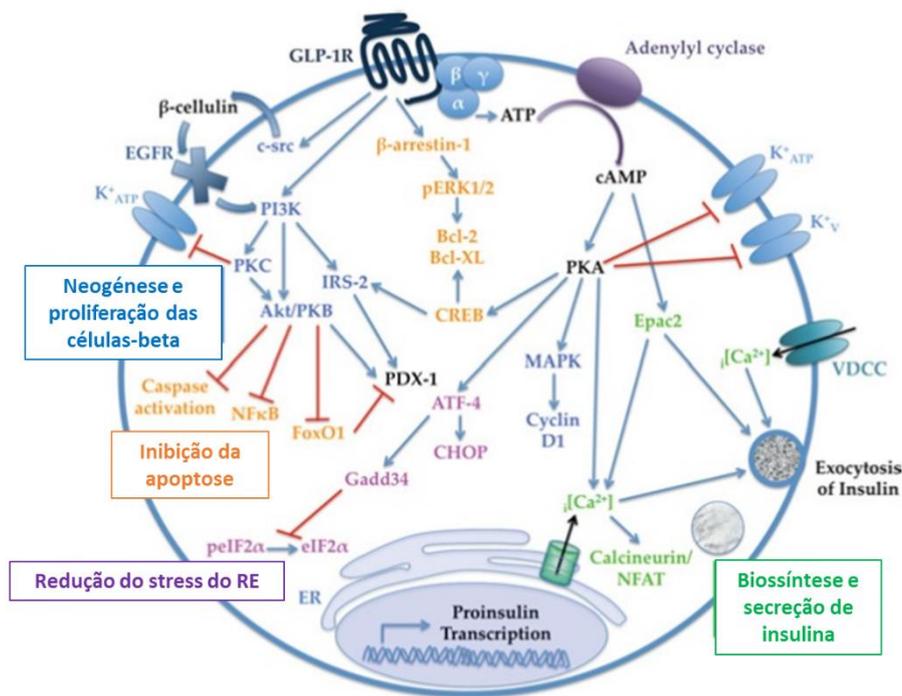


Figura 4 – Via de sinalização do GLP-1R na célula beta-pancreática; Adaptado de ²

O recetor do GLP-1 está expresso nas células beta-pancreáticas, no intestino, no estômago (mais propriamente nas células parietais e nas células enteroendócrinas das glândulas gástricas, o que explica a regulação da secreção ácida gástrica por este péptido¹⁸), tecido adiposo, rim, coração, pulmão, cérebro (regiões do hipotálamo e do hipocampo), em neurónios do nervo vago e em neurónios entéricos.^{1,6,15,19} Há estudos que reportam a expressão do GLP-1R em células-alfa (responsáveis pela secreção de glucagina) e células-delta pancreáticas (responsáveis pela secreção de somatostatina).⁶

No Sistema Nervoso Central (SNC), o recetor do GLP-1 está expresso em regiões que controlam o apetite, como o hipotálamo. Além disso, a ativação de GLP-1R expressos a nível central medeia alguns dos efeitos indiretos deste péptido no controlo da homeóstase glicémica, da motilidade gastrointestinal, da ingestão de alimentos e da função cardiovascular.

Por fim, os efeitos fisiológicos do GLP-1 são mediados em parte pelo Sistema Nervoso Autónomo (SNA) e por vias neuronais aferentes (nomeadamente as do nervo vago), pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE) e por ação direta sobre os tecidos e órgãos-alvo através da ativação de recetores presentes nos locais-alvo.⁶

2.2 O efeito do GLP-I na Diabetes Mellitus tipo II

O “efeito incretina” encontra-se significativamente diminuído em indivíduos com diabetes tipo II o pode ser explicado pela diminuição dos níveis plasmáticos do GLP-I e do GIP, pela perda de efeito insulínico do GIP e por redução da potência do efeito do GLP-I. A insulínorresistência é também uma das explicações para a diminuição da secreção e da ação das incretinas na diabetes tipo II.^{1,7,12}

A diminuição da secreção do GLP-I e do GIP evolui com a progressão da Diabetes Mellitus tipo II. Porém, o GLP-I mantém o seu potencial insulínico, razão pela qual se tem tornado um importante alvo terapêutico no desenvolvimento de novos fármacos para a Diabetes Mellitus tipo II.

No caso particular do estômago, os indivíduos diabéticos do tipo II apresentam diminuição da expressão do recetor do GLP-I nas glândulas gástricas, sendo que a hiperglicemia *per si* contribui para esta redução na expressão do GLP-IR na mucosa gástrica.¹⁸

A administração contínua de agonistas do GLP-IR a indivíduos diabéticos do tipo II promove redução da glicemia em jejum e pós-prandial para níveis basais. Este efeito hipoglicemiante é induzido principalmente pela estimulação da secreção de insulina e inibição da secreção de glucagina, assim como pela inibição do esvaziamento gástrico.

Os incretino-miméticos também promovem aumento dos níveis plasmáticos das incretinas, e conseqüentemente, das suas ações benéficas para o controlo glicémico e tratamento da diabetes tipo II.²⁰

Fenótipo	Efeitos do GLP-I
Disfunção das células beta-pancreáticas	Estimulação da secreção de insulina induzida pela glicose; estimulação da biossíntese de insulina; melhoria da função das células-beta; estimulação da transcrição de genes essenciais para a função das células-beta.
Diminuição da massa de células beta-pancreáticas	Aumento da proliferação e da diferenciação e inibição da apoptose de células-beta.
Aumento da secreção de glucagina	Inibição da secreção de glucagina.
Obesidade	Inibição do esvaziamento gástrico e inibição do apetite, promovendo perda de peso.
Complicações macrovasculares	Efeito cardiovascular benéfico/protetor.
Insulínorresistência	Aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina.

Tabela 2 – Os efeitos do GLP-I na DM II; Adaptado de ⁷

2.2.1 Incretino-miméticos: agonistas do GLP-IR e inibidores da DPP-IV

O principal efeito dos incretino-miméticos, agonistas do GLP-IR e inibidores da DPP-IV, consiste na potenciação da via de sinalização e ação das incretinas GLP-I e GIP.⁸

Os inibidores da DPP-IV, enzima responsável pela degradação rápida das incretinas GLP-I e GIP logo após a sua entrada na circulação sanguínea, promovem o aumento da concentração plasmática das incretinas, e deste modo, é induzido o aumento da secreção de insulina, a diminuição da secreção de glucagona e consequentemente a diminuição dos níveis de glicose no plasma. Esta classe farmacológica promove ainda diminuição dos níveis plasmáticos da hemoglobina glicosilada (HbA1c), aumenta a proliferação e diminui a apoptose das células beta-pancreáticas, além de melhorar a sensibilidade à glicose das células-beta aumentando a expressão de GLUT2 e de hexocinase.

Os agonistas do recetor do GLP-I mimetizam os efeitos fisiológicos deste péptido e são resistentes à ação enzimática da DPP-IV, deste modo o tempo de semi-vida e a duração de ação são superiores às do agonista endógeno. Os GLP-IRA foram já aprovados como agentes monoterapêuticos e como adjuvantes no tratamento da Diabetes *Mellitus* tipo II.⁸

Os principais efeitos que caracterizam esta classe farmacológica incluem diminuição dos níveis plasmáticos de HbA1c, aumento da secreção de insulina, redução do risco de hipoglicemia, melhoria da função das células beta-pancreáticas e perda de peso. Outros efeitos benéficos incluem decréscimo da pressão arterial e aumento da frequência cardíaca.³

Porém, os agonistas do GLP-IR são também caracterizados por efeitos adversos frequentes sobre o trato gastrointestinal, nomeadamente, náuseas, vômitos e diarreia.

A administração subcutânea destes fármacos demonstrou ser eficaz na melhoria do perfil glicémico de indivíduos diabéticos do tipo II.

A acrescentar, a sinalização do GLP-IR exerce efeitos neurotróficos e neuroprotectivos, com implicações na terapêutica de doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer e doença de Parkinson).¹⁴ Ainda a nível central, a perda de peso associada aos GLP-IRA pode depender da ativação de recetores do GLP-I localizados no cérebro e a nível periférico.

O primeiro agonista do GLP-IR aprovado para a terapêutica da diabetes tipo II corresponde ao Exenatido e este consiste num análogo do GLP-I com 53% de homologia e de curta duração de ação; foi isolado da saliva do lagarto *Gila monster* e possui um efeito insulínico mais potente que o GLP-I endógeno. O Exenatido diminui os níveis plasmáticos de hemoglobina glicosilada e a glicemia (sendo que o seu efeito hipoglicemiante é mais evidente no período pós-prandial), induz proliferação das células beta-pancreáticas, aumenta a síntese e secreção de insulina e inibe o esvaziamento gástrico.^{7,8,14}

O Liraglutido é um dos agonistas do GLP-IR de longa duração de ação que entrou recentemente no mercado e consiste no GLP-I conjugado a um ácido gordo (o ácido palmítico), sendo que esta modificação estrutural aumenta a ligação deste bioconjugado à albumina, e deste modo, promove a otimização da farmacocinética, nomeadamente da distribuição do fármaco no organismo, protegendo este agonista do GLP-IR da ação proteolítica da DPP-IV e prevenindo a sua eliminação por via renal.

O Liraglutido também diminui os níveis plasmáticos da HbA1c, diminui a glicemia pós-prandial e em jejum, melhora a função das células beta-pancreáticas e promove perda de peso.^{2,3,7,8,14}

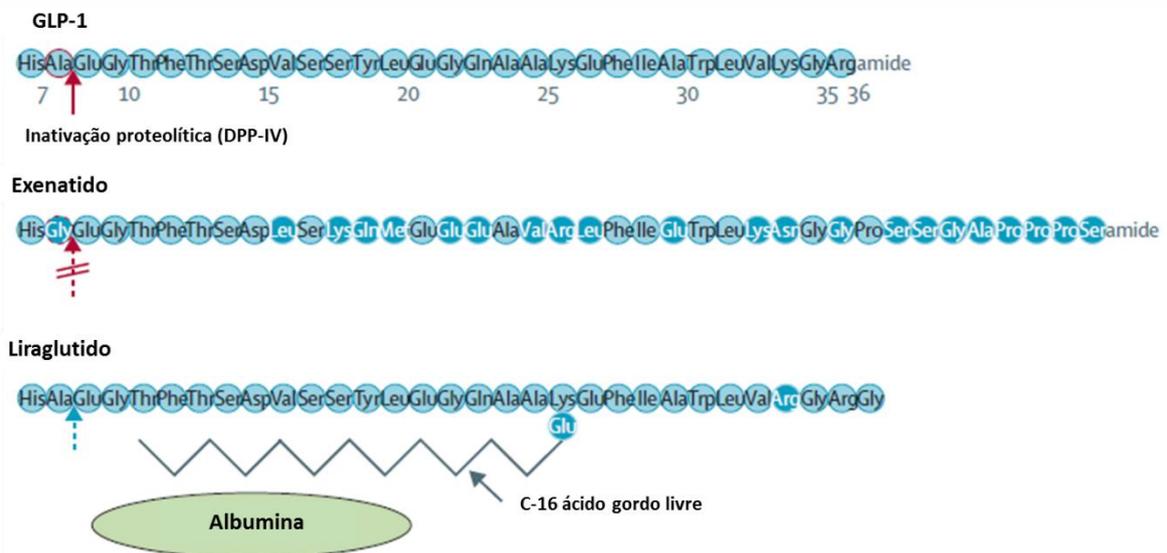


Figura 5 – Estrutura do GLP-I e seus análogos, Exenatido e Liraglutido; Adaptado de ¹

Existem diferenças significativas entre os efeitos dos agonistas do GLP-IR de curta duração de ação e os de longa duração de ação, das quais importa destacar: a inibição do esvaziamento gástrico é mais significativa com o uso de agonistas do GLP-IR de curta duração de ação, assim como, a redução da glicemia pós-prandial; por outro lado, os agonistas do GLP-IR de longa duração de ação diminuem mais significativamente a glicemia em jejum, sendo mais evidentes o aumento da secreção de insulina e a inibição da secreção de glucagona, e portanto, o controlo glicémico é mais efetivo.

Relativamente aos efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal, estes são mais frequentes com os GLP-IRA de curta duração de ação, comparados com os de longa duração de ação, e por isso, a tolerabilidade destes últimos é superior.^{3,8}

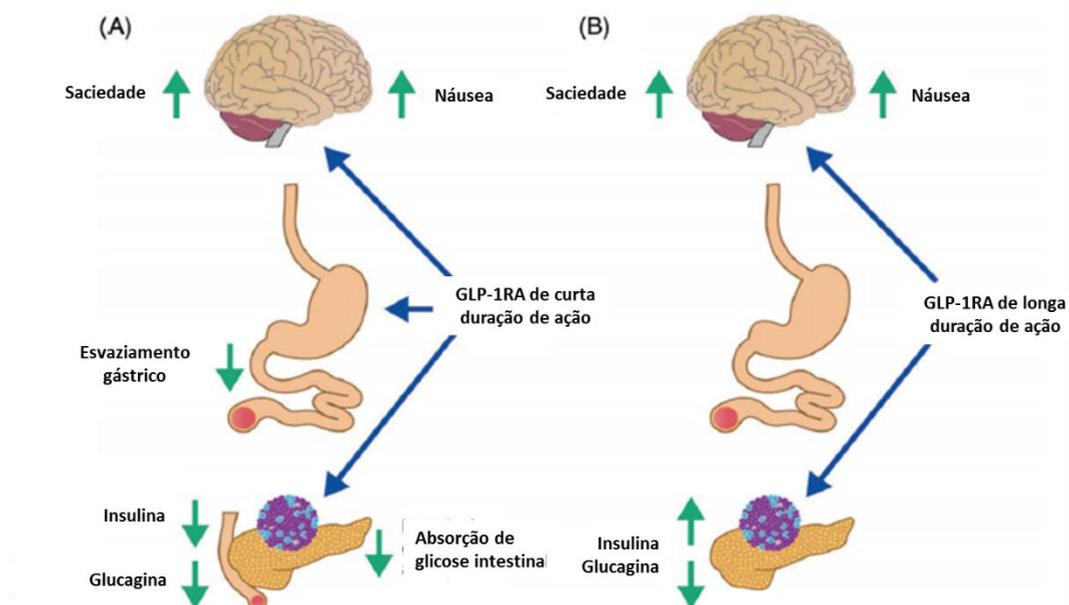


Figura 6 – Comparação entre os agonistas do GLP-IR de curta duração de ação (A) e os GLP-IRA de longa duração de ação (B); Adaptado de ³

Estudos em modelos animais demonstraram que o GLP-1 causa efeitos adversos mediados pelo seu recetor no pâncreas exócrino. Existe uma correlação positiva entre o risco de pancreatite em doentes diabéticos do tipo II e a terapêutica com agonistas do GLP-IR, uma vez que a ativação do recetor presente nos ácinos pancreáticos pode resultar na apoptose e metaplasia destas células e consequente inflamação (efeito pró-apoptótico).⁶

Contudo, os efeitos adversos mais comuns dos agonistas do GLP-IR correspondem a efeitos sobre o trato gastrointestinal, nomeadamente, náusea, vómitos e diarreia; e são efeitos dose-dependentes.^{3,8} Uma vez que estas reações adversas não se observam com os inibidores da DPP-IV, a tolerabilidade destes é superior à dos GLP-IRA.

O desenvolvimento de novos fármacos pertencentes a esta classe farmacológica (GLP-IRA) tem como objetivos a otimização das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e a diminuição da ocorrência de efeitos adversos.¹⁰

Os agonistas do GLP-IR são clinicamente mais eficazes que os inibidores da DPP-IV, embora tenham que ser administrados por via parentérica, ao contrário dos inibidores da DPP-IV que são administrados por via oral. Ambas as classes farmacológicas não apresentam risco de hipoglicemia, uma vez que as incretinas não estimulam a secreção de insulina quando os níveis de glicose no plasma não estão elevados.⁶

Efeitos das incretinas na DMII	GLP-I endógeno	Agonistas do GLP-IR		Inibidores da DPP-IV
		<i>Exenatido</i>	<i>Liraglutido</i>	
Estimulação da secreção de insulina induzida pela glucose	Sim	Sim	Sim	Sim
Inibição da secreção de glucagona	Sim	Sim	Sim	Sim
Aumento da síntese de insulina	Sim	Sim	Sim	Sim
Aumento da massa de células beta-pancreáticas	Sim	Sim	Sim	Sim
Inibição da apoptose das células-beta	Sim	Sim	Sim	Sim
Inibição do esvaziamento gástrico	Sim	Sim	Sim	Pouco significativo
Inibição do apetite	Sim	Sim	Sim	Sem efeito
Perda de peso	Sim	Sim	Sim	Sem efeito

Tabela 3 – Comparação entre o GLP-I, os agonistas do GLP-IR e os inibidores da DPP-IV;
Adaptado de ¹

3. SISTEMA GASTRINTESTINAL

3.1 Fisiologia do sistema gastrintestinal

O sistema gastrintestinal é responsável pelo transporte, armazenamento e digestão dos alimentos ingeridos e pela absorção dos nutrientes. Cada órgão deste sistema possui propriedades morfológicas e biomecânicas diferentes e que correlacionam-se com a sua função.

A nível histológico, a parede do tubo digestivo é composta pelas seguintes camadas: mucosa, muscular da mucosa, submucosa, camada muscular e serosa. A mucosa reveste internamente a parede do trato gastrintestinal e é constituída por um epitélio no qual existem células exócrinas responsáveis pela secreção de muco para o lúmen do tubo digestivo e células endócrinas responsáveis pela secreção de hormonas para a circulação sanguínea; sobre esta camada epitelial assenta uma de tecido conjuntivo e rica em vasos sanguíneos denominada lâmina própria. A muscular da mucosa consiste numa camada de tecido muscular liso que separa a mucosa da submucosa, esta última consiste numa camada de tecido conjuntivo na qual localiza-se uma rede de células nervosas designada por plexo submucoso. Sobre a submucosa, assenta uma camada de músculo liso sendo que esta subdivide-se numa camada muscular lisa circular, na qual as células musculares lisas estão orientadas concêntricamente em relação ao lúmen e cuja contração possibilita o estreitamento deste; e numa camada muscular lisa longitudinal cuja contração promove o encurtamento do tubo digestivo sendo por isso, responsável pelos movimentos de propulsão do conteúdo luminal ao longo do trato gastrintestinal. Entre estas duas camadas de músculo liso localiza-se outra rede de células nervosas denominada plexo mientérico. E por fim, a serosa corresponde à camada mais externa.

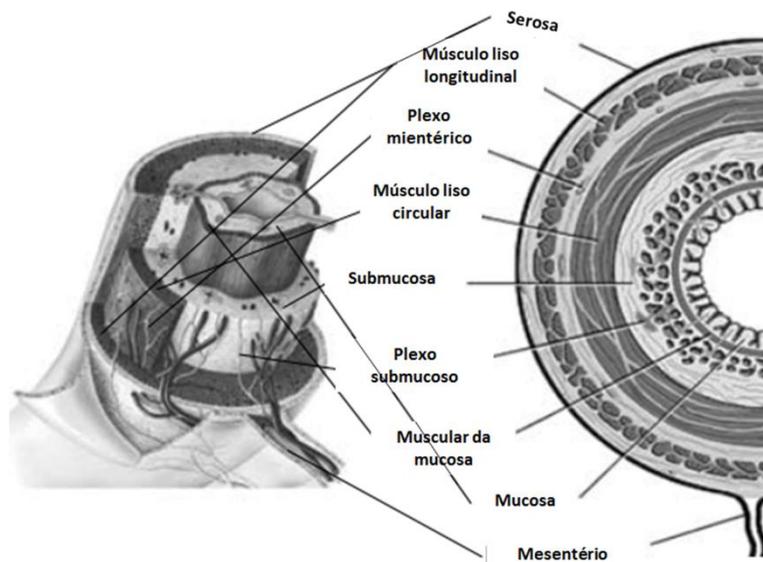


Figura 7 – Ilustração da histologia do trato gastrointestinal; Adaptado de ⁴

No caso particular do estômago, existe uma terceira camada muscular (a mais interna) com orientação oblíqua e na mucosa deste órgão encontram-se depressões tubulares cujo comprimento varia consoante a região gástrica, sendo mais longas na região pilórica; estas denominam-se fossetas gástricas e na região mais profunda localizam-se as glândulas gástricas, nas quais estão localizadas células produtoras de muco e células enteroendócrinas que secretam várias hormonas.

Anatomicamente, o estômago é dividido em cárdia, fundo, corpo e antro; a região proximal é responsável pelo armazenamento e acomodação dos alimentos ingeridos, enquanto na região distal ocorre predominantemente a digestão.

3.2 Motilidade do sistema gastrintestinal

A motilidade do trato gastrintestinal é determinada pela atividade contrátil da camada muscular lisa gastrintestinal e é regulada por mecanismos intrínsecos, tais como, as propriedades mecânicas e elétricas das células musculares lisas e por mecanismos extrínsecos de natureza neuronal e hormonal. Além disso, a motilidade gastrintestinal influencia a secreção enteroendócrina e a inter-relação entre ambas é fundamental para a regulação da homeóstase glicémica.

Há regiões do trato gastrintestinal nas quais predomina uma resposta contrátil de natureza tónica, como é o caso do fundo gástrico, e tal relaciona-se com a sua função, como exemplo, a capacidade de armazenamento dos alimentos ingeridos e a manutenção do tónus do órgão. Por outro lado, há regiões (como exemplo, o intestino delgado) onde dominam as contrações fásicas que permitem o transporte dos alimentos ingeridos.

O principal estímulo para a contração do músculo liso corresponde ao aumento da concentração intracelular de cálcio e a resposta contrátil das células musculares lisas é regulada pela interação entre as duas principais proteínas contráteis, miosina e actina.

Uma variação no potencial de membrana também estimula a contração do músculo liso, através da ativação de canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L que localizam-se na membrana citoplasmática.

Foram identificadas duas vias de sinalização que descrevem e explicam a contração do músculo liso: uma via dependente da formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina e outra via dependente da ativação da proteína cinase C (*protein kinase C*, PKC).

Relativamente à via dependente do complexo Ca^{2+} -calmodulina, o aumento de cálcio intracelular, que provém do retículo sarcoplasmático ou do meio extracelular entrando na célula muscular lisa através de canais de cálcio presentes na membrana, promove a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina. Este, por sua vez, induz a ativação da cinase das cadeias leves de miosina (*myosin light chain kinase*, MLCK) e esta fosforila as cadeias leves de miosina. Deste modo, as cadeias leves de miosina fosforiladas permitem o estabelecimento de pontes cruzadas entre as cabeças da miosina pesada e os filamentos de actina, o que por conseguinte, resulta na contração da célula muscular lisa.

No que diz respeito à via dependente da PKC, esta explica a contração da musculatura lisa induzida por um neurotransmissor (como exemplo, a acetilcolina). A interação desse neurotransmissor ou seus análogos agonistas com recetores metabotrópicos (ou seja, acoplados a proteína G) induz a ativação da PKC e esta catalisa a síntese de dois segundos mensageiros, inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG).

O IP₃ estimula a libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático enquanto o DAG estimula a fosforilação de proteínas reguladoras da contração, através da ativação da PKC.^{5,21,22}

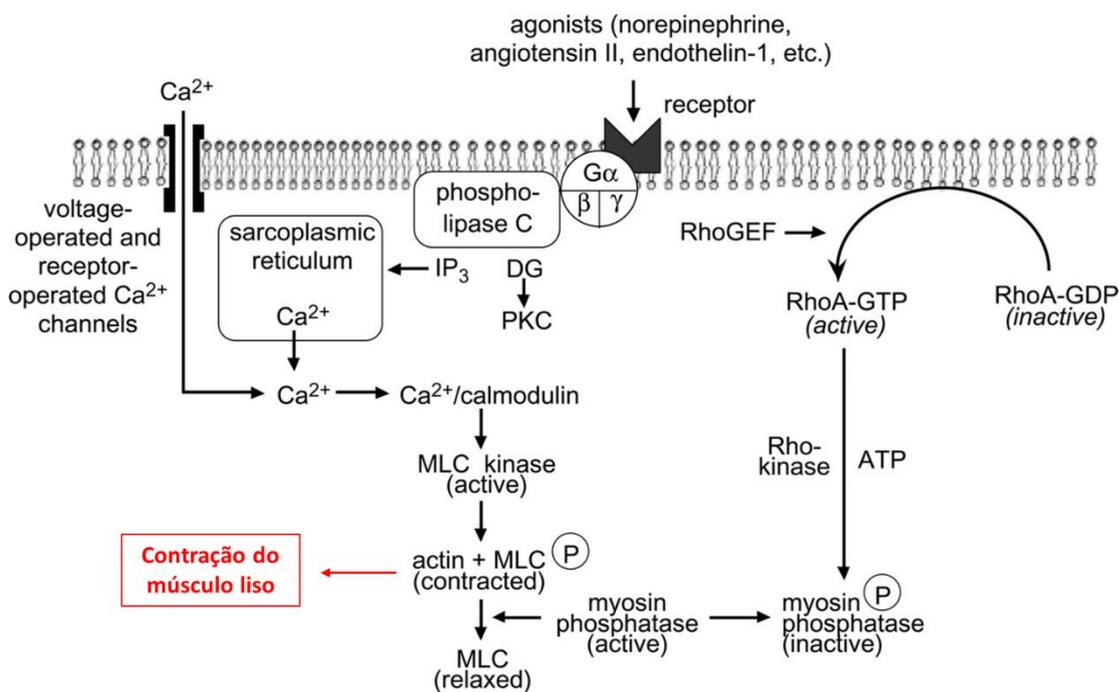


Figura 8 – Contração da célula muscular lisa; Adaptado de ⁵

Por outro lado, o relaxamento da célula muscular lisa é induzido por uma diminuição da concentração de cálcio intracelular, dissociação do complexo Ca^{2+} -calmodulina e desfosforilação das cadeias leves de miosina catalisada pela fosfatase (*myosin light chain phosphatase*, MLCP).

O decréscimo na concentração intracelular de cálcio pode resultar da captação de cálcio para o retículo sarcoplasmático que é dependente da hidrólise do ATP e da ativação de $\text{Ca}_2\text{MgATPases}$. A inibição e consequente bloqueio dos canais de cálcio dependentes da voltagem presentes na membrana citoplasmática também contribui para a diminuição da concentração intracelular do cálcio, e portanto, induz o relaxamento do músculo liso.

A ativação da MLCP é regulada pela via de sinalização RhoA/Rho-cinase, uma vez que a Rho-cinase fosforila a MLCP e deste modo, induz a inibição desta fosfatase e promove a contração da célula muscular lisa.⁵

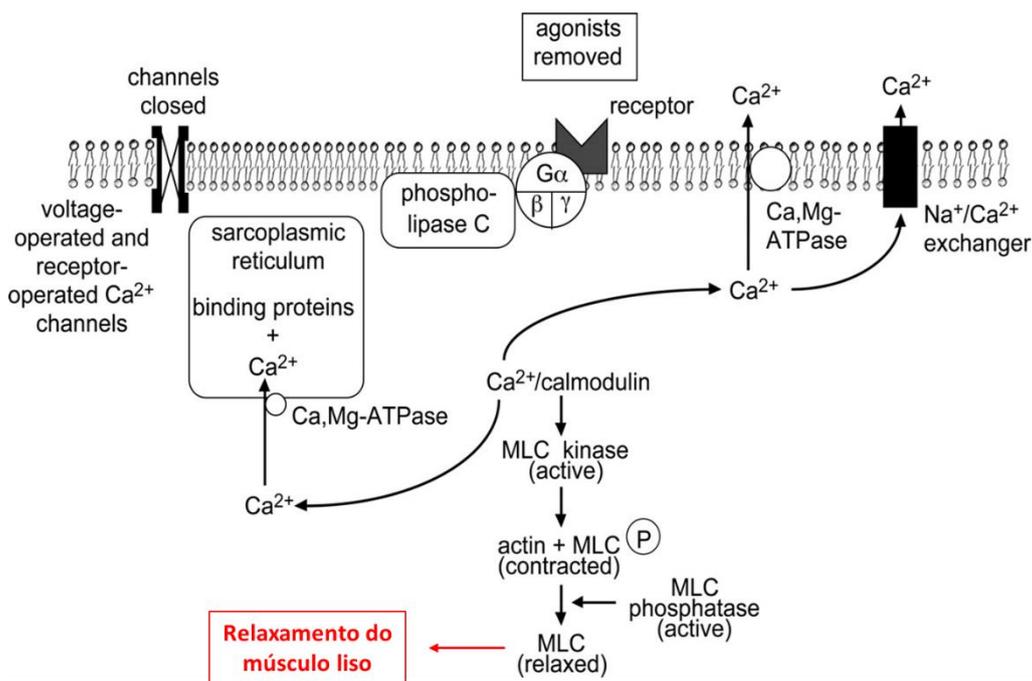


Figura 9 – Relaxamento da célula muscular lisa; Adaptado de ⁵

3.2.1 Regulação da motilidade gastrintestinal

A motilidade gastrintestinal permite o transporte dos alimentos ingeridos e o processamento dos nutrientes ao longo do trato gastrintestinal e é regulada por mecanismos de natureza neuronal e hormonal, além de depender também do tipo e do conteúdo calórico e nutricional dos alimentos ingeridos.

A atividade motora e secretora do trato gastrintestinal diferem durante o período de jejum e o período pós-prandial, sendo mais intensa neste último.^{20,23}

A inervação do trato gastrintestinal desempenha um papel fundamental na regulação neuronal da contratilidade da musculatura lisa gastrintestinal e esta depende do Sistema Nervoso Autônomo (controlo extrínseco) e do Sistema Nervoso Entérico (controlo intrínseco).

A inervação autonómica permite a “comunicação” entre o Sistema Nervoso Central e o trato gastrintestinal. Por ativação de vias nervosas parassimpáticas colinérgicas, é promovida a contração do músculo liso gastrintestinal, por outro lado, o relaxamento depende da ativação de vias nervosas simpáticas adrenérgicas.

Em relação ao Sistema Nervoso Entérico, este controla a resposta contrátil gastrintestinal, a nível local, e é composto por redes de células nervosas que correspondem aos denominados plexos mientérico (ou plexo de Auerbach) e submucoso (ou plexo de Meissner), e ainda, pelas células intersticiais de Cajal.

O plexo mientérico localiza-se entre as duas camadas de músculo liso (longitudinal e circular) e é responsável pelo controlo da atividade contrátil da musculatura lisa, enquanto o plexo submucoso localiza-se entre a submucosa e a camada muscular e controla a atividade secretora do trato gastrintestinal.

No plexo mientérico, entre as terminações de células nervosas e as células musculares lisas, está presente uma rede de células especializadas designadas por células intersticiais de Cajal, estas encontram-se eletricamente acopladas às células musculares lisas e são responsáveis por gerar e propagar “sinais” elétricos que regulam a resposta contrátil física do músculo liso; além disso, medeiam a neurotransmissão entre os neurónios motores entéricos e as células musculares lisas.²³

Uma disfunção do Sistema Nervoso Entérico acarreta consequências patológicas para o trato gastrointestinal, nomeadamente, disfunção da motilidade gastrointestinal. E um exemplo de patologia em que tal acontece corresponde à *Diabetes Mellitus* tipo II.

O nervo vago regula a motilidade do trato gastrointestinal através de vias nervosas colinérgicas excitatórias e vias nervosas não-adrenérgicas e não-colinérgicas inibitórias (possivelmente nitrérgicas, e portanto, mediadas pela libertação de óxido nítrico).²⁴ E a ativação de vias nervosas aferentes do nervo vago pode ser induzida por estímulos mecânicos, como é o caso da distensão (aumento do volume) do estômago.²⁵

Além da regulação da motilidade do trato gastrointestinal por mecanismos neuronais (SNA e SNE), esta também é regulada por mecanismos hormonais que incluem a secreção de péptidos, neuropeptídeos e neurotransmissores, induzida por estímulos mecânicos e/ou químicos, sendo que algumas destas substâncias podem atuar diretamente sobre as células musculares lisas ou indiretamente por via de fibras nervosas aferentes e sobre as regiões do sistema nervoso central que participam no controlo da motilidade gastrointestinal. Além disso, a regulação química pode ser de natureza excitatória (como exemplo, a acetilcolina) ou inibitória (como exemplos, a noradrenalina, o *Vasoactive Intestinal Polypeptide* (VIP) e o óxido nítrico).

A acetilcolina é o principal neurotransmissor do Sistema Nervoso Parassimpático que atua sobre o trato gastrointestinal e o principal mediador da contração da musculatura lisa gastrointestinal, através da ativação de recetores muscarínicos do tipo M3, sendo que as vias nervosas entéricas são maioritariamente colinérgicas.

A serotonina (ou 5-hidroxitriptamina, 5-HT) pode atuar como neurotransmissor inibitório ou excitatório (pois há recetores serotoninérgicos presentes em ambos os tipos de neurónios referidos) e é sintetizado e secretado por neurónios entéricos e células enterocromafins localizadas no epitélio da mucosa do trato gastrointestinal. Em estômago de rato, a serotonina inibe o esvaziamento gástrico, sendo este efeito mediado por recetores serotoninérgicos do tipo 5-HT₃.

O VIP é um mediador de relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal, de natureza não adrenérgica e não colinérgica, e portanto, inibe a motilidade do trato gastrointestinal.

O óxido nítrico (*nitric oxide*, NO) também induz relaxamento não adrenérgico e não colinérgico da musculatura lisa. Em estômago de rato, a estimulação do nervo vago aumenta

a secreção de NO. E o relaxamento da musculatura lisa induzido pelo NO é mediado pela ativação da guanilato ciclase e pelo aumento do GMPc.

A colecistoquinina (*Cholecystokinin*, CCK) é secretada pelas células enteroendócrinas situadas no intestino proximal e está envolvida num mecanismo de *feedback* negativo que consiste na inibição do esvaziamento gástrico após a ingestão de alimentos, e também inibe a motilidade do cólon.

Tal como o GLP-I, o peptídeo YY (*Peptide YY*, PYY) é também secretado por células enteroendócrinas da região distal do intestino e exerce um efeito inibitório sobre o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal e a motilidade do cólon.

Por fim, tanto o GLP-I e o PYY inibem a motilidade da região proximal do trato gastrointestinal aquando da chegada de nutrientes à região distal do intestino, em particular os hidratos de carbono (mecanismo de *feedback* negativo).

A acrescentar ao efeito destes neurotransmissores e neuropeptídeos, algumas hormonas também regulam a motilidade do trato gastrointestinal, nomeadamente a motilina e a grelina que estimulam a motilidade gástrica.^{20,26}

3.2.2 Alterações da motilidade gastrointestinal na Diabetes Mellitus tipo II

A Diabetes Mellitus tipo II não só é caracterizada por alterações metabólicas, como também, por uma disfunção na motilidade do trato gastrointestinal, sendo que esta é caracterizada por diminuição da motilidade esofágica, diminuição do relaxamento do fundo gástrico, inibição do esvaziamento gástrico, diminuição ou aumento (disfunção) do trânsito intestinal, aumento do trânsito no cólon e alterações na flora microbiana.²⁷

A disfunção da motilidade do trato digestivo reflete-se na sintomatologia gastrointestinal que afeta uma parte significativa dos indivíduos diabéticos do tipo II. Os sintomas mais frequentes incluem disfagia, refluxo gastroesofágico, desconforto/dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, síndrome do cólon irritável, obstipação e incontinência fecal.²⁸⁻³⁰

Além das consequências fisiopatológicas da Diabetes Mellitus tipo II, também os efeitos adversos da terapêutica medicamentosa contribuem para a disfunção da motilidade gastrointestinal. Como exemplo, a diarreia não diabética que corresponde a um dos efeitos adversos mais frequentes da Metformina. No caso da denominada diarreia diabética, esta resulta da própria patologia e da disfunção autonómica.

Os principais fatores de risco da sintomatologia gastrointestinal incluem a neuropatia autonómica diabética, a hiperglicemia, o stress oxidativo, alterações na secreção das principais hormonas gastrointestinais, alterações estruturais e funcionais das células musculares lisas do trato gastrointestinal, dos neurónios entéricos e das células intersticiais de Cajal.

Existe uma inter-relação entre motilidade gastrointestinal e controlo glicémico, visto que os níveis plasmáticos pós-prandiais de glicose influenciam a função motora gastrointestinal e vice-versa.²⁹ Por exemplo, em indivíduos diabéticos do tipo II, um aumento na glicemia pós-prandial está associada a um decréscimo “proporcional” da taxa de esvaziamento do estômago.²⁰ E há estudos^{30,31} que reportam que o esvaziamento gástrico é significativamente mais lento e que a contratilidade do antro gástrico diminui nos indivíduos diabéticos do tipo II.

Além disso, a hiperglicemia está associada a uma diminuição do tónus gástrico, inibição da contratilidade do antro gástrico e estimulação da contratilidade do piloro, o que corresponde a um padrão de atividade motora associado a um retardamento do esvaziamento do estômago.²⁹

A inibição do esvaziamento gástrico relaciona-se com aumento da retenção do quimo no estômago e disfunção da motilidade da parede gástrica. Além disso, o esvaziamento gástrico também depende da função do nervo vago que pode estar comprometida na *Diabetes Mellitus*. De facto a hiperglicemia crónica promove igualmente o desenvolvimento e a progressão da neuropatia, pois ocorrem alterações metabólicas em neurónios, e tal contribui para a disfunção da motilidade do trato gastrintestinal, uma vez que parte das funções deste sistema de órgãos é mediada por mecanismos neuronais dependentes do sistema nervoso autonómico e do sistema nervoso entérico.^{30,32}

Mais ainda o *stress* oxidativo, prevalente num quadro de *Diabetes Mellitus* tipo II, promove lesões celulares e parece afetar, de um modo mais significativo, as subpopulações neuronais inibitórias. Em alguns modelos animais de diabetes, observou-se diminuição de neurónios entéricos, em particular dos neurónios nitrérgicos inibitórios (por conseguinte, decresce a expressão da sintase do óxido nítrico neuronal - nNOS - e consequente síntese de óxido nítrico) e de células intersticiais de Cajal.^{27,33,34} Sendo que esta última também se observa em indivíduos diabéticos do tipo II e/ou em indivíduos com distúrbios gastrointestinais graves.

As células intersticiais de Cajal medeiam a neurotransmissão entre neurónios autonómicos e entéricos, e também, entre neurónios entéricos e as células musculares. A redução do número destas células na musculatura lisa do fundo gástrico está associada à alteração do relaxamento desta região do estômago, enquanto a redução do número de células intersticiais de Cajal no plexo mientérico está associada à diminuição dos movimentos peristálticos. A redução do número destas células especializadas verifica-se em várias regiões do trato digestivo (estômago, intestino e cólon) e esta diminuição correlaciona-se com o decréscimo do número de neurónios nitrérgicos aferentes do nervo vago, e vice-versa.²⁷

As alterações neuronais consequentes da *Diabetes Mellitus* também podem ocorrer no Sistema Nervoso Central e não apenas no Sistema Nervoso Periférico.

Por vezes, os indivíduos diabéticos do tipo II que sofrem de distúrbios motores gastrointestinais graves são assintomáticos devido a uma disfunção nos nervos sensoriais.

Ainda sobre a disfunção motora e sensorial gastrintestinal, esta pode também ser devida a uma remodelação morfológica e biomecânica da parede do trato digestivo. As principais alterações observadas na *Diabetes Mellitus* tipo II incluem aumento da espessura da parede do trato gastrintestinal e remodelação das células intersticiais de Cajal no estômago.^{4,29,30}

A disfunção das células musculares lisas (miopatia) da parede do trato gastrintestinal também contribui para a disfunção da motilidade do sistema digestivo e caracteriza-se por degeneração das células musculares, fibrose e atrofia do músculo liso gastrintestinal.³²

3.2.3 O efeito do GLP-I na motilidade gastrintestinal

O GLP-I participa na regulação de algumas funções motoras do sistema gastrintestinal das quais se destaca a inibição do esvaziamento gástrico e a inibição da motilidade intestinal, o que contribui para a acomodação pós-prandial do estômago, aumenta o tónus pilórico e acelera o trânsito no cólon, o que pode explicar uma das reações adversas mais frequentes dos agonistas do GLP-IR, a diarreia.³⁵

Além dos efeitos referidos acima, o GLP-I promove aumento do volume gástrico, tanto em jejum como no período pós-prandial. Sendo que o efeito do GLP-I sobre a acomodação gástrica pós-prandial é mediado pela libertação de óxido nítrico.²⁴

Os efeitos do GLP-I sobre a motilidade gastrintestinal são mediados a nível central e por vias nervosas aferentes (do nervo vago, por exemplo), e também, por mecanismos neuronais periféricos, em particular através da ativação de recetores do GLP-I localizados em neurónios do plexo mientérico.^{36,37}

Vários estudos^{20,35,37,38} sugerem que os efeitos inibitórios do GLP-I sobre a motilidade do trato gastrintestinal são mediados por via da libertação de óxido nítrico, que por sua vez, é mediada pela ativação dos respetivos recetores (GLP-IR) pré-sinápticos localizados nos neurónios entéricos.

No caso particular da inibição da motilidade e do tónus gástrico, o GLP-I pode atuar a nível central e através da ativação de vias não adrenérgicas e não colinérgicas, e também, através da libertação de óxido nítrico.³⁹

Os efeitos do GLP-I na motilidade gastrintestinal influenciam os seus efeitos sobre a homeóstase glicémica. Por exemplo, a inibição do esvaziamento gástrico desacelera a entrada de nutrientes no intestino e, por conseguinte, a absorção destes. Além do efeito desta incretina sobre a função motora gastrintestinal, o GLP-I também diminui a secreção ácida gástrica.^{8,20,24}

O GLP-I consegue difundir pela barreira hemato-encefálica e ativar os seus recetores específicos localizados no sistema nervoso central, e deste modo, alguns dos efeitos deste péptido sobre a motilidade gastrintestinal podem também ser mediados a nível central (e não apenas a nível periférico), como exemplos, a inibição do esvaziamento gástrico e a aceleração do trânsito do cólon.¹⁵

Por outro lado, o GLP-I pode atuar indiretamente sobre o SNC por via da ativação de recetores presentes nas vias nervosas aferentes vagais. E portanto, o nervo vago e suas vias nervosas aferentes desempenham um papel preponderante, pois estabelecem um “elo de ligação” entre o GLP-I que se encontra em circulação e o SNC e deste modo, medeiam alguns dos efeitos do GLP-I sobre a motilidade gástrica, nomeadamente o esvaziamento do estômago.^{39,40}

Concluindo, além do efeito “incretina”, o GLP-I inibe o esvaziamento do estômago e a motilidade intestinal; efeito este já demonstrado no ser humano, em rato e em ratinho. Vários estudos sugerem que os efeitos do GLP-I sobre a motilidade do trato gastrintestinal são mediados por vias nervosas aferentes vagais ou a nível central (SNC) e que existem locais de ação periféricos do GLP-I no SNE, nomeadamente nos neurónios do plexo mientérico.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto consistiu no estudo dos efeitos dos GLP-IRA sobre a motilidade gástrica e de que forma esta está alterada na presença de Diabetes *Mellitus* tipo II.

Para tal foram definidos os seguintes objetivos:

1. Através de estudos funcionais, avaliar o efeito dos GLP-IRA, GLP-I e Liraglutido, na resposta contrátil de fundo de estômago isolado de rato Wistar (rato controlo) e de rato GK (modelo animal diabético do tipo II não obeso) com a realização de curvas cumulativas concentração-resposta dos GLP-IRA;
2. Caracterizar farmacologicamente o efeito dos GLP-IRA na resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar, recorrendo ao antagonista seletivo do GLP-IR, Exendin-3 e a um inibidor não-seletivo da sintase do óxido nítrico, N^G-nitro-L-arginina (L-NNA);
3. Avaliar o efeito do tratamento com Liraglutido no relaxamento induzido por um dador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio e pela noradrenalina, em tiras de fundo de estômago isoladas a partir de ratos Wistar e ratos GK.
Durante a realização dos estudos *in vivo* com Liraglutido, avaliar o perfil bioquímico, a ingestão calórica, o peso corporal, e ainda a sensibilidade periférica à insulina dos ratos Wistar e GK tratados com Liraglutido, comparando com os correspondentes grupos controlo não tratados;
4. Determinar a densidade do recetor do GLP-I (GLP-IR), da nNOS (isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico) e da p-nNOS (forma fosforilada da nNOS) por Western Blotting e em fundo de estômago isolado de rato dos quatro grupos de animais;
5. Determinar a localização celular do GLP-IR em fundo de estômago isolado de rato dos quatro grupos de animais por Imunohistoquímica.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Modelos animais

Foram usados ratos Wistar como grupo controlo e ratos *Goto-Kakizaki*, um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo II⁴¹, ambos provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no qual os animais foram mantidos em condições-padrão de ventilação, temperatura (22-24°C), humidade (50-60%), num ciclo de luz/obscuridade de doze horas e com acesso livre a água e ração (dieta padrão A03, SAFE, Barcelona).

O rato *Goto-Kakizaki* corresponde a um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo II não obeso que resulta do cruzamento seletivo entre ratos Wistar com os níveis de glicemia mais elevados e apresenta hiperglicemia moderada, resistência à insulina e deficiente secreção da mesma, desenvolvendo complicações associadas à diabetes tipo II semelhantes às que ocorrem no ser humano.⁴²

2. Estudos funcionais

2.1 Isolamento e preparação do órgão

Às dezasseis semanas de idade, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo sido previamente anestesiados intraperitonealmente com cetamina (75 mg/kg de peso corporal; *Pfizer Inc.*, Nova Iorque, EUA) e clorpromazina (3 mg/kg de peso corporal; Laboratórios Vitória, Amadora, Portugal). O estômago foi isolado e colocado, de imediato, numa solução gelada de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO₄·7H₂O 0,57; CaCl₂·2H₂O 1,90; KH₂PO₄ 0,90; NaHCO₃ 25; glicose 11,1) a pH 7,4 e arejada com carbogénio (95% O₂ / 5% CO₂).

Posteriormente o fundo foi dissecado e lavado com a mesma solução fisiológica, resultando em quatro tiras longitudinais ao longo da pequena e grande curvaturas, de 1,5 cm de comprimento e 4 mm de largura, segundo a metodologia descrita por Riazi-Farзад *et al.* (1996)⁴³ com base na original de Vane (1957).⁴⁴

Finalmente, procedeu-se à suspensão das tiras de fundo de estômago entre duas ansas de fio de platina, sob uma tensão ótima basal de 19,6 mN, em banhos de órgãos de 10 mL, preenchidos com solução de Krebs-Henseleit, aquecida a 37°C e arejada com carbogénio. E por fim, procedeu-se a um período de incubação e estabilização de duas horas, com lavagens a cada trinta minutos.

As variações de tensão isométrica das tiras de fundo gástrico foram registadas com recurso a transdutores de força (*LETICA Scientific Instruments*, Barcelona, Espanha) ligados a um polígrafo de quatro canais (Polygraph 4006, *LETICA Scientific Instruments*, Barcelona, Espanha).

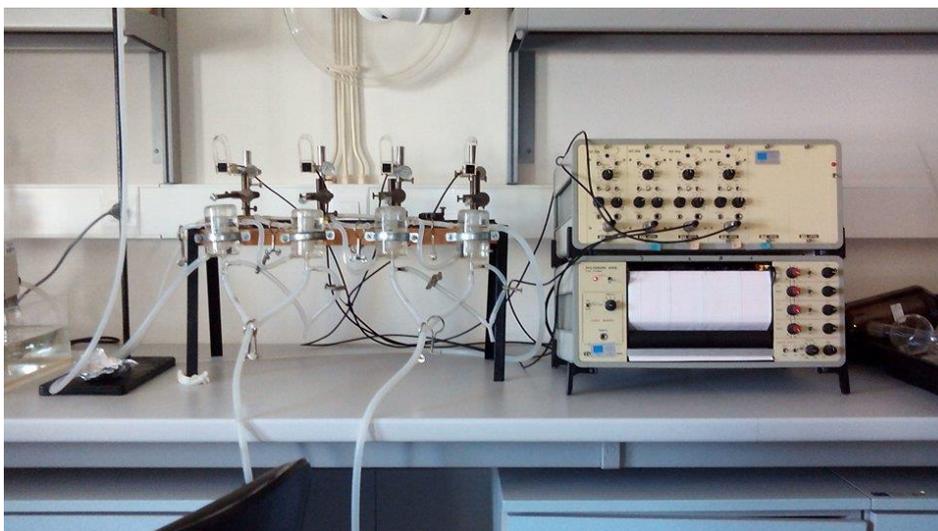


Figura 10 – Sistema de banho de órgãos e polígrafo de quatro canais.

2.2 Protocolo experimental de caracterização da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato ao GLP-I

Após o período de equilíbrio, as tiras de fundo de estômago foram pré-contraídas com Carbacol (CCh) $5 \mu\text{M}^{45}$ e a partir do respetivo platô de contração, procedeu-se à realização de curvas cumulativas concentração-resposta (CR) de GLP-I ($0,05 \text{ nM} - 111,1 \text{ nM}$).

Para caracterização da resposta contrátil ao agonista endógeno, realizaram-se segundas curvas CR ao GLP-I em tiras de estômago de ratos Wistar, na presença e na ausência de 300 nM de Exendin-3 (antagonista seletivo do recetor do GLP-I) adicionado ao banho de órgãos trinta minutos antes da segunda curva CR.

Nas experiências em que foram efetuadas duas curvas cumulativas CR, obedeceu-se a um intervalo de recuperação de pelo menos uma hora entre cada curva, em que as preparações foram lavadas com solução fisiológica de Krebs-Henseleit até atingirem novamente o tónus basal inicial e foram utilizadas tiras controlo, às quais foi adicionado o solvente apropriado do antagonista.

As respostas contráteis ao GLP-I foram expressas em percentagem da resposta contrátil de cada tira ao CCh. Cada tira funcionou como controlo de si própria, já que as respostas ao GLP-I da segunda curva foram expressas em percentagem da contração máxima obtida na primeira curva CR da respetiva tira. Os resultados finais de cada experiência com este protocolo foram expressos em percentagem da resposta obtida nas tiras controlo.

2.3 Protocolo experimental de caracterização da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato ao Liraglutido

Foi igualmente estudada a resposta contrátil ao agonista do GLP-1R, Liraglutido, em ratos Wistar e em ratos GK, sendo que para a respetiva caracterização farmacológica, realizaram-se curvas cumulativas CR ao agonista exógeno em tiras de estômago de ratos Wistar pré-contraídas com 5 μ M de CCh⁴⁵, na presença e na ausência de 250 μ M de N^G-nitro-L-arginina (L-NNA, inibidor não seletivo da NOS), adicionada ao banho de órgãos trinta minutos antes da curva CR. Foram igualmente utilizadas tiras controlo, às quais foi adicionado o solvente apropriado do inibidor. Neste conjunto de experiências, as respostas contráteis ao Liraglutido foram expressas em percentagem da resposta contrátil de cada tira ao CCh.

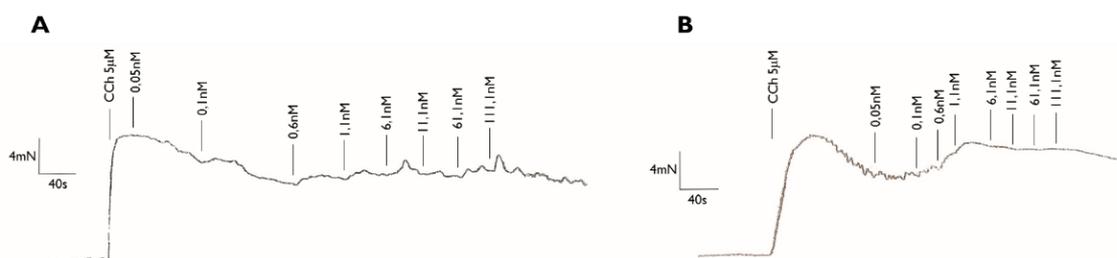


Figura 11 – Registo representativo de curvas cumulativas CR ao GLP-I (A) e ao Liraglutido (B) em fundo gástrico isolado de rato após pré-contracção com CCh 5 μ M.

2.4 Tratamento dos resultados dos estudos de caracterização da resposta contrátil de tiras de fundo gástrico aos GLP-IRA

As respostas contráteis de cada GLP-IRA foram ainda traduzidas em termos de mN de tensão para traduzir a eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) e em termos de logaritmo negativo da concentração molar de GLP-IRA capaz de induzir metade da resposta máxima (pEC_{50}) para traduzir a potência. Os valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa CR em escala semilogarítmica (% da contração máxima versus logaritmo da concentração em mol/L), usando métodos computacionais (*CurveExpert*, versão 1.4 para Windows).

No que se refere ao tratamento estatístico dos dados, foram avaliadas as diferenças entre os valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} dos GLP-IRA de animais controlo (rato Wistar) e rato GK, bem como as diferenças entre as respostas contráteis induzidas por cada dose da curva CR de GLP-IRA executada na ausência e na presença de exendin-3 ou L-NNA.

3. Estudos *in vivo* com Liraglutido em rato Wistar e em rato Goto-Kakizaki

3.1 Descrição do tratamento com Liraglutido

Dois conjuntos de oito ratos Wistar e oito ratos GK, com catorze semanas de idade, foram divididos em dois grupos: quatro animais foram administrados, duas vezes por dia⁴⁶ com Liraglutido (200 µg/kg s.c.) durante catorze dias⁴⁷ e os outros quatro animais foram administrados com soro fisiológico NaCl 0,9% (grupo controlo) no mesmo período de tempo.

Durante o período de tratamento, foram realizadas medições de peso corporal diárias para ajuste da dose a administrar no dia seguinte e os animais tiveram acesso livre a água e ração (dieta padrão A03, SAFE, Barcelona) e foram mantidos em condições padrão de temperatura e humidade e num ciclo de luz/obscuridade de doze horas.

3.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos de rato Wistar e de rato GK tratados com Liraglutido

Tanto no primeiro como no último dia de tratamento, foram realizadas medições de glicemia em jejum (de seis horas), usando um glucómetro (Elite, Bayer, Portugal), de colesterol total e triglicédeos, usando um medidor portátil (Accutrend GCT, Roche, Portugal) e procedeu-se à colheita de sangue da veia da cauda para um tubo Vacuette K3E K3EDTA; de seguida, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante quinze minutos a 4°C, e no fim, o plasma foi aliquoteado e guardado a -80°C. Foi ainda realizada a prova de tolerância à insulina: os ratos foram injetados com insulina (0,25 U/mL) por via intraperitoneal e a glicemia foi medida aos 15, 30, 60 e 120 minutos.

Tanto no primeiro como no último dia de tratamento, apenas se procedeu a uma administração de Liraglutido/soro fisiológico.

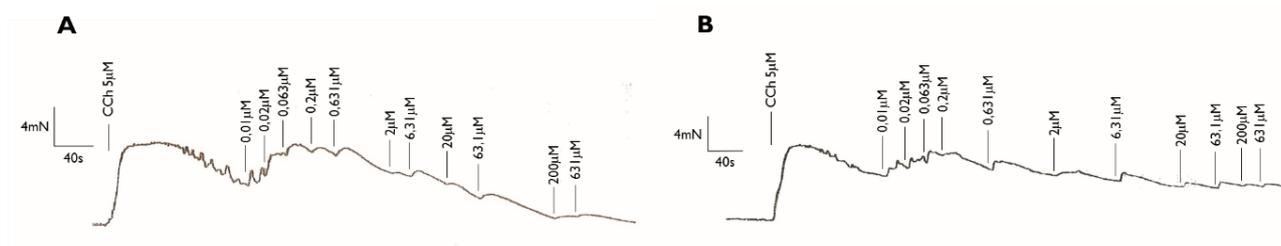


Figura 13 – Registo representativo de curvas CR ao SNP em fundo gástrico isolado de rato Wistar não tratado (A) e rato Wistar tratado com Liraglutido (B) após pré-contracção com CCh 5 μ M.

Nestas experiências em que foram efetuadas duas curvas cumulativas CR, obedeceu-se a um intervalo de recuperação de pelo menos uma hora entre cada curva em que as preparações foram lavadas com solução fisiológica de Krebs-Henseleit até atingirem novamente o tónus basal inicial.

Finalmente, amostras de fundo gástrico não usadas nos estudos funcionais e de pâncreas foram fixados numa solução de formol tamponado a pH 6,9 e processados de forma convencional, com posterior inclusão em parafina; ou foram congeladas a -80°C para posterior lise e homogeneização.

3.4.1 Tratamento dos resultados do estudo da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar e rato GK tratados com Liraglutido

Neste conjunto de experiências, as respostas contrácteis ao SNP e à NA, e nomeadamente a respetiva resposta máxima ($E_{\text{máx}}$), foram expressas em percentagem da inibição da resposta contrátil de cada tira ao CCh.

A potência foi traduzida através do pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar de SNP/NA capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa CR em escala semilogarítmica (% do relaxamento máximo versus logaritmo da concentração em mol/L), usando métodos computacionais (*CurveExpert*, versão 1.4 para Windows). Os resultados foram ainda analisados em termos de mN de tensão, de forma a traduzir por valores absolutos, a atividade intrínseca ($E_{\text{máx}}$) do CCh em induzir contração.

No que se refere ao tratamento estatístico dos resultados, foram avaliadas as diferenças entre os valores de $E_{\text{máx}}$ e pEC_{50} do SNP e da NA de animais controlo e diabéticos do tipo II tratados e não tratados com Liraglutido.

3.5 Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais

Para a determinação das diferenças estatísticas entre dois grupos de valores utilizou-se o teste de *t* de Student para dados não emparelhados e para comparação da resposta contrátil de fundo de estômago isolado de ratos controlo e diabéticos do tipo II, tratados ou não com Liraglutido, o teste ANOVA (Analysis of variance) seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas.

Foi também aplicado ANOVA a dois fatores (com ou sem tratamento com Liraglutido e rato controlo ou diabético) quando verificados os respetivos pressupostos de aplicação.

Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados presentes neste trabalho estão expressos como média \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de tiras (s) por animal (*n*) indicado. Todos os dados foram processados e analisados por métodos computacionais, nomeadamente *GraphPad Prism* PC Software e *IBM SPSS Statistics*.

3.6 Reagentes e Soluções usados nos estudos funcionais

Os reagentes usados na preparação da solução fisiológica de Krebs-Henseleit foram adquiridos na Panreac (Barcelona, Espanha) e foram produtos *pro analysi*. Para os estudos funcionais foram usados os seguintes fármacos: Carbacol (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), Glucagon-like peptide I (GLP-I; Tocris, Bristol, GB), Liraglutido (Victoza[®] – Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca), Exendin-3 (Tocris, Bristol, GB), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA; Tocris, Bristol, GB), noradrenalina e nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA),

4. Estudos moleculares

4.1 Protocolo experimental de determinação da densidade de GLP-1R, nNOS e p-nNOS por Western Blotting

Preparação de lisados: foram preparados homogeneizados de 100 mg de fundo de estômago em 500 µL de tampão de lise (Tabela 4) e tanto este como as amostras tecidulares foram mantidas em gelo no decorrer do protocolo. Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm durante vinte minutos e a 4°C. Depois, o sobrenadante foi recolhido e procedeu-se a uma segunda centrifugação nas mesmas condições referidas anteriormente. Por fim, o sobrenadante foi aliquoteado e as amostras foram congeladas a -80°C.

Preparação das amostras para Western Blotting: foi adicionado o tampão de desnaturação (*Sample Buffer*, 2x) às alíquotas dos homogeneizados, numa proporção de 1:1 e depois, as respectivas amostras foram diluídas novamente com o mesmo tampão a 1x. Posteriormente, as amostras foram sonicadas durante dez segundos e a uma frequência de 70 Hz, e também, foram aquecidas durante três minutos a cerca de 90°C.

Eletroforese SDS-PAGE: foram preparados géis de poliacrilamida a 8%, de 1 mm de espessura e com 10 poços. Na preparação dos géis *Resolving* e *Stacking* foi seguido o protocolo apresentado na tabela 4. Após a polimerização dos géis, procedeu-se à montagem do sistema de eletroforese e subsequente adição das amostras. Encheu-se o sistema com tampão de corrida (Tabela 4) e iniciou-se a eletroforese. Tendo em conta que a velocidade de migração das proteínas depende do seu peso molecular e de modo a controlar a migração e separação proteica, foi adicionado o padrão *GRS Protein Marker MultiColour* a um dos poços.

Transferência gel – membrana PVDF: após a conclusão da eletroforese, procedeu-se à transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (*polyvinylidene fluoride*, PVDF) para *Western Blotting*. Em primeiro lugar, procedeu-se à ativação da(s) membrana(s) e preparação do tampão de transferência (Tabela 4) usado para encher o sistema *Transfer Blot*. Há parâmetros que têm de ser controlados no decorrer da transferência do gel para a membrana de PVDF, nomeadamente: amperagem

constante nos 750 mA, a voltagem não deve ultrapassar os 120 V, temperatura e duração da transferência (1h45-2h).

Incubação com solução bloqueio: após a transferência, as membranas foram incubadas com uma solução de TBS-T 0,1% (Tabela 4) e BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 5% durante duas horas.

Incubação com o anticorpo primário: após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário: Calnexina (que corresponde ao padrão interno usado), GLP-1R (1:250), nNOS (1:500) e p-nNOS (1:500); durante a noite e a 4°C.

No fim, procedeu-se à lavagem das membranas com TBS-T 0,4% (Tabela 4) durante uma hora e meia.

Incubação com o anticorpo secundário: após a lavagem, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário (anti-cabra e anti-coelho (1:5000, BioRad, EUA) durante duas horas e à temperatura ambiente.

Mais uma vez, no final procedeu-se à lavagem das membranas com TBS-T 0,4% (Tabela 4) durante uma hora e meia.

Revelação das membranas por Quimioluminescência: em primeiro lugar, o substrato ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) foi preparado adicionando luminol e peróxido de hidrogénio numa proporção 1:1 e usando o respetivo kit (*Clarity Western ECL Substrate*, BioRad, EUA). De seguida, o substrato foi adicionado à membrana e a revelação das membranas foi realizada no sistema de deteção de luminescência *VersaDoc* (BioRad, EUA), com o respetivo programa associado *Quantity One*. A análise e a quantificação das bandas foi realizada com recurso ao *software Image Quant*[®] (Molecular Dynamics, EUA).

4.1.1 Reagentes e Soluções usados na técnica Western Blotting

Os reagentes usados foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St Louis, EUA) e em relação aos anticorpos primários usados: Calnexina (Sicgen, Portugal), GLP-1R (Bioss, EUA), nNOS (Abcam, EUA) e p-nNOS (Abcam, EUA).

Tampão de lise (para um V_{final} de 5 mL):

2,5 mL tampão de homogeneização 2x;
50 μL Triton-X;
30 μL Inibidor de proteases;
250 μL PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil);
1,72 mL água miliQ.

Resolving Gel (8%) *

12 mL *Resolving Buffer*;
4,8 mL Acrilamida 40%;
7,2 mL água miliQ;
180 μL APS (persulfato de amônio) 10%;
12 μL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenediamina).

(*para 6 géis de 0,75 mm de espessura)

Stacking Gel*

3,75 mL *Stacking Buffer*;
0,852 mL Acrilamida 40%;
2,978 mL água miliQ;
45 μL APS 10%;
8,26 μL TEMED.

(*para 6 géis de 0,75 mm de espessura)

Tampão de corrida (V_{final} de 1L):

200 mL *Running Buffer* 5x;
800 mL água miliQ.

Tampão de transferência (V_{final} de 1L):

100 mL CAPS (ácido ciclohexilamina propanosulfónico) 10x;
100 mL metanol;
800 mL água miliQ.

Tampão de lavagem (V_{final} de 1L):

100 mL TBS;
900 mL água miliQ;
1 ou 4 mL Tween (quando a 0,1% ou 0,4%, respetivamente)

Tabela 4 – protocolos para preparação das soluções usadas na Eletroforese e em Western Blotting.

4.1.2 Análise estatística dos resultados obtidos na técnica Western Blotting

Para a determinação das diferenças estatísticas entre os quatro grupos de estudo para cada variável avaliada utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis ANOVA bidirecional (teste não paramétrico para dados independentes), enquanto as diferenças entre duas variáveis dentro de cada grupo foram calculadas utilizando o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico para dados emparelhados). Os valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean, S.E.M.*). E todos os dados foram processados e analisados por métodos computacionais, nomeadamente *GraphPad Prism PC Software* e *IBM SPSS Statistics*.

4.2 Protocolo experimental de determinação da localização celular do GLP-IR por Imunohistoquímica

Amostras de fundo de estômago e de pâncreas foram fixadas numa solução de formol tamponado a pH 6,9 e processadas de forma convencional, com posterior inclusão em parafina. Com estas amostras, foram realizados cortes histológicos de 3 μm de espessura, que foram sujeitos inicialmente a coloração com hematoxilina (HE).

Em primeiro lugar, os cortes foram desparafinados com uma solução de desparafinação (solução *Bond Dewax*, Leica Biosystems), e de seguida foram rehidratados com lavagens sucessivas com álcool a 100% e finalmente lavadas com uma solução tampão (solução *Bond Wash*, Leica Biosystems).

Para a recuperação dos epítomos, os cortes foram incubados em tampão citrato 10% (v/v), pH 6 (solução *Bond Epitope Retrieval*, Leica Biosystems), durante vinte minutos.

Depois de lavados, os cortes foram incubados durante cinco minutos com uma solução de peróxido de hidrogénio, 3-4% (v/v) (solução *Peroxidase Block BOND*, Leica Biosystems) para inibir a atividade da peroxidase endógena.

Após nova lavagem com solução tampão, os cortes foram incubados com o anticorpo policlonal primário de coelho anti-GLP-IR de rato (*Bioss*, EUA), diluído (1:200) na solução de diluição *Bond Primary Antibody Diluent* (Leica Biosystems) durante quinze minutos.

Os cortes foram novamente lavados tendo-se procedido posteriormente à incubação com um anticorpo de união pós-primário (*Post Primary BOND*, Leica Biosystems) durante oito minutos.

Seguiu-se nova lavagem e os cortes foram incubados com um reagente polimérico que inclui conjugados de anticorpos terciários de peroxidase polimérica de rábano picante (HRP) (*Polymer BOND*, Leica Biosystems) durante oito minutos.

Depois, os cortes foram lavados com solução tampão de lavagem uma última vez, e de seguida, foram lavados com água destilada.

Os cortes foram finalmente revelados com o cromogénio diaminobenzidina (*Mixed DAB Refine BOND*, Leica Biosystems) durante dez minutos, e após nova lavagem com água destilada, foram contrastados com hematoxilina (*Hematoxylin BOND*, Leica Biosystems) durante cinco minutos, após o que se procedeu à diafanização, desidratação e montagem em meio sintético DPX e posteriormente, os cortes foram analisados no microscópio ótico Nikon *Eclipse 80i*.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

I. Caracterização da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato aos agonistas do recetor do glucagon-like peptide I (GLP-IRA)

Os GLP-IRA caracterizam-se por efeitos no trato gastrointestinal, nomeadamente a inibição do esvaziamento gástrico, a diminuição da secreção ácida gástrica e a inibição da motilidade intestinal, sendo que estes efeitos contribuem para o aumento da saciedade e consequente perda de peso.

Um dos objetivos definidos para este projeto consistiu no estudo dos efeitos dos GLP-IRA sobre a motilidade gástrica, mais propriamente sobre a entrada de alimentos no estômago. Sendo assim, foi avaliada a resposta contrátil isométrica induzida pela adição cumulativa de concentrações crescentes de GLP-IRA, nomeadamente o agonista endógeno (GLP-I) e o Liraglutido (GLP-IRA de longa duração de ação) em fundo gástrico isolado de rato Wistar (grupo controlo) e de rato GK (modelo animal diabético tipo II não obeso).

Ambos os GLP-IRA estudados induziram contração dependente da concentração do fundo de estômago isolado de ratos Wistar e GK pré-contraído com carbacol (CCh) 5 μ M no intervalo de concentrações testadas (0,05 nM – 111,1 nM) (Figura IIA e IIB).

E além disso, na presença de atropina (antagonista não seletivo dos recetores muscarínicos) e sem pré-contração do carbacol foi observado que o GLP-I induzia contrações fásicas da mesma preparação (dados não apresentados).

Com o intuito de caracterizar farmacologicamente a resposta contrátil dos GLP-IRA, foram calculados os parâmetros farmacológicos $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} , que traduzem eficácia e potência respetivamente (Tabela 5).

	$E_{m\acute{a}x}$ (mN) (W)	$E_{m\acute{a}x}$ (mN) (GK)	pEC_{50} (-log[M]) (W)	pEC_{50} (-log[M]) (GK)	s/n (W)	s/n (GK)
GLP-I	5,6±0,69	9,09±1,44 [#]	8,33±0,16	8,58±0,16	16/4	12/4
Liraglutido	4,69±0,80	3,76±1,01*	9,62±0,23*	9,06±0,51	13/4	5/3

Tabela 5 – Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para os GLP-IRA em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e de ratos GK; $E_{m\acute{a}x}$ = contração máxima em mN de tensão; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de GLP-IRA necessária para induzir 50% da resposta máxima; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão apresentados como média ± S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student; * p < 0,05 vs GLP-I; # p < 0,05 vs Wistar.

Comparando os dois GLP-IRA, o agonista endógeno foi mais eficaz que o Liraglutido em induzir contração de tiras de fundo de estômago isolado de ratos GK, tendo sido equivalentes nos ratos Wistar. Inversamente o Liraglutido foi mais potente que o GLP-I nos animais controlo.

Por fim, comparando a resposta contrátil induzida pelo GLP-I em rato Wistar e em rato GK, o agonista endógeno foi mais eficaz no modelo animal diabético, tendo sido equipotente. Enquanto o Liraglutido foi equivalente nos dois modelos animais em termos de eficácia e potência.

Com o objetivo de verificar se o efeito do GLP-I sobre a contratilidade de fundo gástrico isolado de rato é mediado ou não pelo GLP-IR, procedeu-se à realização de ensaios nos quais se utilizou o antagonista seletivo para o GLP-IR, o Exendin-3 na concentração 300 nM.

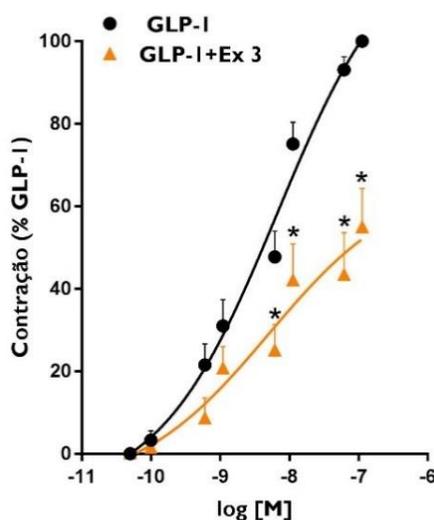


Figura 14 – Resposta contráctil ao GLP-I de tiras de estômago isolado de rato Wistar, na presença e na ausência de 300 nM de Exendin-3, antagonista seletivo do GLP-IR; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste t de Student; * $p < 0,05$ vs GLP-I.

	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pEC_{50} ($-\log[M]$)	s/n
GLP-I	100 \pm 0,00	8,46 \pm 0,13	14/4
GLP-I + 300 nM Ex3	55,08 \pm 9,26*	8,30 \pm 0,23	10/4

Tabela 6 – Efeito do antagonista seletivo do GLP-IR na resposta contráctil de fundo de estômago isolado de rato Wistar ao GLP-I; $E_{m\acute{a}x}$ = efeito máximo em percentagem de contração induzida pelo GLP-I; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de agonista que induz 50% do efeito máximo; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student; * $p < 0,05$ vs GLP-I.

A presença de Exendin-3 induziu alterações significativas na curva CR do GLP-I, provocando um desvio para a direita com redução significativa ($p < 0,05$) da resposta máxima, dentro da janela de concentrações utilizada (Figura 14; Tabela 6). No entanto, não se observou uma redução estatisticamente significativa na potência ($p > 0,05$) (Tabela 6).

De modo a avaliar se o óxido nítrico desempenha alguma função sobre a contração induzida pelos GLP-1RA nesta preparação, procedeu-se à realização de ensaios na presença do inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico, a N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), na concentração de 250 μ M.

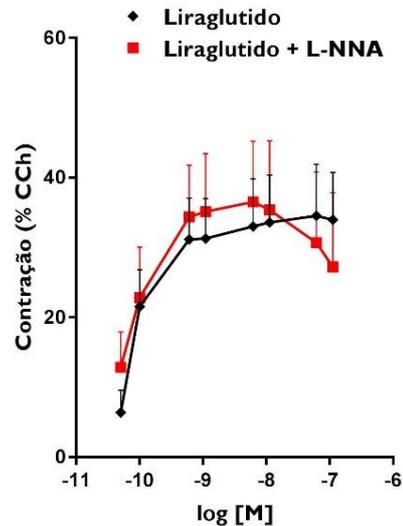


Figura 15 – Resposta contráctil ao Liraglutido de tiras de estômago isolado de rato Wistar, na presença e na ausência de 250 μ M de N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), inibidor não seletivo da NOS; os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M; as barras verticais representam o S.E.M.; n = 6-11.

O L-NNA não alterou significativamente ($p > 0,05$) a resposta contráctil de fundo gástrico isolado de rato Wistar ao Liraglutido (Figura 15).

2. Avaliação do efeito do tratamento com Liraglutido sobre o perfil bioquímico de rato Wistar e de rato GK (estudos *in vivo*)

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com Liraglutido na resposta contráctil de tiras de fundo de estômago isoladas a partir de ratos Wistar e ratos GK, procedeu-se paralelamente à avaliação do efeito deste fármaco sobre o perfil bioquímico, a ingestão calórica, o peso corporal e a sensibilidade periférica à insulina em ambos os modelos animais.

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram a glicemia em jejum, colesterol total e triglicérides, determinados no primeiro dia e no décimo-quarto (e último) dia do tratamento com Liraglutido e os valores obtidos estão apresentados na tabela 7. Na tabela constam também os valores médios de ingestão calórica diária por rato em gramas de ração.

Grupo	W salino		GK salino		W Lira		GK Lira	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Glicemia em jejum (mg/dL)	92,29±3,6	84,14±2,4	150,5±26,1*	140,5±25,3*	93,14±3,7	87,86±4,6	175,75±42,5*	115,5±5,1*
Colesterol total (mg/dL)	167,86±2,2	167,57±2,8	171±1,4	176,25±2,7	170±1,6	169,25±1,4	173,5±2,8	174±2,5
Triglicérides (mg/dL)	101±4,9	106,14±9,0	162,5±24,5*	207,5±52,3*	111±7,9	100,25±7,8	161,75±18,4*	111,25±6,6
Ingestão calórica (g/rato/dia)	16,9±0,6		18,3±1,6		11,± 0,8*		11,6±1,3#	

Tabela 7 – Avaliação e comparação do perfil bioquímico de ratos Wistar e ratos GK tratados e não tratados com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); os resultados estão apresentados como média ± S.E.M.; n = 4-8 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p <0,05; * vs W salino; # vs GK salino.

Em relação à glicemia em jejum, existe diferença estatisticamente significativa (p <0,05) entre rato Wistar e rato GK, o que já era expectável uma vez que uma das principais características do modelo animal diabético do tipo II não obeso usado corresponde à hiperglicemia moderada. No entanto, comparando os ratos tratados com Liraglutido e os ratos não tratados, em ambos os modelos animais, não existem diferenças estatisticamente significativas na glicemia em jejum.

Porém, no rato GK observou-se uma tendência de diminuição da glicemia em jejum com o tratamento com Liraglutido; no caso do rato Wistar, uma vez que este modelo animal já apresenta a glicemia normalizada, os valores obtidos para este parâmetro são semelhantes no início e no final do tratamento.

Em relação ao perfil lipídico, não existe diferença estatisticamente significativa entre os valores de colesterol total obtidos nos quatro grupos de animais nem na comparação entre os valores iniciais e finais.

No que diz respeito aos níveis de triglicerídeos, observou-se mais uma vez um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no rato GK comparativamente ao rato Wistar. No entanto, comparando os grupos de ratos tratados com o GLP-1RA e os não tratados, e também, os valores iniciais e finais, não existem diferenças significativas. Porém, observou-se uma tendência de diminuição dos níveis de triglicerídeos nos ratos diabéticos tratados com Liraglutido e a diferença entre as estirpes deixa de se verificar após o tratamento.

Por fim, em relação à ingestão calórica, os ratos Wistar e GK tratados com Liraglutido ingeriram menos quantidade de ração por dia, comparada com aquela ingerida pelos ratos não tratados, sendo que existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de animais tratados e animais não tratados.

No decorrer do período de tratamento com Liraglutido, procedeu-se à avaliação diária do peso corporal dos ratos dos quatro grupos, de modo a garantir a administração do fármaco no dia seguinte, em função do peso, e a avaliar o efeito deste fármaco na perda de peso.

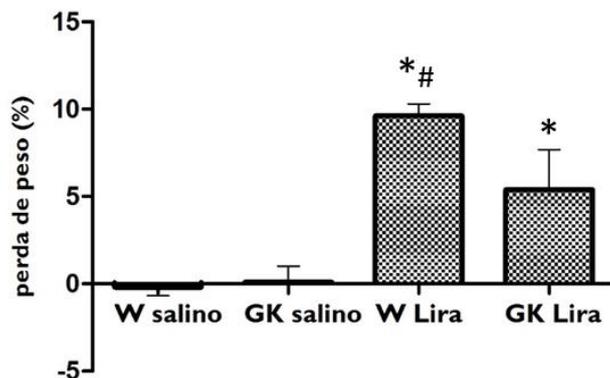


Figura 16 – Comparação da perda de peso no final do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; * vs W salino; # vs GK salino.

Observou-se uma redução no peso dos ratos Wistar e GK tratados com Liraglutido e essa perda de peso foi significativamente maior ($p < 0,05$) entre os ratos Wistar tratados com o fármaco e os ratos Wistar não tratados. Existe também redução do peso corporal dos ratos GK tratados com Liraglutido comparativamente com os ratos GK não tratados, no entanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de ratos GK (Figura 16).

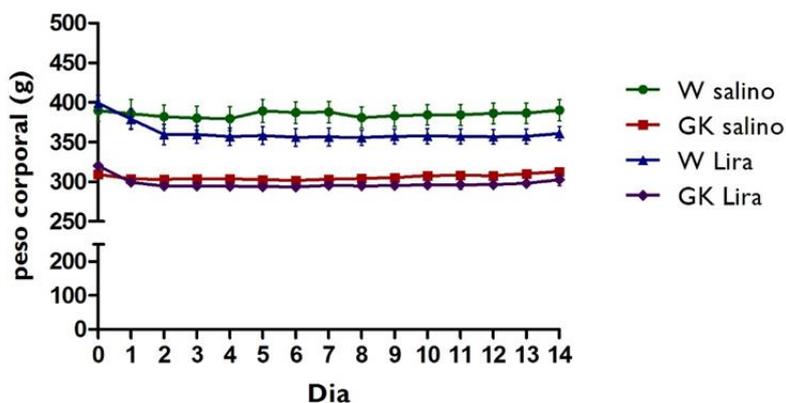


Figura 17 – Evolução do peso corporal ao longo do período de tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo.

A redução no peso corporal dos grupos de ratos tratados com Liraglutido foi mais acentuada nos primeiros dias de tratamento, pois no decorrer do período de tratamento, houve uma tendência de recuperação do peso perdido, principalmente no grupo de ratos GK tratados com o fármaco (Figura 17).

Por fim, com o objetivo de avaliar o efeito do Liraglutido sobre a capacidade de resposta dos tecidos periféricos à insulina, foi realizada uma prova de tolerância à insulina em cada rato de cada um dos quatro grupos de animais no primeiro (Figura 18) e último dia (Figura 19) do tratamento.

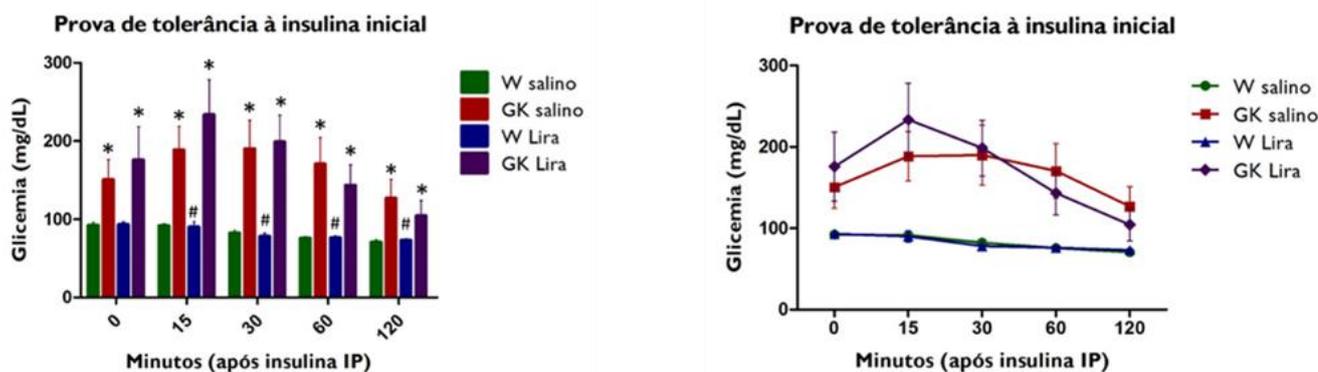


Figura 18 – Prova de tolerância à insulina antes do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-8 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; * vs W salino; # vs GK salino.

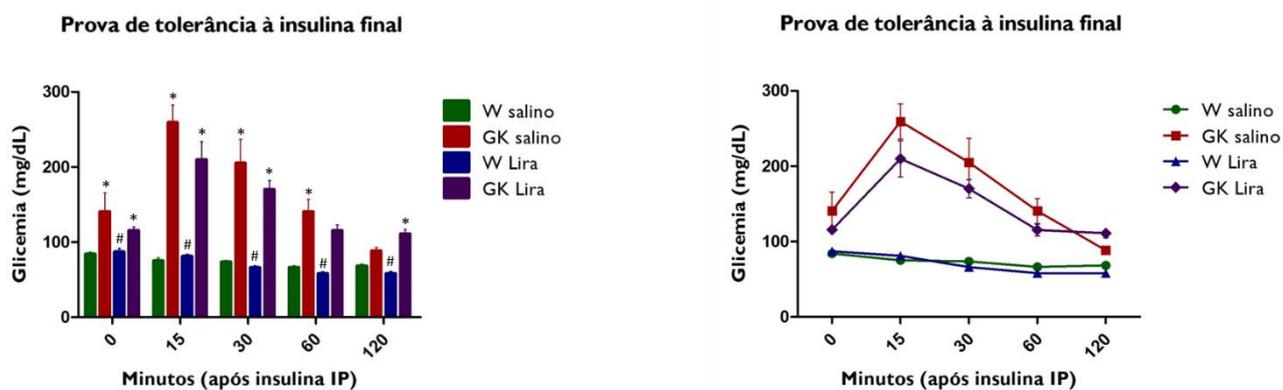


Figura 19 – Prova de tolerância à insulina depois do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; * vs W salino; # vs GK salino.

Analisando os gráficos obtidos (Figuras 18 e 19), não foram observadas diferenças no perfil das curvas dos ratos Wistar tratados e não tratados com Liraglutido. No que diz respeito aos ratos GK não tratados, observou-se que a glicemia começa a diminuir mais cedo na prova de tolerância à insulina final, comparando com a inicial. E no caso dos ratos GK tratados com Liraglutido, foi também observado que a glicemia diminui mais cedo e normaliza no final da prova de tolerância à insulina realizada depois do tratamento.

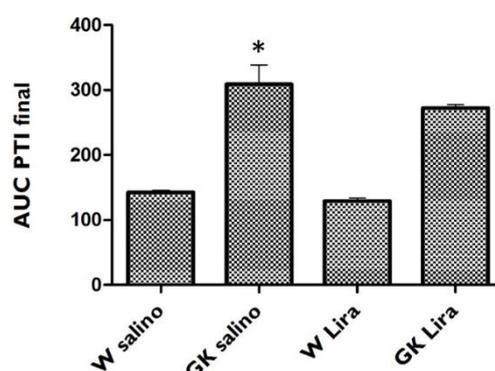


Figura 20 – Comparação entre a área debaixo da curva (AUC) da prova de tolerância à insulina (PTI) no final do tratamento com Liraglutido; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n = 4-7 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p < 0,05 * vs W salino.

A determinação da área debaixo da curva (AUC) permite avaliar a variação dos níveis plasmáticos de glicose, no decorrer da prova de tolerância à insulina. Deste modo, uma diminuição da AUC traduz uma redução da glicemia, que resulta de um aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos, o que por sua vez, traduz-se em melhoria da sensibilidade destes tecidos à insulina.

Os valores obtidos são praticamente iguais entre rato Wistar tratado com Liraglutido e rato Wistar não tratado. No caso do rato GK, embora não se observando diferenças estatisticamente significativas entre o rato tratado com Liraglutido e o rato não tratado (GK salino: 308,75 ± 29,6 vs GK Lira: 272,56 ± 5,4, p > 0,05), a diferença existente entre rato Wistar e rato GK salino atenua-se após o tratamento com Liraglutido (Figura 20).

3. Estudo da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar e de rato GK tratados com Liraglutido

3.1 Resposta contrátil ao Carbacol (CCh)

Em todos os estudos funcionais realizados, as curvas cumulativas CR foram executadas em tiras de fundo gástrico pré-contraídas com o agonista muscarínico Carbacol na concentração 5 μ M. Neste conjunto de experiências em que avaliou-se o efeito do tratamento com Liraglutido no relaxamento induzido por um dador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio e pela noradrenalina, pretendeu-se verificar se existiam diferenças entre os quatro grupos de animais no que respeita à resposta contrátil ao CCh (Figura 21).

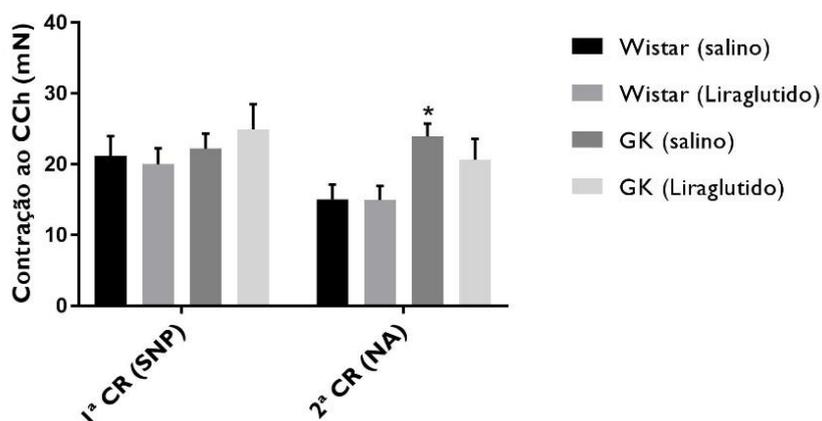


Figura 21 – Resposta contrátil ao CCh nos ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido ao longo de duas curvas cumulativas CR sucessivas; os valores estão apresentados como média \pm S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student. * $p < 0,05$ vs Wistar (salino) e Wistar (Liraglutido).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os quatro grupos na resposta contrátil ao CCh nas curvas cumulativas CR do SNP.

Por outro lado, nas curvas cumulativas CR da noradrenalina, a resposta contrátil ao CCh no rato GK não tratado foi significativamente superior ($p < 0,05$) às respostas contráteis ao agonista muscarínico nos dois grupos de ratos Wistar (tratados e não tratados com Liraglutido), havendo uma tendência para a normalização com o tratamento.

3.2 Resposta contrátil ao nitroprussiato de sódio (SNP) e à noradrenalina (NA)

O nitroprussiato de sódio (SNP) é um dador de óxido nítrico e induz relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal (GI) dependente da libertação de óxido nítrico, mas independente do endotélio.⁴⁸

As tiras de fundo de estômago isolado dos quatro grupos de animais responderam ao SNP com relaxamento dependente da concentração (Figura 22).

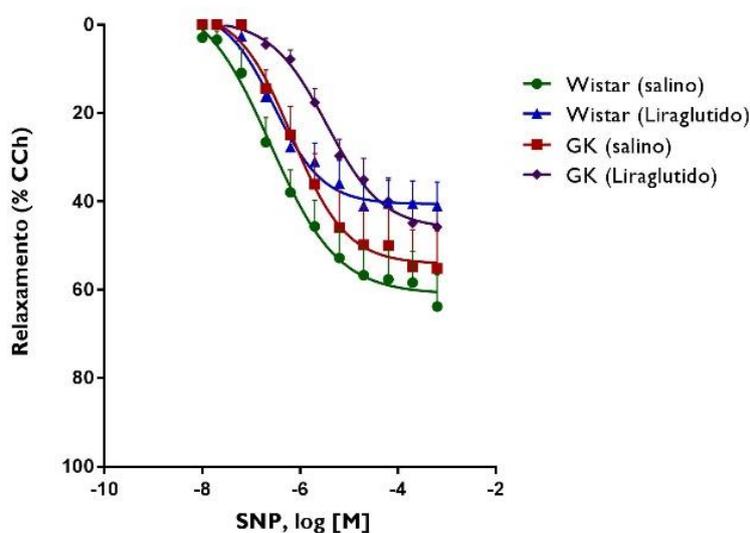


Figura 22 – Relaxamento induzido pelo SNP (em % de inibição da contração induzida pelo CCh) em tiras de fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; os resultados estão expressos como média \pm S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; n constante na tabela 8.

Analisando o relaxamento do fundo de estômago isolado de ratos Wistar e de ratos GK, tratados e não tratados com Liraglutido, induzido pelo SNP, observou-se um decréscimo do mesmo em ratos Wistar e ratos GK sujeitos ao fármaco comparativamente aos respetivos grupos não tratados.

Quando analisados os parâmetros que caracterizam farmacologicamente o efeito deste dador de óxido nítrico, $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} (Tabela 8), verificou-se que a eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) do SNP em induzir relaxamento variou entre os quatro grupos de animais do seguinte modo: W salino \geq GK salino \geq GK Lira \geq W Lira. Embora não existam diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os quatro grupos, o tratamento com Liraglutido tendencialmente promove perda de eficácia sendo esse efeito mais acentuado no modelo animal usado como grupo controle (rato Wistar).

	$E_{m\acute{a}x}$ (% CCh)	pEC_{50} (log [M])	s/n
Wistar (salino)	64,6 \pm 7,1	-6,38 \pm 0,16	14/4
Wistar (Liraglutido)	43,4 \pm 4,9	-6,39 \pm 0,12	15/4
GK (salino)	55,7 \pm 8,6	-6,00 \pm 0,10	15/4
GK (Liraglutido)	47,1 \pm 5,1	-5,36 [#] \pm 0,10	16/4

Tabela 8 – Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para o SNP em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; $E_{m\acute{a}x}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pelo Carbacol (CCh); pEC_{50} = logaritmo da concentração molar de SNP necessária para induzir 50% da resposta máxima; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas; # $p < 0,05$ vs Wistar (salino), Wistar (Liraglutido) e GK (salino).

De fato a aplicação de um ANOVA a dois fatores (tratamento e tipo de rato) revela que, ainda que não existam diferenças estatisticamente significativas entre ratos Wistar ou GK ($F(1,56) = 0,15$; $p = 0,70$), o tratamento teve efeito estatisticamente significativo ($F(1,58) = 5,02$; $p = 0,029$), qualquer que seja o tipo de rato, sendo o efeito do tratamento ligeiramente maior nos ratos Wistar (Figura 23).

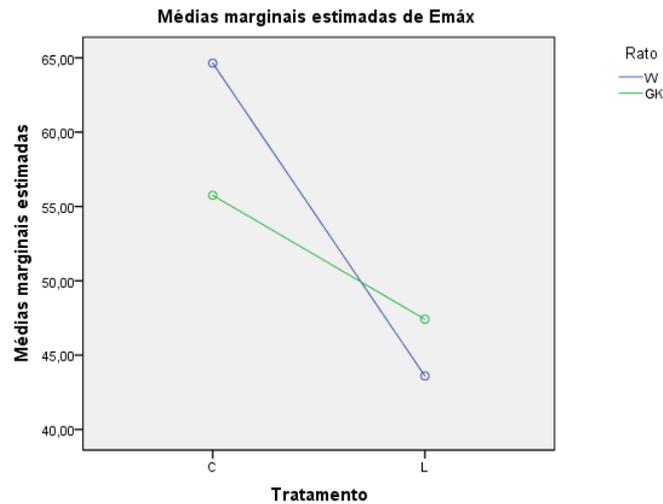


Figura 23 – Gráfico de perfil do efeito do tratamento com Liraglutido sobre as médias marginais estimadas de $E_{máx}$ do SNP nos dois modelos animais; C = sem tratamento (situação controle), L = tratamento com Liraglutido; as diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste ANOVA a 2 fatores (rato e tratamento); $F(1,58) = 5,02$; $p = 0,029$.

Relativamente à potência do SNP, parâmetro avaliado através do pEC_{50} , os quatro grupos variaram da seguinte maneira: W Lira \geq W salino \geq GK salino $>$ GK Lira. Em rato Wistar, os valores de potência são muito semelhantes nos dois grupos (tratados e não tratados com Liraglutido); no caso do rato GK, o SNP é significativamente menos potente em rato tratado com Liraglutido ($F(3,51) = 17,00$; $p < 0,001$) (Tabela 8) do que no correspondente grupo não tratado.

Estes resultados de ANOVA a um fator considerando os 4 grupos gerados pelos dois fatores, tratamento e tipo de rato, foi justificado pelo teste ANOVA a dois fatores. Com este último verificou-se que existe efeito do tipo de rato ($F(1,51) = 35,06$; $p < 0,001$) (Figura 24), sendo que ratos diabéticos têm sempre valores mais elevados do que ratos controle, quer sejam tratados ou não; e que existe efeito do tratamento ($F(1,51) = 6,87$; $p = 0,012$), sendo que ratos tratados têm sempre valores mais elevados do que não tratados, no global; de fato, ratos GK tratados apresentam pEC_{50} mais elevado que os GK não tratados, mas ratos Wistar apresentam valores semelhantes entre tratados e não tratados.

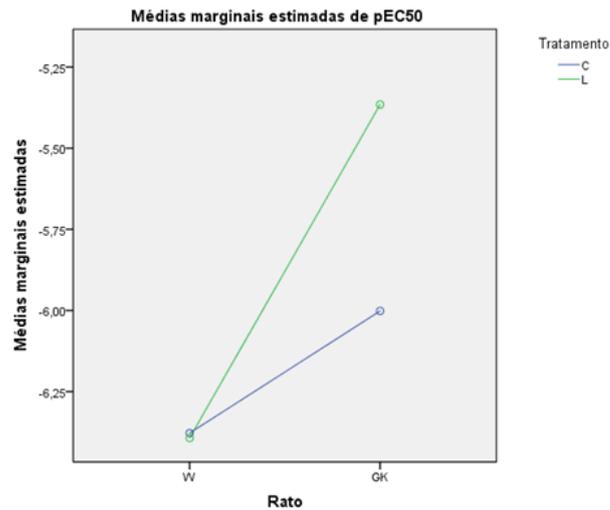


Figura 24 – Gráfico de perfil do efeito do modelo animal (W e GK) sobre as médias marginais estimadas de pEC₅₀ do SNP; C = sem tratamento (situação controle), L = tratamento com Liraglutido; as diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste ANOVA a 2 fatores (rato e tratamento); $F(1,51) = 35,06$; $p < 0,001$.

A noradrenalina (NA) é um neurotransmissor do Sistema Nervoso Autônomo Simpático que medeia o relaxamento da musculatura lisa no sistema gastrointestinal através da ativação de recetores adrenérgicos do tipo β_2 .⁴⁹

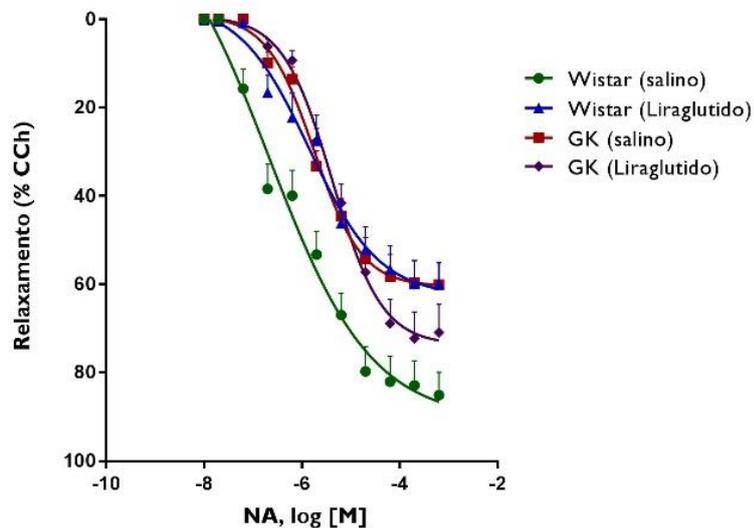


Figura 25 – Relaxamento induzido pela NA (em % de inibição da contração induzida pelo CCh) em tiras de fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; os resultados estão expressos como média \pm S.E.M.; as barras verticais representam o S.E.M.; n constante na tabela 9.

Analisando as curvas cumulativas CR à NA (Figura 25), observou-se que o relaxamento máximo por ela induzido é inferior em fundo gástrico isolado de rato Wistar tratado com Liraglutido, comparando com o correspondente grupo de rato não tratado (Tabela 9). No entanto, no rato GK, não se observaram alterações estatisticamente significativas na resposta relaxante à NA entre ratos tratados e não tratados (Figura 25).

	$E_{m\acute{a}x}$ (% CCh)	pEC_{50} (log [M])	s/n
Wistar (salino)	85,4 ± 5,2	-6,28 ± 0,09	16/4
Wistar (Liraglutido)	61,6* ± 5,2	-5,76* ± 0,18	16/4
GK (salino)	60,4* ± 4,9	-5,77* ± 0,06	15/4
GK (Liraglutido)	72,2 ± 6,1	-5,37* ± 0,08	16/4

Tabela 9 – Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para a NA em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK tratados e não tratados com Liraglutido; $E_{m\acute{a}x}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pelo Carbacol (CCh); pEC_{50} = logaritmo da concentração molar de NA necessária para induzir 50% da resposta máxima; s/n = número de tiras de estômago / número de ratos de onde foram obtidas as tiras de estômago; os resultados estão apresentados como média ± S.E.M.; as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas; * $p < 0,05$ vs Wistar (salino).

De fato, considerando os parâmetros que caracterizam farmacologicamente o relaxamento do órgão isolado à noradrenalina (Tabela 9) há a salientar que a NA foi mais eficaz em rato Wistar não tratado na sequência de uma ANOVA a 1 fator considerando os quatro grupos gerados pelos dois fatores rato e tratamento ($F(3,58) = 4,60$; $p = 0,006$).

No que diz respeito à potência da NA em induzir relaxamento, depreende-se pelo desvio para a direita da curva CR que se observa na figura 25, que há uma perda significativa de potência relativamente à situação controlo, determinada quer pela patologia, quer pelo tratamento (Tabela 9).

De fato o teste ANOVA a dois fatores revela que ratos diabéticos têm sempre valores mais elevados de pEC_{50} do que ratos não diabéticos, quer sejam tratados ou não ($F(1,55) = 12,45$; $p = 0,001$); e ratos tratados têm sempre valores mais elevados do que ratos não tratados quer sejam ratos Wistar ou GK ($F(1,55) = 12,45$; $p = 0,001$) (Figura 26).

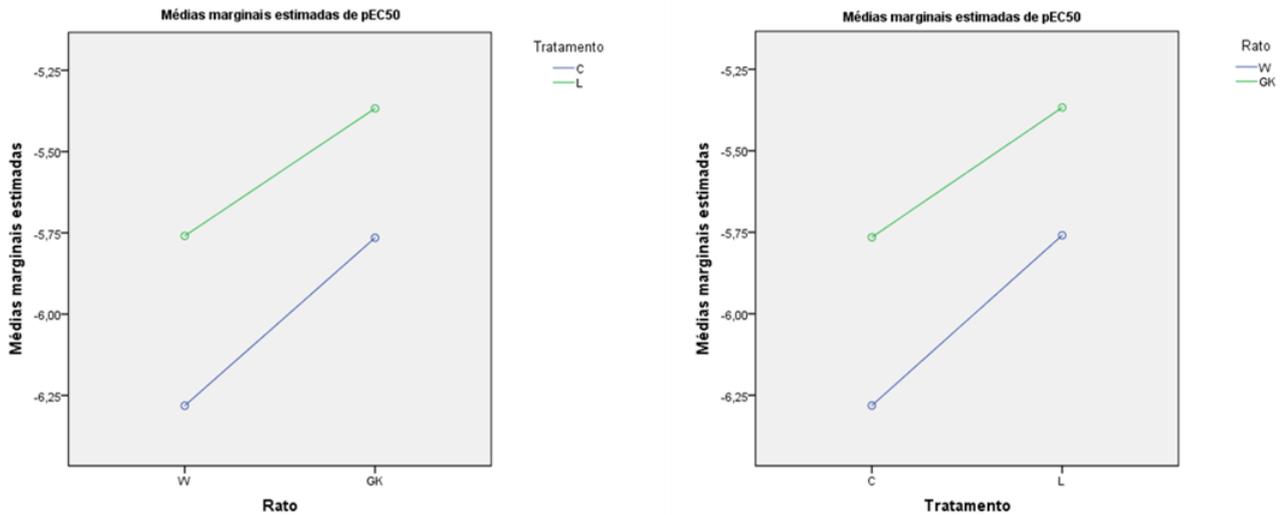


Figura 26 – Gráficos de perfil do efeito do modelo animal e do tratamento sobre as médias marginais estimadas de pEC_{50} da NA; C = sem tratamento (situação controlo), L = tratamento com Liraglutido; as diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste ANOVA a 2 fatores (rato e tratamento); $F(1,55) = 12,45$; $p = 0,001$.

4. Determinação da densidade do GLP-IR, da nNOS e da p-nNOS por Western Blotting

Com o intuito de complementar a caracterização farmacológica do efeito dos GLP-IRA sobre a motilidade gástrica, procedeu-se à determinação da expressão do GLP-IR em fundo gástrico isolado de rato através da técnica Western Blotting e posterior análise e comparação dos resultados entre os quatro grupos de estudo.

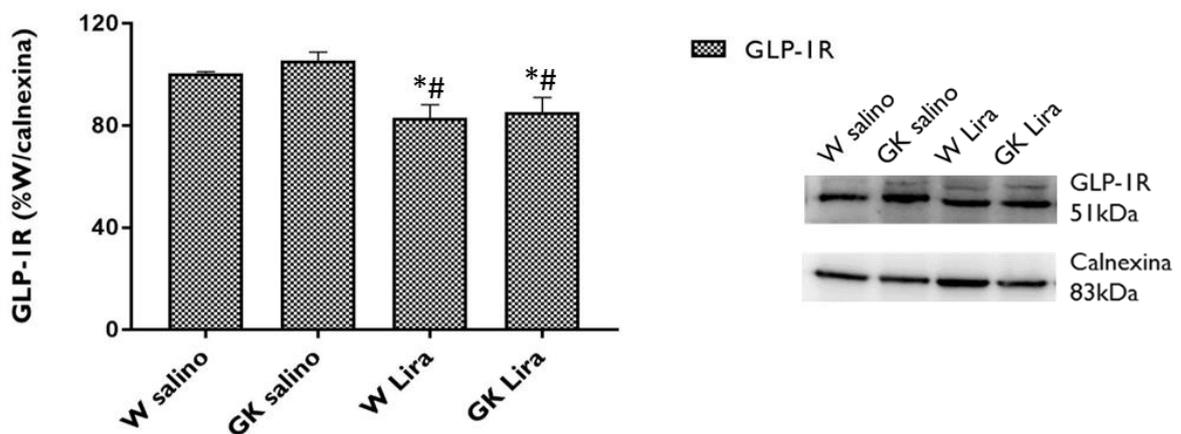


Figura 27 – Expressão do GLP-IR, em fundo gástrico isolado de rato, quantificada por Western Blotting; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p <0,05; * vs W salino; # vs GK salino.

Comparando os resultados obtidos em rato Wistar e em rato GK, observou-se uma tendência de aumento na expressão do GLP-IR em fundo de estômago isolado de rato diabético comparativamente à respectiva situação controlo (GK salino = 105,4 ± 3,4 vs W salino = 100,5 ± 0,5; (p > 0,05).

E o tratamento com Liraglutido induziu uma diminuição estatisticamente significativa (p <0,05) da expressão do GLP-IR em ambos os modelos animais (Figura 27).

Uma vez que o óxido nítrico existe no trato gastrointestinal e está associado à via de sinalização do GLP-1R que medeia os efeitos inibitórios do GLP-1 sobre o trato gastrointestinal, procedeu-se à determinação da expressão da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS, *neuronal nitric oxide synthase*) – enzima responsável pela síntese do óxido nítrico no trato gastrointestinal; e também, da forma fosforilada da nNOS (p-nNOS), de modo a avaliar a ativação enzimática da nNOS.

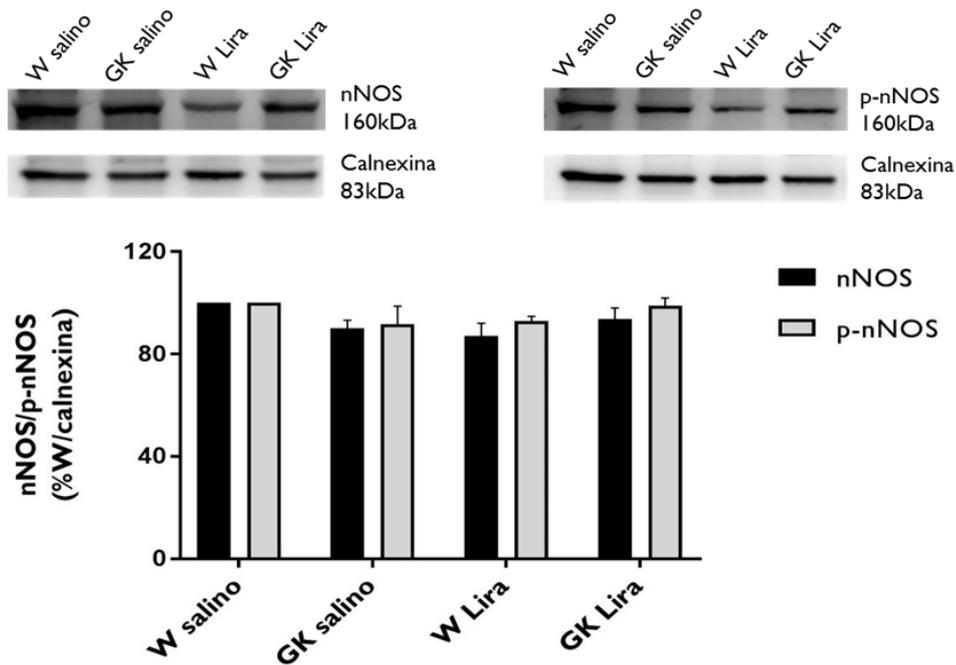


Figura 28 – Expressão da nNOS e da p-nNOS, em fundo gástrico isolado de rato, quantificada por Western Blotting; W salino – rato Wistar administrado com soro fisiológico; W Lira – rato Wistar administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); GK salino – rato *Goto-Kakizaki* administrado com soro fisiológico; GK Lira – rato *Goto-Kakizaki* administrado com Liraglutido (200 µg/kg, duas vezes por dia); n=4-7 por grupo.

Comparando a situação controlo (rato não tratado) em ambos os modelos animais, observou-se uma tendência para diminuição da expressão da nNOS e/ou p-nNOS no rato GK, relativamente ao rato Wistar.

No que diz respeito ao efeito do tratamento com Liraglutido, observou-se uma tendência para diminuição da expressão da nNOS e da p-nNOS no rato Wistar tratado com o fármaco, tendo-se observado o oposto no rato GK.

Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre nenhum dos quatro grupos (Figura 28).

5. Determinação da localização celular do recetor do GLP-I por Imunohistoquímica

Com o intuito de determinar a localização celular do GLP-IR em fundo gástrico isolado de rato, procedeu-se à realização de estudos imunohistoquímicos.

Na figura 29 são apresentados cortes histológicos representativos de pâncreas de rato, usado como controlo positivo para a imunomarcção do GLP-IR (painel A), e de fundo de estômago isolado de rato (painéis B, C e D). A imunoreatividade do recetor do GLP-I foi observada em ilhéus de Langerhans (IA) do pâncreas e em fundo gástrico isolado de rato, nomeadamente nas células parietais das glândulas da mucosa gástrica (2B), nas células musculares lisas (3C), nas células ganglionares do plexo nervoso (4D) e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (5D).

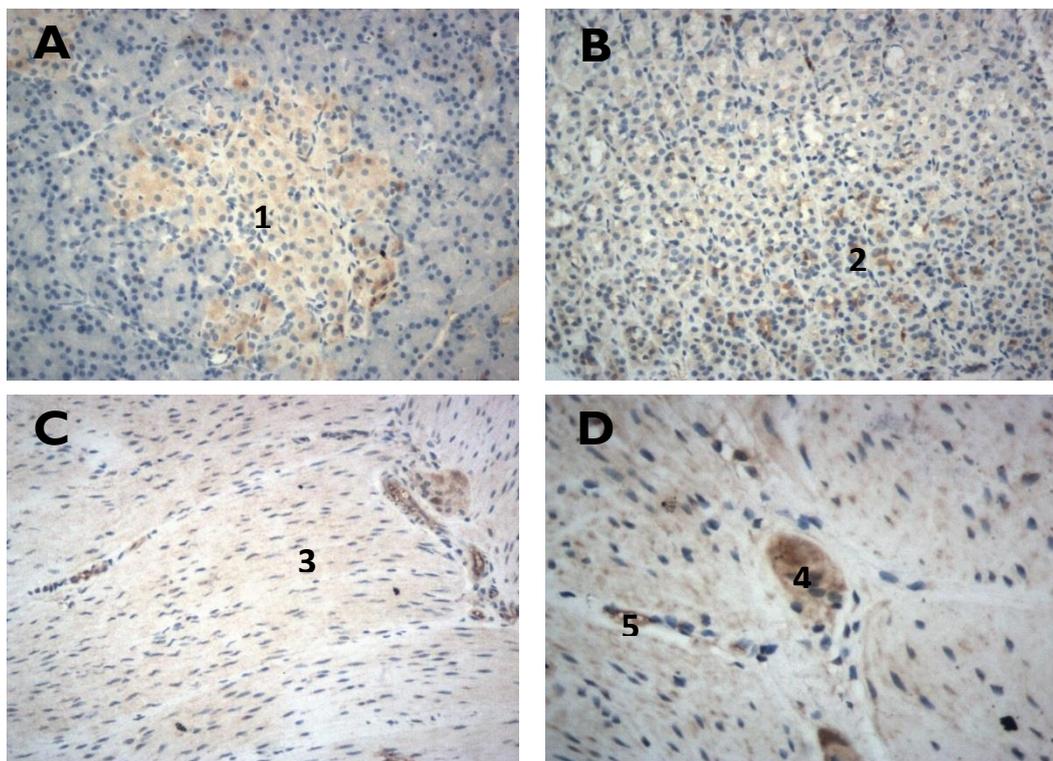


Figura 29 – Localização celular do GLP-IR, em fundo gástrico isolado de rato, determinada por Imunohistoquímica (DAB); O painel **A** refere-se a um corte de pâncreas isolado de rato GK salino, x200. O painel **B** refere-se a um corte de fundo gástrico isolado de rato GK tratado com Liraglutido, x200. Os painéis **C** e **D** referem-se a cortes de fundo gástrico isolado de rato Wistar salino, x200 e x400 respetivamente.

Visualização da imunomarcção do GLP-IR a castanho, no ilhéu de Langerhans (1), nas células parietais das glândulas fúndicas (2), nas células musculares lisas (3), nas células ganglionares do plexo nervoso (4) e nas células endoteliais de vasos sanguíneos (5).

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

O glucagon-like peptide I (GLP-I) é um neuropéptido sintetizado pelas células enteroendócrinas do tipo L localizadas maioritariamente no íleo e cuja secreção é induzida pela entrada de nutrientes no organismo.¹²

O GLP-I é caracterizado por vários efeitos, entre os quais, potenciação da secreção de insulina induzida pela glicose (o denominado “efeito incretina”), estimulação da biossíntese de insulina, inibição da secreção de glucagon, estimulação da proliferação e inibição da apoptose das células beta-pancreáticas e melhoria da sensibilidade periférica à insulina, e também, inibição do apetite.^{1,3,7,8,14} O GLP-I também atua sobre o trato gastrointestinal, inibindo o esvaziamento do estômago e a motilidade intestinal, sendo que estes efeitos podem ser mediados pela ativação de GLP-IR localizados em neurónios aferentes do nervo vago e em neurónios do plexo mientérico,^{36,50} e além disso, regula a secreção ácida do estômago por ação direta sobre as parietais células da mucosa gástrica.¹⁸

O GLP-I tanto pode atuar a nível central (por exemplo, ativando os seus recetores localizados no hipotálamo, e deste modo, induzindo a saciedade) como a nível periférico, por via da ativação de vias nervosas aferentes vagais do SNE.⁶

Uma vez que pelo descrito o GLP-I possui vários efeitos benéficos para o tratamento da Diabetes *Mellitus* tipo II, esta incretina corresponde a um dos principais, e dos mais recentes, alvos terapêuticos para o tratamento desta patologia e têm sido desenvolvidos novos fármacos agonistas do recetor do GLP-I (GLP-IRA) que mimetizam os efeitos do agonista endógeno e que são resistentes à degradação enzimática pela DPP-IV.⁸

Os GLP-IRA também têm sido aplicados na terapêutica da obesidade devido ao efeito significativo desta classe farmacológica na inibição do apetite e conseqüente perda de peso.

O fundo de estômago corresponde ao local de armazenamento dos alimentos ingeridos e estudando a região proximal gástrica, são estudados os mecanismos associados à passagem dos alimentos ingeridos para o estômago e a acomodação pós-prandial. O aumento do tónus muscular do fundo gástrico induz uma redução na quantidade de alimento que entra no estômago, o que por conseguinte, contribui para a indução de saciedade.

No nosso estudo, ambos os GLP-1RA, GLP-1 e Liraglutido, induziram contração dependente da concentração de fundo de estômago isolado de rato Wistar e GK, dentro do intervalo de concentrações testado (0,05-111,1 nM). A contração observada foi de natureza tónica e não colinérgica e dependente da pré-contração com carbacol (agonista muscarínico), e portanto, do aumento do tónus gástrico.

Comparando os dois GLP-1RA, o agonista endógeno foi o mais eficaz na indução da contração de fundo de estômago isolado de rato GK, enquanto ambos os GLP-1RA foram equivalentes no rato Wistar. Por outro lado, o Liraglutido foi o mais potente nos animais controlo, sendo que os dois GLP-1RA foram equivalentes no que diz respeito à potência nos animais diabéticos.

A ligação do Liraglutido à albumina, devido à conjugação do ácido palmítico com a cadeia peptídica do GLP-1, pode explicar em parte a maior potência do fármaco quando comparado com o agonista endógeno, pois a ligação à albumina reduz a fração livre do fármaco, farmacologicamente ativa, mas também a mais facilmente eliminável por degradação enzimática, por isso, a concentração de Liraglutido necessária para induzir determinado efeito será menor que a concentração de GLP-1 necessária para a indução do mesmo efeito, o que se traduz em maior potência.

A maior eficácia do GLP-1 nos animais diabéticos pode ser explicada em parte pelo aumento, embora ligeiro e sem significância estatística, da expressão do GLP-1R em fundo de estômago isolado de rato GK (comparando com o rato Wistar).

De facto diversos estudos têm demonstrado que a estimulação dos recetores de GLP-1 protege o coração contra as lesões de isquémia e reperfusão em animais^{51,52} e em humanos.^{53,54}

Um estudo recente revela ainda que os níveis plasmáticos de GLP-1 aumentaram significativamente em doentes com insuficiência na função ventricular esquerda, em comparação com aqueles com função ventricular esquerda preservada.⁵⁵ Corroborando a função cardioprotetora do GLP-1, a expressão de GLP-1R foi também significativamente reforçada nestes doentes com função ventricular esquerda diminuída,⁵⁵ muito à semelhança do que foi observado anteriormente em modelos animais de enfarte de miocárdio^{56,57} e insuficiência cardíaca.⁵⁸

Assim o aumento da eficácia do GLP-IRA em animais diabéticos agora observado, embora não refletido nos resultados dos estudos moleculares, poderá traduzir um mecanismo compensatório na presença da patologia diabetes, indubitavelmente associada a complicações cardiovasculares.

A diabetes tipo II *per se* também pode explicar o aumento da resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato GK, uma vez que esta patologia caracteriza-se por alterações da motilidade gastrointestinal como consequência da hiperglicemia e da neuropatia autonômica diabética.

Para além de ter sido demonstrado que o GLP-I aumenta o volume gástrico em jejum e a acomodação pós-prandial,²⁴ foi comprovado que o esvaziamento gástrico é mais lento na diabetes tipo II,^{30,31} o que se pode relacionar com o aumento da contração do fundo de estômago observada no nosso estudo com os GLP-IRA do seguinte modo: estando o fundo gástrico mais contraído, a entrada de alimentos no estômago é menor; por outro lado, a acomodação pós-prandial na região proximal do estômago é maior, realizando um mecanismo de compensação de modo a não aumentar demasiado o volume intragástrico, e por conseguinte, o esvaziamento gástrico é mais lento contribuindo para um maior grau de saciedade reportado para este grupo farmacológico.^{20,35}

Dado que na presença do antagonista seletivo do GLP-IR, o Exendin-3, se observou uma redução significativa de 55% da resposta máxima ao agonista endógeno, dentro da janela de concentrações utilizada, e sem alteração da potência, conclui-se que a resposta contrátil induzida pelo GLP-I depende parcialmente da ativação do seu recetor específico, podendo existir outros mecanismos e vias de sinalização responsáveis por este efeito.

Alguns estudos^{52,59} sugerem que o GLP-I exerce efeitos cardioprotetores dependentes e independentes da ativação do seu recetor, como por exemplo através do seu metabolito GLP-I (9-36) que resulta da degradação enzimática pela DPP-IV e que não apresenta afinidade para o recetor. Além disso, também é sugerida a existência de outros subtipos de GLP-IR no sistema cardiovascular e que estes são responsáveis por mediar alguns dos efeitos do GLP-I. No caso particular do efeito vasodilatador induzido pelo GLP-I, este é dependente da síntese de óxido nítrico com origem no endotélio.

Também os inibidores da DPP-IV promovem efeitos sobre o sistema cardiovascular. Um estudo em aorta de ratinho não diabético comprovou que a Alogliptina (inibidor da DPP-IV) induz relaxamento vascular através de mecanismos independentes do GLP-IR, mas que paradoxalmente dependem do endotélio e do óxido nítrico, sendo que a libertação deste gás

ocorre por ativação (fosforilação) da eNOS e esta, por sua vez, é dependente da via de sinalização PI3K/Akt, que está associada ao GLP-IR.^{17,60}

Portanto, é possível que o efeito indutor de contração dos GLP-IRA em fundo gástrico isolado de rato também possa ser explicado, em parte, por mecanismos independentes da ativação do GLP-IR, tal como acontece para alguns dos efeitos dos GLP-IRA sobre o sistema cardiovascular, tanto mais que na presença do inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico, a N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), não foram observadas alterações estatisticamente significativas na resposta contrátil de fundo gástrico isolado de rato Wistar ao Liraglutido.

Deste modo pode concluir-se que a resposta contrátil induzida pelos GLP-IRA em fundo gástrico isolado de rato não parece ser dependente da NOS.

Porém, esta conclusão não é concordante com os resultados obtidos noutros estudos^{20,35,38,50} que comprovaram que o GLP-I inibe a contratilidade do músculo liso intestinal de ratinho, inibindo a neurotransmissão colinérgica excitatória através da ativação de GLP-IR presentes nos neurónios entéricos e por via da libertação de óxido nítrico.

Noutro estudo³⁸ foi comprovado que o GLP-I exógeno inibe a contratilidade espontânea do músculo liso circular de cólon humano de um modo concentração-dependente, e também, através da ativação de GLP-IR localizados em neurónios entéricos e da libertação de óxido nítrico.

Também no estômago, mais propriamente no antro isolado de ratinho pré-contraído com carbacol, o GLP-I exógeno possui um efeito inibitório sobre a motilidade, pois induz relaxamento dependente da concentração, através da ativação do GLP-IR e por via da libertação de óxido nítrico.³⁶

A acrescentar aos efeitos inibitórios do GLP-I sobre a motilidade gastrointestinal referidos acima, foi reportada a co-expressão de GLP-IR com a nNOS em neurónios do SNE.^{38,50}

Portanto, seria de esperar que os GLP-IRA induzissem relaxamento do fundo gástrico isolado de rato, o que não se observou nos estudos funcionais realizados.

Uma possível explicação para os resultados obtidos neste trabalho pode relacionar-se com o facto do óxido nítrico poder comportar-se como um neurotransmissor e induzir a libertação de uma substância que, ao contrário do expectável, estimule a contração da musculatura lisa gástrica nos nossos modelos animais, rato Wistar e GK.

De facto há estudos^{61,62} que comprovaram a ação do óxido nítrico como um mediador da libertação de outros neurotransmissores que induzem alterações na contratilidade do músculo liso GI. É o caso do VIP que induz o relaxamento da musculatura lisa GI e cuja via de sinalização inclui a ativação da PKA e o aumento de AMPc. A ativação da nNOS nos neurónios entéricos estimula a libertação de VIP e este, por sua vez, ativa recetores pós-sinápticos que vão ativar a eNOS no músculo liso, estimulando a síntese de óxido nítrico e consequente indução do relaxamento.

Procurando compreender melhor o observável efeito contráctil dos GLP-IRA na nossa preparação, procedeu-se à avaliação do efeito do Liraglutido no relaxamento induzido por um dador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio e pela noradrenalina, em tiras de fundo de estômago isoladas a partir de ratos Wistar e ratos GK tratados com o fármaco.

A diminuição dos níveis de glicemia em jejum e dos níveis de triglicérides observada nos ratos GK tratados com Liraglutido, apesar de não ter sido estatisticamente significativa ao fim de duas semanas de tratamento, sugere que o tratamento com Liraglutido promove uma melhoria no perfil glicémico e lipídico dos animais diabéticos. Este efeito foi já observado em rato Wistar obeso tratado com Liraglutido (administrado por via s.c. e duas vezes por dia durante dez dias)⁶³ e em modelos animais de rato diabético do tipo II e obeso, tais como, o rato ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*) tratado com Liraglutido (duas administrações diárias) durante seis semanas⁴⁶ e o rato WBN/Kop-Lepr (*falfa*) também tratado com Liraglutido (administrado por via s.c. e uma vez por dia durante quatro semanas).⁴⁷

A redução significativa da ingestão calórica com o tratamento com Liraglutido em ambos os modelos animais está de acordo com um dos principais efeitos que caracteriza os GLP-IRA, a inibição do apetite,^{46,64} e foi acompanhada por uma redução do peso corporal igualmente observada tanto em rato Wistar como em rato GK tratados com Liraglutido, tendo sido apenas significativa no rato Wistar.

A diminuição do peso corporal foi já comprovada em rato Wistar tratado com Liraglutido (administrado por via s.c. e duas vezes por dia durante dez dias)⁶³ e num modelo animal de rato diabético obeso, o rato ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*).⁴⁶

Uma possível explicação para a perda de peso não ter sido significativa no rato GK pode estar relacionado com o facto do peso dos ratos desta estirpe ser menor que o peso dos ratos Wistar logo no início, e também, devido à capacidade de adaptação que caracteriza o rato GK.

Correlacionando a diminuição do peso corporal com a redução da ingestão calórica, é provável que a perda de peso induzida pelos GLP-IRA seja consequência do efeito inibitório sobre a ingestão de alimentos.⁶⁵

Tendo a sensibilidade periférica à insulina sido avaliada através de provas de tolerância à insulina no primeiro e no último dia (décimo-quarto) de tratamento com Liraglutido, comparando os resultados obtidos no início e no final do tratamento, sugere-se uma tendência de melhoria na “capacidade de resposta” dos tecidos periféricos à insulina nos grupos de ratos GK tratados com Liraglutido, apesar de não existirem diferenças estatísticas significativas.

Por fim, algumas limitações dos estudos *in vivo*, tais como o número reduzido de animais por grupo (principalmente nos grupos de ratos GK) e o curto período de tratamento com Liraglutido (catorze dias) poderão explicar a ausência de efeitos estatisticamente significativos no controlo glicémico e na sensibilidade periférica à insulina. Porém, as tendências de melhoria destes parâmetros são bons indicadores dos efeitos benéficos dos GLP-IRA sobre o perfil bioquímico na diabetes tipo II.

Quanto à resposta contrátil ao nitroprussiato de sódio (SNP) e à noradrenalina (NA) em fundo gástrico isolado de rato Wistar e de rato GK tratados com Liraglutido, foi observada uma diminuição no relaxamento induzido pelo SNP e pela NA nos grupos de ratos tratados (comparando com os correspondentes animais não tratados) e que pode ser explicada em parte pelo aumento do tónus muscular induzido pelos GLP-IRA em fundo de estômago isolado de rato, como observado nos estudos conduzidos no órgão isolado do conjunto de animais onde se estudou a resposta contrátil a curvas CR deste grupo de fármacos.

O SNP é um dador de óxido nítrico que induz relaxamento do músculo liso dependente da libertação deste gás, mas independente do endotélio.⁴⁸ O mecanismo de ação subjacente ao efeito relaxante do óxido nítrico inclui a ativação da guanilato ciclase (GC) e o consequente aumento de GMPc.⁴⁵

A diminuição da resposta máxima de relaxamento induzido pelo SNP em ratos Wistar e GK tratados com Liraglutido, comparando com os correspondentes ratos não tratados traduz-se em perda de eficácia na resposta contrátil ao GLP-IRA, sendo que esse efeito é mais acentuado no rato Wistar (grupo controlo).

A potência do efeito do SNP é semelhante nos dois grupos de rato Wistar (tratado e não tratado com Liraglutido); por outro lado, o SNP é menos potente no grupo de ratos GK tratados com Liraglutido, quando comparado com o correspondente grupo de ratos GK não tratados. Deste modo, conclui-se que o tratamento com o GLP-IRA promove perda de potência do efeito do SNP nos animais diabéticos.

A diminuição do relaxamento induzido pelo SNP nos ratos tratados pode ser explicada pelo facto do Liraglutido poder promover a diminuição da libertação ou a degradação do óxido nítrico, e não tanto por um efeito direto sobre a síntese deste gás, uma vez que também não foram observadas alterações estatísticas significativas na expressão da nNOS e da p-nNOS em fundo gástrico isolado de ratos tratados com Liraglutido.

Outra possível explicação relaciona-se com a possibilidade do GLP-IRA atuar por via da ativação da NOS endotelial em detrimento da NOS neuronal.

No sistema cardiovascular, alguns dos efeitos do GLP-I são mediados pela ativação do GLP-IR, que por sua vez, induz o aumento da expressão da NOS endotelial e da sua forma fosforilada o que por conseguinte, resulta na estimulação da síntese de óxido nítrico e consequente efeito relaxante sobre o músculo liso vascular.^{16,17,66}

De facto observou-se imunomarcação do GLP-IR em células endoteliais de vasos sanguíneos co-localizados no plexo nervoso deste órgão. Assim sendo, caso seja possível que os GLP-IRA atuem por via da eNOS, em detrimento da nNOS, em fundo gástrico isolado de rato, então uma redução da expressão do GLP-IR, induzida pelo tratamento com Liraglutido, como foi demonstrado, quer em ratos Wistar quer em ratos GK, poderia resultar numa redução da ativação da eNOS e consequente diminuição da síntese de óxido nítrico, e por fim, numa diminuição do relaxamento do músculo liso gástrico. No entanto há que salientar que não foram observadas alterações significativas na curva CR ao Liraglutido na presença de L-NNA, um inibidor não seletivo da NOS.

Por fim, a perda de potência do efeito relaxante do SNP nos animais diabéticos pode ser explicada pelo facto da diabetes do tipo II *per si* promover perda de neurónios nitrérgicos, diminuição da expressão da nNOS e da libertação de óxido nítrico, logo o relaxamento da musculatura lisa gástrica é inibido.³⁴ De facto no nosso estudo observou-se uma tendência para diminuição da expressão da nNOS e/ou p-nNOS no rato GK, relativamente ao rato Wistar.

Há estudos^{67,68} que reportam que o relaxamento não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) de fundo gástrico é mediado pelo óxido nítrico. Além disso, foi comprovado que o relaxamento NANC em fundo gástrico de rato com diabetes induzida pela estreptozocina encontra-se diminuído (comparado com o grupo controlo), como resultado de uma disfunção da neurotransmissão NANC, nomeadamente diminuição da libertação de óxido nítrico, pois a resposta das células musculares lisas aos neurotransmissores inibitórios não é afetada.⁶⁸

Além disso, a disfunção da neurotransmissão NANC no rato diabético pode ser consequência da neuropatia autonómica diabética que afeta principalmente os neurónios nitrérgicos induzindo diminuição da expressão destes, deste modo, diminui a libertação de óxido nítrico, e conseqüentemente, diminui o relaxamento.

No caso da noradrenalina, observou-se uma perda significativa de potência relativamente à situação controlo, determinada quer pela patologia, quer pelo tratamento.

A perda de potência do efeito da noradrenalina com o tratamento pode ser explicada pela sub-regulação da expressão de GLP-IR nos ratos tratados com Liraglutido. Foi demonstrado que o GLP-1 inibe a motilidade espontânea da região proximal do intestino atuando nos GLP-IR e estimulando vias nervosas simpáticas adrenérgicas⁶⁹ o que comprova a existência de uma relação entre o GLP-IR e a ativação do sistema nervoso autonómico simpático no trato gastrintestinal.

Portanto, uma diminuição na expressão do GLP-IR pode resultar numa diminuição da ativação de vias nervosas simpáticas adrenérgicas e conseqüente inibição da ação da noradrenalina, e deste modo, o relaxamento induzido pela NA é inferior nos ratos tratados com Liraglutido.

Relativamente ao efeito da patologia, a noradrenalina foi menos potente nos animais diabéticos, comparando com os animais controlo, o que demonstra que há perda de potência com a diabetes tipo II.

A perda de potência do efeito relaxante da NA com a diabetes tipo II pode ser explicada por uma possível sub-regulação da expressão de recetores beta-adrenérgicos no fundo gástrico isolado de rato, a qual resultaria numa diminuição da ação da noradrenalina e conseqüente diminuição do relaxamento induzido pela NA. A diminuição da população de recetores beta-adrenérgicos foi comprovada em fundo gástrico isolado de rato com diabetes induzida pela estreptozocina.⁷⁰

Finalmente e ainda relativamente aos resultados dos estudos moleculares, a tendência de aumento da expressão do GLP-IR nos ratos GK pode ser explicado pela existência de um mecanismo de compensação, pois neste modelo animal diabético do tipo II não obeso, foi comprovada uma diminuição nos níveis plasmáticos e pós-prandiais de GLP-I (mais uma vez comparando com o rato Wistar).⁷¹

O aumento da expressão do GLP-IR foi já comprovado na mucosa gástrica, mais propriamente nas células parietais e nas células enteroendócrinas, num modelo animal (rato) de diabetes tipo II induzida.⁷² Porém, em indivíduos diabéticos do tipo II foi observado o oposto (redução da expressão do GLP-IR nas glândulas gástricas).¹⁸

Uma possível explicação para a redução da expressão do GLP-IR em fundo gástrico isolado de ratos tratados com Liraglutido, quer Wistar, quer GK, corresponde à internalização do GLP-IR induzida por uma estimulação prolongada por parte do Liraglutido. Este efeito foi já observado em ilhéus pancreáticos de ratinho.⁷³

A internalização do GLP-IR foi também já demonstrada num estudo realizado numa linha celular derivada de células beta-pancreáticas secretoras de insulina de rato (INS-I) tratada com Exenatido e no qual se conclui que este GLP-IRA induzia a dessensibilização do GLP-IR *in vitro*.⁷⁴

Além disso, uma vez que a perda de peso resultante da dieta ou da prática de exercício físico e/ou subsequente à cirurgia bariátrica está associada a um aumento da secreção de GLP-I,⁶⁴ é possível que a perda de peso e a inibição do apetite observada nos ratos tratados com Liraglutido também resulte num aumento dos níveis plasmáticos de GLP-I nestes ratos com consequente diminuição da expressão do GLP-IR (mecanismo de *feedback* negativo).

Por fim, os estudos imunohistoquímicos, com amostras de fundo de estômago isolado de rato, permitiram determinar a localização do recetor do GLP-I nas células parietais das glândulas gástricas, nas células musculares lisas, nas células endoteliais de vasos sanguíneos e nas células ganglionares do plexo nervoso.

Estes resultados estão em concordância com os de outros estudos nos quais foi determinada a expressão do GLP-IR nas células parietais e nas células enteroendócrinas da mucosa gástrica em humano e em rato,^{18,72} e também, em células musculares lisas e em células neuronais do plexo mientérico em estômago de macaco.⁷⁵

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Conclusões e Perspetivas futuras

No nosso estudo, os GLP-IRA, GLP-I e Liraglutido, induziram contração tónica dependente da concentração em fundo de estômago isolado de ratos Wistar e GK pré-contráidos com carbacol, sendo que essa resposta contrátil é parcialmente mediada pelo GLP-IR e é independente da NOS.

A eficácia da resposta contrátil ao GLP-I foi superior em rato diabético (comparado com o rato controlo) o que pode relacionar-se com a tendência para o aumento da expressão do GLP-IR observada em rato GK, promovido pela patologia como mecanismo compensatório, uma vez que já foi comprovada a diminuição dos níveis plasmáticos e pós-prandiais de GLP-I em rato GK (comparado com o rato Wistar).

Com a realização dos estudos *in vivo* nos quais se administrou Liraglutido a ratos Wistar e GK, foi comprovado que este GLP-IRA induziu melhorias no perfil glicémico e lipídico e na sensibilidade periférica à insulina nos animais diabéticos sujeitos ao fármaco, e também, redução da ingestão calórica e perda de peso nos ratos tratados. Portanto, estes resultados são bons indicadores dos efeitos benéficos dos GLP-IRA para o tratamento da diabetes tipo II e da obesidade.

De um modo geral, o tratamento com Liraglutido promoveu diminuição do relaxamento induzido pelo SNP e pela noradrenalina em fundo gástrico isolado de ratos Wistar e GK. A perda de eficácia do efeito do dador de óxido nítrico observada nos ratos tratados pode resultar de um possível efeito do GLP-IRA na diminuição da libertação ou na degradação de óxido nítrico, sendo que um efeito direto sobre a síntese deste neurotransmissor é improvável, uma vez que não foram observadas alterações significativas na expressão da nNOS e da p-nNOS em fundo gástrico isolado de ratos controlo e diabéticos, tratados e não tratados com Liraglutido.

Porém, é possível que os GLP-IRA atuem por via da ativação da eNOS, em detrimento da nNOS. Assim sendo, a redução significativa da expressão do GLP-IR, como foi demonstrada em ambos os modelos animais tratados com Liraglutido, pode resultar numa redução da expressão e/ou ativação da eNOS, o que por sua vez, resultaria numa diminuição da libertação de óxido nítrico e consequente inibição do relaxamento. De facto foi observada imunomarcagem do GLP-IR em células endoteliais de vasos sanguíneos co-localizados no plexo nervoso do estômago isolado de rato, embora não tenham sido observadas alterações significativas na curva CR ao Liraglutido em animais não sujeitos ao

fármaco na presença de L-NNA, um inibidor não seletivo da NOS. No entanto, alterações não significativas na atividade da sintase podem comprometer o efeito relaxante do SNP, como já descrito no sistema cardiovascular.

Ainda relativamente à redução da expressão do GLP-IR em fundo gástrico isolado de ratos tratados com Liraglutido, esta pode ser consequência de uma possível internalização do GLP-IR induzida por uma estimulação prolongada por parte do GLP-IRA. Além disso, também é possível que a perda de peso e a inibição do apetite observada nos ratos tratados com Liraglutido resulte num aumento da secreção de GLP-I e consequente diminuição da expressão de GLP-IR (mecanismo de *feedback* negativo).

A perda de potência do efeito do SNP nos animais diabéticos e tratados com Liraglutido pode ser explicada pela perda de neurónios nitrérgicos consequente da patologia, e deste modo, diminui o relaxamento por diminuição da síntese e libertação de óxido nítrico endógeno. De facto foi observada uma tendência para diminuição da expressão da nNOS e/ou p-nNOS no rato GK (relativamente ao rato Wistar).

No caso da noradrenalina, tanto o tratamento como a patologia determinaram perda de potência do efeito da NA, relativamente à situação controlo. Sendo que a perda de potência da noradrenalina com o tratamento pode relacionar-se com a sub-regulação da expressão do GLP-IR observada nos ratos tratados com Liraglutido, o que por sua vez, pode resultar numa redução da ativação de vias nervosas adrenérgicas. Enquanto a perda de potência da noradrenalina determinada pela patologia pode ser explicada por uma possível sub-regulação da expressão de recetores beta-adrenérgicos em fundo gástrico isolado de rato diabético. Em ambos os casos, a ação da NA estaria diminuída, assim como, o relaxamento induzido por esta.

Por fim, novos estudos são necessários para compreender melhor a real contribuição do óxido nítrico no mecanismo de ação subjacente ao efeito dos GLPI-RA sobre a motilidade gástrica, recorrendo por exemplo a inibidores da sintase do óxido nítrico seletivos para as isoformas neuronal e endotelial, e determinar a expressão da NOS endotelial por Western Blotting em fundo de estômago, de modo a descobrir se existem alterações significativas entre ratos controlo e diabéticos.

Além disso, o uso de animais diabéticos com uma idade mais avançada, ou até mesmo o uso de um outro modelo animal de diabetes tipo II, poderia ajudar a entender melhor as alterações promovidas pela patologia, nomeadamente pela neuropatia autonómica, na motilidade gástrica.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. DRUCKER DJ, N. M. The incretin system: glucagon-like peptide-I receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 368 (2006) 1696–1705.
2. KOOLE, C. et al. Recent advances in understanding GLP-IR (glucagon-like peptide-I receptor) function. *Biochem. Soc. Trans.* 41 (2013) 172–179.
3. MADSBAD, S. Review of head-to-head comparisons of glucagon-like peptide-I receptor agonists. *Diabetes. Obes. Metab.* 18 (2016) 317–32.
4. LIAO, D.-H.; ZHAO, J.-B.; GREGERSEN, H. Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World J. Gastroenterol.* 15 (2009) 169–76.
5. WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* 27 (2003) 201–6.
6. PABREJA, K. et al. Molecular mechanisms underlying physiological and receptor pleiotropic effects mediated by GLP-IR activation. *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 1114–1128.
7. HOLST, J. J. et al. Glucagon-like peptide-I, glucose homeostasis and diabetes. *Trends Mol. Med.* 14 (2008) 161–8.
8. LUND, A.; KNOP, FK.; VILSBØLL, T. Glucagon-like peptide-I receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: differences and similarities. *Eur. J. Intern. Med.* (2014).
9. SAISHO, Y. β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 6 (2015) 109–124.
10. KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present and future. *Lancet*. 383 (2014) 1068–1083.
11. DUARTE, A. I. et al. Crosstalk between diabetes and brain: Glucagon-like peptide-I mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1832 (2013) 527–541.
12. NAUCK, M. A. et al. Secretion of glucagon-like peptide-I (GLP-I) in type 2 diabetes:

What is up, what is down? *Diabetologia*. 54 (2011) 10–18.

13. TASYUREK, H. M. et al. Incretins: Their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 30 (2014) 354–371.
14. CAMPBELL, J. E.; DRUCKER, D. J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab.* 17 (2013) 819–837.
15. DAILEY, M. J.; MORAN, T. H. Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol. Metab.* 24 (2013) 85–91.
16. SARAIVA, F. K. et al. Cardiovascular effects of Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonists. *Cardiovasc. Diabetol.* 13 (2014) 142.
17. ZHONG, J.; RAO, X.; RAJAGOPALAN, S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 226 (2013) 305–314.
18. BROIDE, E. et al. Reduced GLP-1R expression in gastric glands of patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) E1691–5.
19. JANSSEN, P. et al. Review article: A comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37 (2013) 18–36.
20. MARATHE, C. S. et al. Effects of GLP-1 and incretin-based therapies on gastrointestinal motor function. *Exp. Diabetes Res.* (2011).
21. SANDERS, K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol. Motil.* 20 Suppl 1 (2008) 39–53.
22. BITAR, K. Function of gastrointestinal smooth muscle: from signaling to contractile proteins. *Am. J. Med.* 115 (2003) 15–23.
23. OLSSON, C.; HOLMGREN, S. Autonomic control of gut motility: a comparative view. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 165 (2011) 80–101.
24. ANDREWS, C. N. et al. Nitrergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (2007) G1359–65.
25. BUCINSKAITE, V. et al. Receptor-mediated activation of gastric vagal afferents by glucagon-like peptide-1 in the rat. *Neurogastroenterol. Motil.* 21 (2009) 978–e78 .
26. FUJIMIYA, M.; INUI, A. Peptidergic regulation of gastrointestinal motility in rodents.

- Peptides. 21 (2000) 1565–1582.
27. YARANDI, S. S.; SRINIVASAN, S. Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: current status and future directions. *Neurogastroenterol. Motil.* 26 (2014) 611–24.
 28. KIM, J. H. et al. Diabetic factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with type 2 diabetes. *World J Gastroenterol.* 16 (2010) 1782–1787.
 29. CHAIKOMIN, R. et al. Upper gastrointestinal function and glycemic control in diabetes mellitus. *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 5611–5621.
 30. ZHAO, J. et al. Upper gastrointestinal sensory-motor dysfunction in diabetes mellitus. *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 2846–57.
 31. CHIU, Y.-C. et al. Decreased Gastric Motility in Type II Diabetic Patients. *Biomed Res. Int.* (2014).
 32. STACHER, G. Diabetes mellitus and the stomach. *Diabetologia* 44 (2001) 1080–93.
 33. KASHYAP, P.; FARRUGIA, G. Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. *Neurogastroenterol. Motil.* 23 (2011) 111–114.
 34. LU, H.-L. et al. Gastric nNOS reduction accompanied by natriuretic peptides signaling pathway upregulation in diabetic mice. *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 4626–35.
 35. SCHIRRA, J. et al. GLP-1 regulates gastroduodenal motility involving cholinergic pathways. *Neurogastroenterol. Motil.* 21 (2009) 609–18.
 36. ROTONDO, A. et al. Glucagon-like peptide-1 relaxes gastric antrum through nitric oxide in mice. *Peptides.* 32 (2011) 60–64.
 37. AMATO, A. et al. Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol. Motil.* 22 (2010) 664–e203.
 38. AMATO, A. et al. Exogenous glucagon-like peptide 1 reduces contractions in human colon circular muscle. *J. Endocrinol.* 221 (2014) 29–37.
 39. HOLMES, G. M. et al. Vagally mediated effects of glucagon-like peptide 1: *in vitro* and *in vivo* gastric actions. *J. Physiol.* 587 (2009) 4749–4759.
 40. IMERYÜZ, N. et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am. J. Physiol.* 273 (1997) G920–G927.
 41. GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Production of spontaneous diabetic rats by

- repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.* 119 (1976) 85–90.
42. REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 22 (2005) 359–370.
 43. RIAZI-FARZAD, B.; NICHOLLS, P. J. .; SEWELL, R. D. Sensitivity differences to 5-HT and carbachol in subsections of the isolated rat stomach fundus strip: an improved preparation. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 35 (1996) 217–221.
 44. VANE, J. R. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 12 (1957) 344–9.
 45. ROCHA, B. S. et al. Ethyl nitrite is produced in the human stomach from dietary nitrate and ethanol, releasing nitric oxide at physiological pH: potential impact on gastric motility. *Free Radic. Biol. Med.* 82 (2015) 160–6.
 46. STURIS, J. et al. GLP-I derivative liraglutide in rats with b -cell deficiencies : influence of metabolic state on b -cell mass dynamics. *Br. J Pharmacol.* 140 (2003) 123–132.
 47. NAGAKUBO, D. et al. Prophylactic Effects of the Glucagon-Like Peptide-I Analog Liraglutide on Hyperglycemia in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Associated with Chronic Pancreatitis and Obesity. *Comparative Medicine.* 64 (2014) 121–127.
 48. MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 305–21.
 49. JOHNSON, M. et al. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 (2006) 18–24.
 50. AMATO, a et al. Peripheral motor action of glucagon-like peptide-I through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol. Motil.* 22 (2010) 664–e203.
 51. BOSE, A. K. et al. Glucagon-like peptide I can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes.* 54 (2005) 146–51.
 52. BAN, K. et al. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide I receptor are mediated through both glucagon-like peptide I receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation.* 117 (2008) 2340–50.
 53. NIKOLAIDIS, L. A. et al. Recombinant glucagon-like peptide-I increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 110 (2004) 955–61 .
 54. LØNBORG, J. et al. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment

- elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 33 (2012) 1491–9.
55. HATTORI, A. et al. Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors as markers of left ventricular systolic dysfunction: a cross-sectional study. *BMJ Open* (2013).
 56. IWASA, M. et al. Antidiabetic drug voglibose is protective against ischemia-reperfusion injury through glucagon-like peptide 1 receptors and the phosphoinositide 3-kinase-Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55 (2010) 625–34.
 57. IWASA, M. et al. Both stimulation of GLP-1 receptors and inhibition of glycogenolysis additively contribute to a protective effect of oral miglitol against ischaemia-reperfusion injury in rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 119–31.
 58. BHASHYAM, S. et al. Glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake via p38alpha MAP kinase-mediated, nitric oxide-dependent mechanisms in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail.* 3 (2010) 512–21.
 59. GRIEVE, D. J.; CASSIDY, R. S.; GREEN, B. D. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 1340–51.
 60. SHAH, Z. et al. Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascul. Pharmacol.* 55 (2011) 2–9.
 61. GRIDER, J. R.; MURTHY, K. S. Autoinhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in gut smooth muscle by nitric oxide. *Regul. Pept.* 151 (2008) 75–9.
 62. MASHIMO, H. et al. Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 8–13.
 63. LARSEN, P. J. et al. Systemic Administration of the Long-Acting GLP-1 Derivative NN2211 Induces Lasting and Reversible Weight Loss in Both Normal and Obese Rats. *Diabetes.* 50 (2001) 1–10.
 64. HOLST, J. J. Incretin hormones and the satiation signal. *Int. J. Obes.* 37 (2013) 1161–1168.
 65. SISLEY, S. et al. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 2456–2463.
 66. DING, L.; ZHANG, J. Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide

synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (2012) 75–81.

67. LEFEBVRE, R. A.; BAERT, E.; BARBIER, A. J. Influence of N^G-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* 106 (1992) 173–9.
68. JENKINSON, K. M.; REID, J. J. Effect of diabetes on relaxations to non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation in longitudinal muscle of the rat gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* 116 (1995) 1551–6.
69. GIRALT, M.; VERGARA, P. Sympathetic pathways mediate GLP-1 actions in the gastrointestinal tract of the rat. *Regul. Pept.* 74 (1998) 19–25.
70. SAKAI, Y. et al. Relations between contractile responses and beta-adrenoceptors in gastric fundus of diabetic rats. *Life Sci.* 48 (1991) 1043–9.
71. EICKHOFF, H. et al. Amelioration of glycemic control by sleeve gastrectomy and gastric bypass in a lean animal model of type 2 diabetes: restoration of gut hormone profile. *Obes. Surg.* 25 (2015) 7–18.
72. BLOCH, O. et al. Nutrient induced type 2 and chemical induced type 1 experimental diabetes differently modulate gastric GLP-1 receptor expression. *J. Diabetes Res.* (2015).
73. ROED, S. N. et al. Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382 (2014) 938–949.
74. BAGGIO, L. L.; KIM, J.-G.; DRUCKER, D. J. Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization *in vitro* but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis *in vivo*. *Diabetes.* 53 Suppl 3 (2004) S205–14.
75. PYKE, C. et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology.* 155 (2014) 1280–90.