

Carlota Sofia Ferreira de Nóbrega

Efeitos Vasculares do Agonista do Recetor *Glucagon-like peptide I*, Liraglutido, num Modelo Animal de Diabetes Tipo I

Dissertação para obtenção ao grau de Mestre em Farmacologia Aplicada sob a orientação da Professora Doutora Sónia Silva e co-orientação do Doutor Francisco Ambrósio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Efeitos Vasculares do Agonista do Recetor *Glucagon-like Peptide I*, Liraglutido, num Modelo Animal de Diabetes Tipo I

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 grupo de Farmacologia e Cuidados Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia, da Universidade de Coimbra e Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, e do Doutor Francisco Ambrósio do Laboratório de Disfunção da Retina e Neuroinflamação, do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Setembro 2017

Imagem capa adaptada a partir de: http://img.colorirgratis.com/duas-seringas-para-dar-in_4e09b0b460747-p.gif

Imagem capa adaptada a partir de: <http://www.midisegni.it/disegni/fauna/topolino.gif>

Imagem de capa: Registo representativo de uma curva concentração resposta ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar, após pré-contracção com 10 μ M de Noradrenalina (Pág. 53).

Realizada por: C. Nóbrega, B. Martins e S. Silva.



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



O trabalho experimental descrito na presente tese foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (*Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences – IBILI*), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal.

O suporte financeiro foi garantido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (PEst-UID/NEU/04539/2013), e FEDER-COMPETE (FCOMP-01-0124-FEDER-028417 e POCI-01-0145-FEDER-007440)



“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning”

Albert Einstein

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora Professora Doutora Sónia Silva Santos, por me ter acolhido como sua orientanda, pelos conhecimentos e ensinamentos técnico-científicos transmitidos, pelos seus conselhos, pela sua disponibilidade, pelo seu apoio e pela sua amizade, o meu muito obrigada.

Quero também agradecer ao meu co-orientador Doutor Francisco Ambrósio, pois sem ele, este projeto não seria possível, e agradecer-lhe pelos ensinamentos técnico-científicos que me foram transmitidos através do seu grupo de investigação.

Agradeço também ao Professor Doutor Carlos Fontes Ribeiro, Diretor do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina, IBILI, Universidade de Coimbra, a oportunidade da realização do trabalho experimental conducente à minha tese de dissertação de mestrado, e ao Doutor Paulo Matafome do Laboratório de Fisiologia, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, ao Doutor Flávio Reis e à Doutora Sofia Viana do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, à Professora Doutora Lina Carvalho e à Lia Neves do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, à Edna Soares, ao Ricardo Leitão, à Sara Nunes e à Catarina Neves, pelos ensinamentos técnico-científicos, pelo tempo despendido na ajuda prestada a este projeto, nas respectivas áreas.

Quero agradecer às minhas colegas de laboratório, Catarina Guerra, Ema Fonseca, por toda ajuda que me deram e por estarem ao meu lado quando o cansaço já falava mais alto e, um especial obrigado à Beatriz Martins, pela ajuda, pelos conselhos, pela amizade, pela paciência para me ouvir e sobretudo por me acalmar quando o *stress* se apoderava de mim.

Um obrigado do tamanho do mundo aos meus pais, Vasco Nóbrega e Fátima Nóbrega, que partilharam as minhas dores, que se preocuparam comigo constantemente, pela vossa ajuda incondicional e sobretudo por acreditarem em mim quando já nem eu o fazia.

Agradeço também à minha restante família pelo interesse, preocupação e confiança que depositaram em mim.

Aos meus amigos de faculdade e não só, que me apoiaram querendo sempre saber como estava e demonstrando-se sempre disponíveis para me ajudar, e pelos conselhos dados.

E por fim, um obrigado muito grande ao meu namorado Pedro Ribeiro, que abdicou do seu tempo livre para me ajudar, que foi incondicional e que esteve sempre ao meu lado nos momentos mais complicados. Obrigado por dizeres que eu conseguia.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	ix
Resumo	xiii
Abstract	xv
I. Introdução	I
<i>Diabetes Mellitus</i>	3
<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo I.....	4
Via de sinalização da insulina e a DM.....	6
Disfunção endotelial.....	9
Óxido Nítrico Sintetase (eNOS).....	11
Óxido Nítrico (NO).....	13
Células Progenitoras Endoteliais (EPCs).....	13
<i>Glucagon-like peptide I</i> , Recetor, Localização e Vias de sinalização.....	14
<i>Glucagon-like peptide I</i> (GLP-I).....	14
Recetor do <i>glucagon-like peptide I</i> (GLP-IR).....	15
Mecanismos de ação.....	15
Sistema cardiovascular.....	18
Agonistas do GLP-IR: Liraglutido.....	23
2. Objetivos	29
3. Material e Métodos	33
Estudo <i>in vivo</i>	35
Modelo animal.....	35
Parâmetros Bioquímicos.....	35
Estudo <i>in vitro</i>	36
Preparação dos órgãos.....	36
Protocolo Experimental - Estudos Funcionais para avaliação do efeito do tratamento com Liraglutido.....	37
Protocolo experimental - Estudos funcionais para caracterização da resposta contrátil ao Liraglutido.....	38
Reagentes e fármacos utilizados nos estudos funcionais.....	39
Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais.....	39
Estudos moleculares.....	40

Preparação de lisados para <i>Western Blotting</i>	40
Protocolo experimental de determinação da densidade de GLP-IR, eNOS, eNOSp, recetor da insulina, e recetor de insulina fosforilado por <i>Western Blotting</i>	41
Análise estatística dos resultados obtidos na técnica <i>Western Blotting</i>	42
Reagentes e Soluções usados na técnica <i>Western Blotting</i>	43
Protocolo experimental de determinação da localização celular do GLP-IR por Imunohistoquímica	44
4.Resultados	45
Resultados do estudo <i>in vivo</i>	47
Caracterização do modelo animal de DTI induzida	47
Estudo da resposta vasorrelaxante à ACh da aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI tratados com Liraglutido.	49
Efeito do L-NAME na resposta vasorrelaxante à ACh da aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI tratados com Liraglutido	51
Resultados do estudo <i>in vitro</i>	52
Caracterização da resposta contrátil da aorta isolada de rato ao Liraglutido	52
Dados demográficos e bioquímicos dos animais Wistar e DTI não sujeitos a tratamento	52
Efeito do L-NAME na resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar	52
Efeito do Exendin-3 na resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI	53
Efeito da insulina na resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI	54
Caracterização farmacológica das respostas contrácteis de aortas isoladas de ratos Wistar e ratos DTI ao Liraglutido e à insulina	56
Efeito do Liraglutido na resposta vasorrelaxante à ACh em aorta isolada de rato Wistar e rato DTI.....	57
Resultados bioquímicos da densidade dos recetores.....	58
Localização celular do GLP-IR através de estudos imunohistoquímicos em aortas isoladas de ratos Wistar e ratos DTI	63
5.Discussão	67
6.Conclusão e Perspetivas Futuras	77
7.Bibliografia	81

Lista de Abreviaturas

a	Número de anéis de aorta
ACh	Acetilcolina (<i>Acetylcholine</i>)
ADMA	Dimetilarginina assimétrica (<i>Asymmetric Dimethylarginine</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato (<i>Adenosine Diphosphate</i>)
AGE	Produtos finais de glicação avançada (<i>Advanced Glycation End Products</i>)
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico (<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
Anti-GAD	Anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BCL-2	<i>β-Cell Lymphoma 2</i>
BH4	Tetrahydrobiopterina (<i>Tetrahydrobiopterin</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD11	<i>Cluster of Differentiation 11</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CR	Concentração-Resposta
CREB	<i>cAMP Response Element Binding Protein</i>
DDHA	Dimetilarginina dimetilamino-hidrolase (<i>Dimethylarginine Dimethylamino-hydrolase</i>)
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus Tipo 1</i>
DMT2	<i>Diabetes Mellitus Tipo 2</i>
DOCA	Deoxicorticosterona
DPP-4	<i>Dipeptidil Peptidase 4</i>
DTI	<i>Diabetes Tipo 1</i>
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio (<i>Endothelium Derived Relaxing Factor</i>)
E_{máx}	Efeito máximo
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
EPCs	Células progenitoras endoteliais (<i>Endothelial Progenitor Cells</i>)
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>)
ERSD	Doença renal em estadio terminal (<i>End Stage Renal Disease</i>)
ET-1	Endotelina-1 (<i>Endothelin-1</i>)
Ex-3	Exendin-3
FELASA	Federação de Associações de Ciências em Animais de Laboratório
FMN	Mononucleótido de flavina (<i>Flavine Mononucleotide</i>)
foxO	<i>Forkhead box protein O</i>

GC	Guanilciclase (<i>Guanylyl Cyclase C</i>)
GDP	Guanosina difosfato (<i>Guanosine Diphosphate</i>)
GIP	<i>Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide</i>
GK	Goto-Kakisaki
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
GLP-1R	<i>Glucagon-like Peptide 1 Receptor</i>
GLP-1RA	<i>Glucagon-like Peptide Receptor Agonist</i>
GLP-2	<i>Glucagon-like Peptide 2</i>
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico (<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>)
GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine Triphosphate</i>)
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HE	Hematoxilina/Eosina
IA2 e IA2β	Anticorpos anti-tirosina fosfatases
IAA	Anticorpos anti-insulina
ICA	Anticorpos anti-ilhéus
IR	Recetor da insulina (<i>Insulin Receptor</i>)
IRS	Substrato do recetor de insulina (<i>Insulin Receptor Substrate</i>)
LDH	Lactato desidrogenase (<i>Lactate Dehydrogenase</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
L-NAME	<i>L-N^G-Nitroarginine Methyl Ester</i>
L-NNA	<i>N^G-nitro-L-arginina (N^G-Nitro-L-Arginine)</i>
MAPK	Proteína cinase ativada pelo Mitogénio (<i>Mitogen-Activated Protein kinase</i>)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant protein-1</i>
MEK	Proteína-cinase-cinase ativada pelo Mitogénio
mRNA	Ácido ribonucleíco mensageiro
n	Número de animais
NA	Noradrenalina (<i>Noradrenaline</i>)
NADPH-oxidase/NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase</i>)
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Sintase do óxido nítrico (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
ORBEA	Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal
PDK1	Fosfatidilinositol dependente de cinase-1 (<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase-1</i>)
PDX-1	<i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1</i>
pEC₅₀	Logaritmo negativo da concentração molar de agonista necessária para a indução de 50% da resposta máxima

PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (<i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>)
PIP	Fosfatidilinositol-3-fosfato (<i>Phosphoinositide-3-Phosphate</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol-3,4-difosfato (<i>Phosphoinositide-3,4-Diphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (<i>Phosphoinositide-3,4,5-Triphosphate</i>)
PKA	Proteína cinase A (<i>Protein Kinase A</i>)
PKB/Akt	Proteína cinase B (<i>Protein Kinase B</i>)
ROS	Espécies reativas e oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SOD	Superóxido dismutase (<i>Superoxide Dismutase</i>)
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
STZ	Estreptozotocina (<i>Streptozotocin</i>)
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo (<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>)

Lista de Tabelas

Tabela 1	Anticorpos utilizados na técnica de <i>Western Blotting</i> , peso molecular da proteína, a diluição utilizada e o fabricante ao qual o anticorpo foi encomendado.	43
Tabela 2	Avaliação e comparação do perfil bioquímico de ratos Wistar e ratos diabéticos tipo I (STZ) tratados e não tratados com Liraglutido: WC, Ratos Wistar controlo; WL, Ratos Wistar tratados com Liraglutido; W-STZ, Ratos Wistar diabéticos tipo I e WL-STZ, Ratos Wistar diabéticos tipo I tratados com Liraglutido (200 µg/Kg, 2x/dia). Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. $P < 0,05$; * vs. WC; § vs. WL.	48
Tabela 3	Valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} para a ACh em aorta isolada de ratos Wistar controlo (WC), ratos Wistar controlo tratados com Liraglutido (WL), ratos Wistar diabéticos tipo I (W-STZ) e ratos Wistar diabéticos tipo I tratados com Liraglutido (WL-STZ). $E_{máx}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pela noradrenalina (NA); pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de ACh necessária para induzir 50% da resposta máxima. A coluna a/n representa o quociente entre o número de anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se retiraram os anéis. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M e as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; * vs. WC; § vs. WL.	50
Tabela 4	Dados demográficos e bioquímicos dos grupos de animais não sujeitos a tratamento: WC, ratos Wistar controlo; W-STZ, ratos Wistar diabéticos tipo I. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M.; n=10-13 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste <i>t</i> -Student. * $P < 0,05$ vs. WC.	52
Tabela 5	Valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} para o Liraglutido e insulina em aortas isoladas de ratos Wistar controlos e ratos Wistar diabéticos tipo I não sujeitos a tratamento <i>in vivo</i> . O valor de $E_{máx}$ traduz o máximo de contração em mN de tensão, enquanto que o valor de pEC_{50} traduz o logaritmo negativo da concentração molar do agonista necessária a induzir 50% da resposta máxima. A coluna a/n representa o quociente entre os anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se retiraram os anéis. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste <i>t</i> -Student. $P < 0,05$; *vs. WC.	57
Tabela 6	Valores de $E_{máx}$ para a ACh na presença e na ausência de pré-incubação com 1 µM de Liraglutido em aortas isoladas de ratos Wistar controlos e ratos Wistar diabéticos tipo I não sujeitos a tratamento <i>in vivo</i> . O valor de $E_{máx}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pela noradrenalina (NA) A coluna a/n representa o quociente entre o número de anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se retiraram os anéis. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M e as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas.	58

Lista de Figuras

Fig. 1	Complicações associadas à diabetes numa população de 10,000 indivíduos adultos diagnosticados com diabetes entre o ano de 1990 e 2010. (ESRD: End Stage Renal Disease, Doença renal em estadió terminal). Adaptado de: (Schatz, 2016).	4
Fig. 2	Comparação de um indivíduo saudável e um indivíduo com diabetes tipo I, com a representação esquemática da perda de células β pancreáticas. Adaptado de e disponível em: www.eurostemcell.org/diabetes-how-could-stem-cells-help .	5
Fig. 3	Esquema da entrada de glicose para a célula, representação do fecho dos canais de potássio com conseqüente despolarização da membrana, permitindo a entrada de cálcio para a célula e libertação de insulina por exocitose. Disponível em: www.medicinageriatrica.com.br/tag/insulina .	6
Fig. 4	Representação das vias de sinalização da insulina. A via de sinalização PI3K que regula a produção de NO, promovendo o vasorrelaxamento e inibição da adesão celular, e a via de sinalização MAPK que contribui para a produção de ET-1, promovendo a vasoconstrição, proliferação celular e adesão molecular. Quando estas vias funcionam corretamente mantem-se o equilíbrio. (PI3K, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> , fosfotdilinositol-3-cinase; MAPK, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> , proteína-cinase ativada pelo mitogénio; ET-1, <i>Endothelin-1</i> , endotelina-1) Adaptado de: (Muniyappa e Sowers, 2013).	7
Fig. 5	Balanço oxidação/redução das células endoteliais. A) Endotélio sob condições fisiológicas: existe produção de NO, assim como de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente o anião superóxido (O_2^-), que neste caso reage com a superóxido dismutase (<i>Superoxide Dismutase</i> , SOD) originando peróxido de hidrogénio (H_2O_2), mantendo o balanço redox na célula. B) Disfunção endotelial: sob condições patológicas ocorre uma disfunção dos fatores, que vão concorrer para a diminuição da biodisponibilidade do NO, por vários mecanismos. Através do stress oxidativo, ocorre a diminuição da biodisponibilidade de co-fatores, tais como, a tetraidrbiópteroína (<i>Tetrahydrobiopterin</i> , BH_4) e o mononucleótido de flavina (<i>Flavine Mononucleotide</i> , FMN) aumentando os níveis intracelulares da dimetilarginina assimétrica (<i>Asymmetric Dimethylarginine</i> , ADMA) que por sua vez, contribuem para o desacoplamento da eNOS gerando O_2^- ao invés de NO. A atividade da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase</i> , NADPH-oxidase) também está aumentada, resultando numa reação entre a produção de NO e O_2^- mais rápida do que a reação com a SOD. Deste modo origina peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de oxigénio, que produz lesões celulares, nitrosilação proteica, peroxidação lipídica e fragmentação do ADN. Adaptado de: (Potenza <i>et al.</i> , 2009).	10
Fig. 6	Via de sinalização e ativação da eNOS no estado fisiológico. A ativação da eNOS leva à produção NO, que por sua vez é um fator importante envolvido tanto no vasorrelaxamento como também no recrutamento de EPCs a partir da medula óssea. Adaptado de: (Duda, Fukumura e Jain, 2004).	11
Fig. 7	Representação da acção do GLP-1 nas células β pancreáticas e dos seus efeitos proliferativos e anti-apoptóticos. Adaptado de: (Pabreja <i>et al.</i> , 2014).	16
Fig. 8	Representação esquemática da distribuição do GLP-1R e os efeitos fisiológicos a nível cardiovascular, tais como o aumento da entrada de glicose, diminuição da apoptose e aumento da viabilidade, vasodilatação e diminuição da inflamação. A nível sistémico a redução das lesões por aterosclerose, diminuição da pressão sanguínea, melhoria no metabolismo da glicose e perda de peso. Adaptado de: (Kang e Jung, 2016).	18
Fig. 9	O estado hiperglicémico em conjunto com as alterações metabólicas e bioquímicas, promovem um desequilíbrio metabólico, contribuindo desta forma para o aparecimento de doenças secundárias cardiovasculares que quando não tratadas podem progredir levando à morte dos indivíduos.	19

Fig. 10	Mecanismos que podem exercer efeitos cardiovasculares. Via dependente da ligação do GLP-I ao recetor, e via independente do recetor que envolve o metabolito GLP-I(9-36). Adaptado de: (Advani, Bugyei-Twum e Connelly, 2013).	21
Fig. 11	Esquema dos fármacos em comercialização, utilizados na terapêutica baseada nas incretinas.	24
Fig. 12	Comparação da estrutura do GLP-I endógeno e do Liraglutido Adaptado de: (Sjöholm e Åke, 2010).	25
Fig. 13	A) O GLP-I está a ser rapidamente degradado pela DPP-4 em GLP-I (9-36)-amida. B) Os GLP-IRA são resistentes à degradação pela DPP-4 contribuindo diretamente para a estimulação do GLP-IR Adaptado de: (Burgmaier, Heinrich e Marx, 2013).	26
Fig. 14	Protocolo experimental do estudo <i>in vivo</i> .	36
Fig. 15	Comparação da perda de peso no final do tratamento com Liraglutido: WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido; W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido (200 µg/Kg, 2x/dia). Os resultados estão expressos como média ± S.E.M. de 8-9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M.; as diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; * vs. WC; § vs. WL; # vs. W-STZ.	48
Fig. 16	Relaxamento induzido pela ACh (em % de inibição da contração induzida pela NA) em anéis de aorta isolada de ratos Wistar e DTI tratados e não tratados com Liraglutido; WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 µg/Kg, 2x/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. Os resultados estão expressos como média ± S.E.M. do número de experiências indicado na Tabela 4, sendo que as barras verticais representam o S.E.M..	50
Fig. 17	Resposta vasorrelaxante da aorta isolada de ratos WC, WL, W-STZ e WL-STZ à Acetilcolina na ausência e na presença de 250 µM de L-NAME. Os resultados encontram-se expressos em médias ± S.E.M. de 9-10 experiências por grupo; as barras verticais representam S.E.M. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste <i>t</i> -Student. * $P < 0,05$ vs. ACh.	51
Fig. 18	Registo representativo de uma curva concentração-resposta ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar, após pré-contração com 10 µM Noradrenalina.	53
Fig. 19	Resposta contrátil da aorta isolada de ratos Wistar controlo ao Liraglutido, na presença e ausência de L-NAME (250 µM). Os resultados encontram-se expressos em valores médios ± S.E.M. de 4 experiências, sendo que as barras verticais representam o S.E.M..	53
Fig. 20	Comparação da resposta contrátil da aorta isolada de rato Wistar controlo (a) e Wistar diabético tipo I (b) ao Liraglutido na presença e ausência de (300nM) de Exendin-3. Os resultados encontram-se expressos em valores médios ± S.E.M. de 7 a 15 experiências para (a) e de 8 a 11 experiências para (b) sendo que as barras verticais representam S.E.M. e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste <i>t</i> -Student. $P < 0,05$; * vs. Liraglutido.	54
Fig. 21	Comparação da resposta contrátil da aorta isolada de rato Wistar controlo (a) e diabético tipo I (b) ao Liraglutido na presença e ausência de 10µUI/mL de insulina. Os resultados encontram-se expressos em valores médios ± S.E.M. de 9 a 15 experiências para (a) e de 11 experiências para (b), sendo que as barras verticais representam S.E.M. e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste <i>t</i> -Student. $P < 0,05$; * vs. Liraglutido.	55
Fig. 22	Registo representativo de uma curva concentração-resposta à insulina em aorta isolada de rato Wistar, após pré-contração com Noradrenalina.	56
Fig. 23	Registo representativo de uma curva concentração-resposta à Acetilcolina na aorta isolada de rato Wistar, após pré-contração com Noradrenalina.	57
Fig. 24	Comparação da resposta vasorrelaxante da aorta isolada de rato Wistar e rato diabético tipo I à ACh, na presença e ausência de 1 µM de Liraglutido. Os	58

	resultados encontram-se expressos em valores médios \pm S.E.M., de 8 a 10 experiências, sendo que as barras verticais representam S.E.M.; as diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$, * vs. WC + Liraglutido.	
Fig. 25	Comparação da densidade do GLP-IR na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo). As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; * vs. WC + Liraglutido.	59
Fig. 26	Comparação da densidade da enzima eNOS na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).	60
Fig. 27	Comparação da densidade da enzima eNOSp na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).	60
Fig. 28	Comparação dos níveis proteicos de eNOS ativa, através da razão eNOSp/eNOS na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).	61
Fig. 29	Comparação da densidade do recetor da insulina (I $r\beta$) na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo). As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; § vs. WL.	62
Fig. 30	Comparação da densidade do IR-p na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).	62
Fig. 31	Comparação dos níveis proteicos de IR ativo, através da razão IR-p/I $r\beta$, na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. Os	63

resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).

Fig. 32 Visualização da micro-anatomia de aorta isolada de ratos Wistar controlo e diabéticos tipo I pela técnica HE. (a) Corte histológico representativo de aorta de ratos Wistar controlo; (b, c e d) cortes histológicos representativos de aorta de ratos diabéticos tipo I. (1) Duplicação das fibras elásticas; (2) alterações da densidade da matriz; (3) redução do número de camadas de fibras elásticas e (4) espessamento da membrana basal dos vasa vasorum. **64**

Fig. 33 Localização celular do GLP-1R em aorta isolada de ratos Wistar controlo e diabéticos tipo I por imunohistoquímica. (a) refere-se ao corte histológico de aorta isolada de ratos Wistar controlo e (b) ao corte de histológico de ratos diabéticos tipo I, com imunomarcção a castanho do GLP-1R. **65**

Resumo

O *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) é uma hormona crucial que se liga ao seu recetor (GLP-IR) e desempenha inúmeras funções benéficas no organismo, tendo como principal função potenciar a secreção de insulina ao nível das células β pancreáticas, induzida pela entrada de nutrientes (“efeito incretina”). Deste modo, os agonistas do GLP-IR (GLP-IRAs) correspondem a um dos principais grupos terapêuticos para o tratamento da DMT2, como é o caso do Liraglutido, uma vez que, para além da promoção da secreção de insulina, também aumentam a proliferação e diminuem a taxa apoptótica das células β dos ilhéus de Langerhans, e exibem ações positivas no sistema cardiovascular.

A DMT1 ocorre quando o pâncreas é incapaz de produzir insulina ou a produz em baixa quantidade, devido á inexistência total ou parcial de células β , respetivamente, contribuindo para a manutenção de um estado de hiperglicemia crónico, que tem como consequência diversos efeitos colaterais, principalmente a disfunção endotelial e consequente aparecimento de doenças cardiovasculares. Assim, é sugerida a aplicação de GLP-IRAs na terapêutica da DMT1, conjuntamente com a insulina, devido aos seus possíveis efeitos benéficos a nível cardiovascular.

O objetivo principal deste estudo consistiu em avaliar o efeito do Liraglutido (Victoza[®]) em aorta isolada de rato Wistar e de que forma este efeito está alterado na presença da DMT1.

Para tal, induziu-se DMT1 com *Streptozotocina* (STZ) em ratos Wistar machos com 12 semanas de idade, através de uma injeção intraperitoneal única (65 mg/Kg em 10 mM de tampão citrato, pH 4,5). Às 14 semanas, os animais foram divididos em quatro grupos: dois grupos controlo, um sujeito ao tratamento com o Liraglutido (200 μ g/kg X2/dia) e outro não; e dois grupos diabéticos nas mesmas condições que os grupos anteriores. Ao fim de 2 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados, para a realização de estudos funcionais de reatividade vascular em banho de órgãos com miógrafo de pressão, e estudos bioquímicos.

Nos estudos *in vivo* a ACh induziu um relaxamento que era praticamente abolido na presença de Éster Metílico de N^G-Nitro-L-arginina (L-NAME), verificando-se que o endotélio se encontrava funcional e que o relaxamento era NO-dependente. Para além disso, foi demonstrado também que o Liraglutido afetava a resposta vasodilatadora da ACh.

Para a caracterização farmacológica do Liraglutido foram realizados ensaios na presença do fármaco, com pré-incubação de L-NAME, Exendin-3 (Ex-3) e insulina. Verificou-

se que o Liraglutido tinha uma ação contrátil NO-independente, verificada pela não alteração da resposta na presença de L-NAME; esta ação é parcialmente mediada pelo GLP-IR, uma vez que a presença de Ex-3 no grupo controlo, levou a uma diminuição da resposta contrátil do fármaco, no entanto, no grupo diabético o mesmo não foi verificado. A presença de insulina no grupo controlo levou à diminuição da potência da contração induzida pelo Liraglutido, enquanto que, no grupo diabético observou-se uma tendência para o aumento da contração máxima ao Liraglutido. Avaliou-se por fim o efeito do Liraglutido e da insulina individualmente, verificando-se que os dois fármacos induzem contração, estando esta aumentada nos animais diabéticos.

Para estudar os mecanismos subjacentes aos resultados obtidos pelos estudos funcionais, foram realizados estudos bioquímicos, nomeadamente a técnica de *Western Blotting* que permitiu quantificar a densidade do GLP-IR, da eNOSp/eNOS e do recetor da insulina (IRp/IRβ). O GLP-IR apresentou-se diminuído no grupo diabético não sujeito a tratamento, no entanto, nos animais diabéticos tratados com o Liraglutido a densidade encontrava-se aumentada, com diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) comparativamente ao primeiro grupo. Relativamente à eNOS e à sua forma fosforilada não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos, no entanto, o grupo controlo tratado com Liraglutido apresentou uma tendência para o aumento da forma fosforilada da proteína. Relativamente à quantificação da densidade do IR, ambas as formas do recetor estão diminuídas na presença da patologia, e o tratamento com o Liraglutido no grupo controlo demonstrou tendência para o comprometimento da forma ativa do recetor.

Recorrendo à histoquímica, foi possível detetar modificações no tecido aórtico no grupo diabético, uma vez que se verificaram alterações matriciais e desorganização do tecido. Quanto à marcação do GLP-IR por imunohistoquímica, constatou-se que existia uma distribuição heterogénea dentro de cada grupo e uma diminuição da marcação nos animais diabéticos relativamente aos animais controlo.

Com base neste estudo, concluímos que ambos os fármacos induzem contração a nível cardiovascular, sendo que a contração do Liraglutido é NO-independente e é parcialmente mediada pela sua ligação ao recetor (GLP-IR). Assim, uma terapia conjunta de insulina e Liraglutido poderá ser benéfica no tratamento da DMTI num estadio inicial, mas possivelmente não será a mais indicada para doentes com histórico clínico cardiovascular.

Palavras chave: Diabetes *Mellitus* Tipo I, GLP-I, GLP-IRA, Liraglutido, Doenças Cardiovasculares.

Abstract

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is a crucial hormone that binds to its receptor (GLP-1R) and plays several beneficial roles, being its main function potentiating insulin secretion in pancreatic β cells, induced by the entry of nutrients ("incretin effect"). Thus, GLP-1R agonists (GLP-1RAs), such as Liraglutide, correspond to one of the main therapeutic groups for the treatment of DM2, since, in addition to insulin secretion, they also promote the increase of proliferation and the decrease of the apoptotic rate of β cells of the islets of Langerhans, and exhibit positive actions in the cardiovascular system.

DM1 occurs when the pancreas is completely unable to produce insulin or produces it in low quantity, due to the total or partial absence of β cells, respectively, contributing to the maintenance of the chronic hyperglycemic state, which has as consequence several side effects, mainly endothelial dysfunction and consequently the onset of cardiovascular diseases. Therefore, the application of GLP-1RAs to DM1 therapy, combined with insulin, is suggested because of its possible beneficial effects at cardiovascular level.

The main objective of this study was to evaluate the effect of Liraglutide (Victoza[®]) in Wistar rat isolated aorta and how this effect is altered in the presence of DM1.

For this, DM1 was induced with *Streptozotocin* (STZ) in male Wistar rats at 12 weeks of age, by single intraperitoneal injection (65 mg/kg in 10 mM citrate buffer, pH 4.5). At 14 weeks, the animals were divided into four groups: two control groups, one group subject to treatment with Liraglutide (200 μ g/kg \times 2/day) and another not; and two diabetic groups under the same conditions as the control groups. After 2 weeks of treatment, the animals were sacrificed for the realization of functional studies of vascular reactivity in organ bath with pressure myograph, and biochemical studies.

In the *in vivo* studies, the ACh induced a relaxation that was practically abolished by the presence of *N^G-Nitro-L-Arginine Methyl Ester* (L-NAME), verifying that the endothelium was functional and the relaxation was NO-dependent. In addition, it was also demonstrated that Liraglutide affected the vasodilatory response to ACh.

For the pharmacological characterization of Liraglutide, concentration-response curves were performed in the presence of the drug, with pre-incubation with L-NAME, Exendin-3 (Ex-3) and insulin. Liraglutide was found to have a NO-independent contractile action verified by the non-altered response in the presence of L-NAME; this action is partially mediated by GLP-1R, since the presence of Ex-3 in the control group led to a decrease in the contractile

response of the drug, however in the diabetic group the same was not verified. The presence of insulin leads to a decreased of the potency of the Liraglutide-induced contraction, whereas in the diabetic group the presence of insulin showed a tendency to increase the maximum Liraglutide contraction. Finally, the effect of Liraglutide and insulin was evaluated individually, with the two drugs inducing contraction, which is higher in diabetic animals.

To study the mechanisms underlying the results obtained by the functional studies, biochemical studies were performed, such as the Western Blotting technique that allowed to do the quantification of GLP-IR, eNOSp /eNOS and insulin receptor (IRp/IR β) density. GLP-IR was shown to be decreased in the non-treated diabetic group, however, in diabetic animals treated with Liraglutide, the density was increased with a statistically significant difference ($P < 0.05$), compared to the first group. Regarding to eNOS and its phosphorylated form, no statistically significant differences were observed between the groups; however, the control group treated with Liraglutide has demonstrated a tendency to increase the active form of the protein. Concerning to the quantification of the IR density, both forms of the receptor are decreased in the presence of the disorder, and treatment with Liraglutide in the control group has shown a tendency for impairment of the active form of the receptor.

Analyzing histochemistry, it was possible to notice some changes in the aortic tissue in the diabetic group, since they presented matrix alterations and tissue disorganization. Relatively to GLP-IR immunohistochemistry, it was verified that there was a heterogeneous distribution of the immunostaining within each group and a decrease in diabetic animals relative to control animals.

Based on this study, we conclude that both drugs induce cardiovascular contraction, with Liraglutide contraction being NO-independent and partially mediated by its binding to the receptor (GLP-IR). Thus, a combination therapy of insulin and Liraglutide may be beneficial in the treatment of early-stage DMT I, but possibly not in patients with a known cardiovascular history.

Keywords: Type I Diabetes *Mellitus*, GLP-I, GLP-IR, Liraglutide, Cardiovascular Disorders.

Capítulo I.

Introdução

Introdução:

Diabetes Mellitus

O aumento da população mundial e a introdução de novos hábitos alimentares associados ao sedentarismo e a comportamentos de risco, tem contribuído para um aumento generalizado e diversificado de doenças, incluindo-se a *Diabetes Mellitus* (DM). Sendo atualmente considerada a maior pandemia mundial com uma prevalência de 8% (Tasyurek et al., 2014).

No ano de 2015, uma estimativa chegou ao número de 415 milhões de indivíduos com DM no panorama mundial, com a expectativa de que em 2040 este número se aproxime do valor de 642 milhões de indivíduos (Pino-García et al., 2016). É de senso comum que estes valores astronômicos se devem essencialmente à alteração de hábitos alimentares e estilos de vida, a fatores ambientais e também à predisposição genética.

A DM é uma doença crônica, que não apresenta uma população alvo específica. Não sendo específica do sexo, da etnia, nem da idade, apesar de ocorrer maior incidência nas faixas etárias mais velhas.

A DM ocorre quando o pâncreas é incapaz de produzir insulina ou quando o organismo não faz uma boa ou correta utilização da hormona. Assim, a doença é definida como uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por uma hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo tanto dos hidratos de carbono, como dos lípidos e das proteínas, resultantes da deficiência da ação ou secreção da insulina ou de ambas (Alberti e Zimmet, 1998).

À DM têm sido atribuídas várias complicações, nomeadamente, complicações não-vasculares e vasculares, tanto a nível microvascular como a nível macrovascular, tendo como principais percursos a hiperglicemia e a insulino-resistência (Shah e Brownlee, 2016). As complicações macrovasculares têm como causa primordial a hiperglicemia crônica e consequente disfunção endotelial, levando à formação de placas de ateroma e obstrução de artérias de grande e médio calibre, promovendo um estado patogénico de aterosclerose com grande infiltração de macrófagos, linfócitos T e inflamação, contribuindo para doenças cardiovasculares coronárias, periféricas e hipertensão arterial. Quanto às complicações microvasculares, resultam também da obstrução de vasos, neste caso de pequeno calibre, contribuindo para o desenvolvimento da retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas. Tendo

isto em conta, a diabetes é por muitos considerada uma doença cardiovascular (*Standards of Medical Care in Diabetes-2011*; Kang e Jung, 2016). Como podemos verificar pela Figura 1, a pesar de ter havido avanços na diminuição da taxa de morbidade e mortalidade ao longo dos anos, a maior causa de morte da diabetes continua a advir de complicações macrovasculares secundárias.

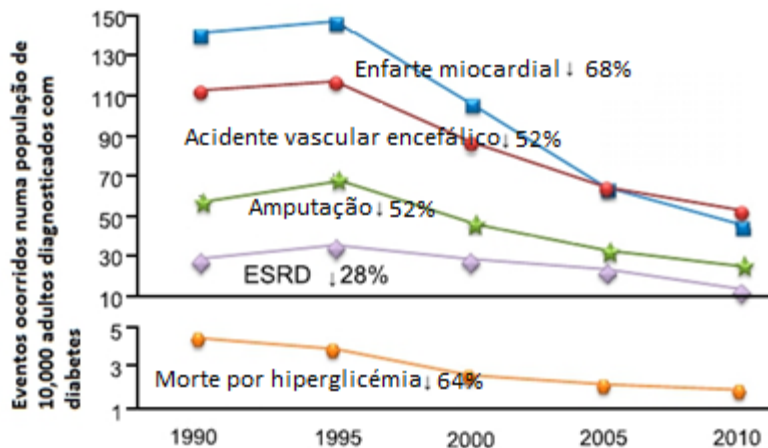


Figura 1- Complicações associadas à diabetes numa população de 10,000 indivíduos adultos diagnosticados com diabetes entre o ano de 1990 e 2010. (ESRD: End Stage Renal Disease, Doença renal em estadio terminal). Adaptado de: (Schatz, 2016).

Diabetes Mellitus Tipo I

Diabetes *Mellitus* Tipo I (DMTI) é caracterizada pela deficiência absoluta ou significativamente reduzida da secreção de insulina devido à inexistência total ou parcial das células β . O tipo I da diabetes atinge cerca de 5-10% da população diabética, e o seu desenvolvimento é consequência ou da destruição autoimune das células β , sendo apelidada de diabetes auto-imune/tipo IA, ou é de etiologia idiopática também chamada de tipo IB. Esta patologia leva à não produção de insulina e consequentemente à manutenção de um estado hiperglicémico, que promove poliúria, polidipsia, visão turva, perda de peso, e nas formas mais severas, a cetoacidose, o síndrome hiperosmolar não cetótico, o coma e a morte (Alberti e Zimmet, 1998). Para além destas consequências pode existir também em conjunto outros defeitos hormonais, tais como, alterações na gliconeogénese, concorrendo para a incapacidade do organismo suprimir o glucagon durante as refeições, promovendo uma hiperglicemia pós-prandial (Harris e Boland, 2016).

Um indivíduo é considerado diabético quando apresenta valores de glicemia em jejum superiores a 126 mg/dL e/ou glicemia pós-prandial ao fim de 2h superior a 200 mg/dL. Os indivíduos com risco aumentado de desenvolver a patologia são frequentemente identificados através de marcadores genéticos e através da ocorrência de processos patológicos autoimunes. Na DMT1 autoimune, o diagnóstico é habitualmente feito pela observação da presença de autoanticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico (Anti-GAD), autoanticorpos anti-ilhéus (ICA), autoanticorpos de anti-tirosina fosfatases (IA2 e IA2-beta) e autoanticorpos anti-insulina (IAA) (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2010). Por outro lado, na DMT1 de forma idiopática o diagnóstico não é tão claro, pois não apresenta marcadores específicos, para além da glicemia alta. Estes doentes têm tendência para terem insulinopenias permanentes ou então são propensos a cetoacidoses, e não revelam presença de anticorpos autoimunes (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2010).

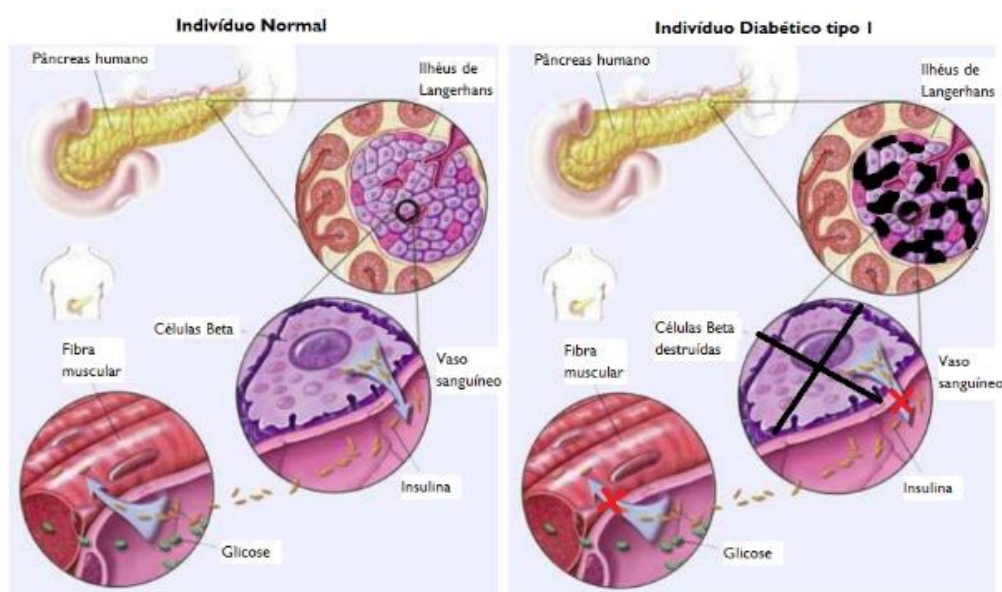


Figura 2- Comparação de um indivíduo saudável e um indivíduo com diabetes tipo I, com a representação esquemática da perda de células β pancreáticas. Adaptado a partir de: www.eurostemcell.org/diabetes-how-could-stem-cells-help.

A terapêutica da DMT1 passa pela insulinoterapia, administrada por via subcutânea em doses diárias ajustadas de insulina, de modo a obter um controlo rígido da glicemia do doente, insulinoterapia em co-administração com um antidiabético oral, de modo a melhorar a utilização periférica da glicose, ou através da medicina regenerativa, mais precisamente através da transplantação de pâncreas ou ilhéus pancreáticos, de modo a que seja possível a

manutenção da normaglicemia e a prevenção de problemas crônicos associados (Sena et al., 2010).

Como já referido anteriormente, à diabetes estão associados muitos problemas crônicos e muitas comorbidades, dando-se destaque às doenças cardiovasculares.

Com esta preocupação vários estudos têm evidenciado que alguns fármacos antidiabéticos utilizados na terapêutica da Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) têm potenciais efeitos cardioprotetores. É o caso do Liraglutido, um agonista do recetor do GLP-1 pertencente à classe das incretinas - fármacos isulinossecretores. Aliado ao seu “efeito incretina” que mais à frente será explicado, o seu potencial cardioprotetor parece estar parcialmente associado ao seu mecanismo vasodilatador dependente de óxido nítrico (Nitric Oxide, NO) (Lorenzati et al., 2010; Chilton, 2015). A co-administração deste grupo de fármacos com insulina pode também ajudar a prevenir ou reverter as complicações cardiovasculares associadas à DMT1.

Via de sinalização da insulina e a DM

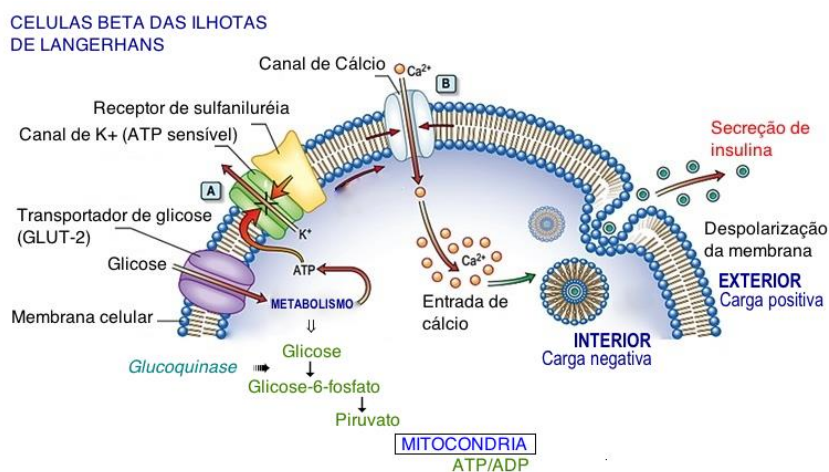


Figura 3- Esquema da entrada de glicose para a célula, representação do fecho dos canais de potássio com consequente despolarização da membrana, permitindo a entrada de cálcio para a célula e liberação de insulina por exocitose. Disponível em: www.medicinageriatrica.com.br/tag/insulina.

A insulina é uma hormona sintetizada pelas células β pancreáticas, que tem como principal objetivo regular os níveis de glicose no sangue. A sua síntese começa no retículo endoplasmático, sendo que o polipeptídeo se encontra na sua forma inativa (pré-proinsulina) constituído por uma região N-terminal sinalizadora, uma cadeia- β , uma cadeia C e uma cadeia- α na extremidade C-terminal. Após ser secretada do retículo endoplasmático, passa por processos pós-translacionais, clivagens e formação de pontes dissulfeto, tornando-se na sua forma ativa e pronta para ser armazenada no interior dos grânulos secretores, sendo posteriormente libertados aquando da sua necessidade, ou seja, quando existe uma elevação dos níveis de glicose no plasma. Como podemos observar na Figura 3, a insulina é libertada quando existe entrada de glicose para as células pelos transportadores de glicose tipo 2 (GLUT2) (Fu, Gilbert e Liu, 2013). A glicose entra na célula e sofre fosforilação, provocando uma alteração no rácio de adenosina trifosfato/adenosina difosfato (*Adenosine triphosphate/Adenosine Diphosphate*, ATP/ADP), que leva à inativação dos canais de potássio e despolarização da membrana, contribuindo para a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem e consequentemente a entrada do cálcio para o interior da célula. A entrada deste ião na célula resulta na libertação da insulina pré-formada dos grânulos secretores (Fu, Gilbert e Liu, 2013).

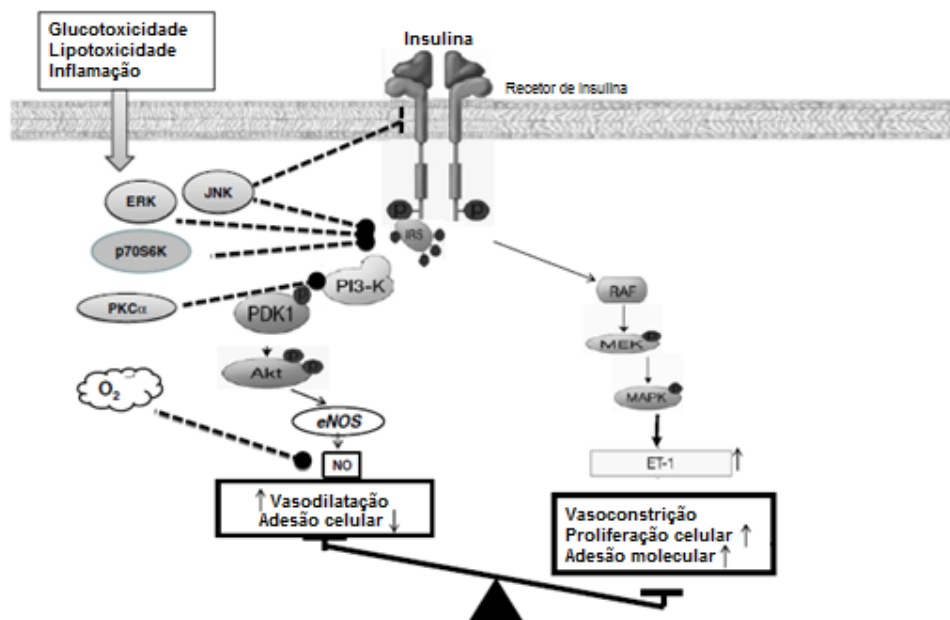


Figura 4- Representação das vias de sinalização da insulina. A via de sinalização PI3K que regula a produção de NO, promovendo o vasorrelaxamento e inibição da adesão celular, e a via de sinalização MAPK que contribui para a produção de ET-1, promovendo a vasoconstrição, proliferação celular e adesão molecular. Quando estas vias funcionam corretamente mantem-se o equilíbrio. (PI3K, *Phosphoinositide 3-kinase*, fosfotdilositol-3-cinase; MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*, proteína-quinase ativada pelo mitogénio; ET-1, *Endothelin-1*, endotelina-1) Adaptado de: (Muniyappa e Sowers, 2013).

Após a sua libertação, a insulina liga-se aos seus recetores e a partir daqui promove algumas vias de sinalização importantes, tais como uma via de regulação da expressão génica e de crescimento celular, MAPK/ ERK (cinase regulada por sinal extracelular, *Extracellular Signal-regulated Kinase*); uma via de transporte de glicose, proteína TC10; uma via de regulação do transporte de glicose, da síntese de glicogénio, de lípidos e proteínas, da regulação génica e também de algumas funções não metabólicas tais como inibição da apoptose, da degradação proteica do músculo esquelético e de fatores de transcrição. Todas as vias se iniciam com a ligação da insulina ao seu recetor e conseqüente alteração da sua conformação e autofosforilação, seguindo-se da fosforilação de vários substratos do recetor de insulina (*Insulin Receptor Substrate*, IRS), tais como por exemplo a Shc. A via de sinalização da MAPK após a fosforilação dos IRS, resulta na ativação do *Son of Sevenless* (SOS) que leva à troca de guanosina difosfato (*Guanosine Diphosphate*, GDP) por trifosfato (*Guanosidine Triphosphate*, GTP) da Ras. Esta por sua vez atua sobre a cinase Raf fosforilando-a e tornando-a ativa. Como podemos observar pela Figura 4, a Raf funcional tem como função a fosforilação da MEK, tornando-se desta forma também ativa, e com a função de fosforilar a MAPK, que por fim irá estimular a proliferação, diferenciação celular e adesão molecular (Saltiel e Kahn, 2001; Bevan, 2001).

A outra via de sinalização é a PI3K, que começa com a fosforilação do recetor e dos IRS em vários resíduos de tirosina. Esta fosforilação cria locais de reconhecimento que permitem a interação entre proteínas, nomeadamente entre os IRS e PI3K, de onde resulta fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-bifosfato e fosfatidilinositol-3-4-5-trifosfato (*Phosphoinositide-3-phosphate*, *Phosphoinositide-3,4-biphosphate* e *Phosphoinositide-3,4,5-triphosphate*; PIP, PIP2 e PIP3). Este último irá atuar como segundo mensageiro intracelular e irá regular a atividade e a localização de várias proteínas tais como, a proteína cinase dependente de PIP3 (PDK). Após a ativação da fosfatidilinositol dependente da cinase-1 (*Phosphoinositide-dependent Kinase-1*, PDK-1), esta fosforila a proteína cinase B (*Protein Kinase B*, PKB/Akt) tornando-a ativa, permitindo assim a ativação/regulação de algumas respostas fisiológicas à insulina, como a translocação do transportador GLUT-4 para a membrana que é importante na captação de glicose para as células (Bevan, 2001), assim como a fosforilação da sintase do óxido nítrico endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) tornando-a ativa, onde na presença de co-fatores leva à produção de NO que é importante para aumento da vasodilatação e diminuição da adesão molecular (Muniyappa e Sowers, 2013).

Na DMTI existe uma falha na produção de insulina ou há produção, mas de forma muito reduzida. Assim sendo, existe uma disfunção destas vias, e de um modo geral podemos afirmar

que ocorre uma regulação negativa das vias de sinalização, resultando num desequilíbrio metabólico, que vai surtir efeitos em diversos órgãos. Por exemplo, como podemos perceber também pela Figura 4, a via de sinalização que controla a ativação da MAPK e a regulação da ET-1 quando se encontra desregulada, ao invés de manter a homeostase, passa a produzir ET-1 em excesso e contribui para uma maior expressão da adesão molecular no endotélio vascular, para uma maior proliferação celular e ainda promove a vasoconstrição. Relativamente à via de sinalização PI3K, também se encontra comprometida na patologia, levando a uma diminuição/disfunção da forma ativa da eNOS, diminuindo a produção de NO e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS), contribuindo para uma menor mobilização de células progenitoras endoteliais (*Endothelial Progenitor Cells*, EPCs), para a vasoconstrição e para a adesão molecular (Muniyappa e Sowers, 2013).

Disfunção endotelial

A disfunção endotelial é caracterizada pela função incorreta do endotélio, promovendo o desequilíbrio entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores. O que contribui, de um modo geral, para um déficit da vasodilatação aquando da estimulação das células endoteliais para esse efeito (Jansson, 2007). Este tipo de disfunção é de maior ou menor extensão, consoante o grau, o controlo e o tipo de diabetes. No entanto, é sempre uma constante nas doenças coronárias e um processo unificador das complicações microvasculares e macrovasculares da DM, tanto na DMT1 como na DMT2 (Lovshin e Cherney, 2015). A disfunção implica a diminuição da produção ou biodisponibilidade do NO ou o desequilíbrio da contribuição relativa dos fatores vasodilatadores/vasoconstritores. Assim sendo, um endotélio comprometido e ativado encontra-se sensibilizado à interação com leucócitos e à sua aderência, à proliferação das células musculares lisas, à coagulação, à atividade plaquetária, à trombose e à inflamação vascular, predispondo o vaso para a aterosclerose (Szmitko, Leiter e Verma, 2010).

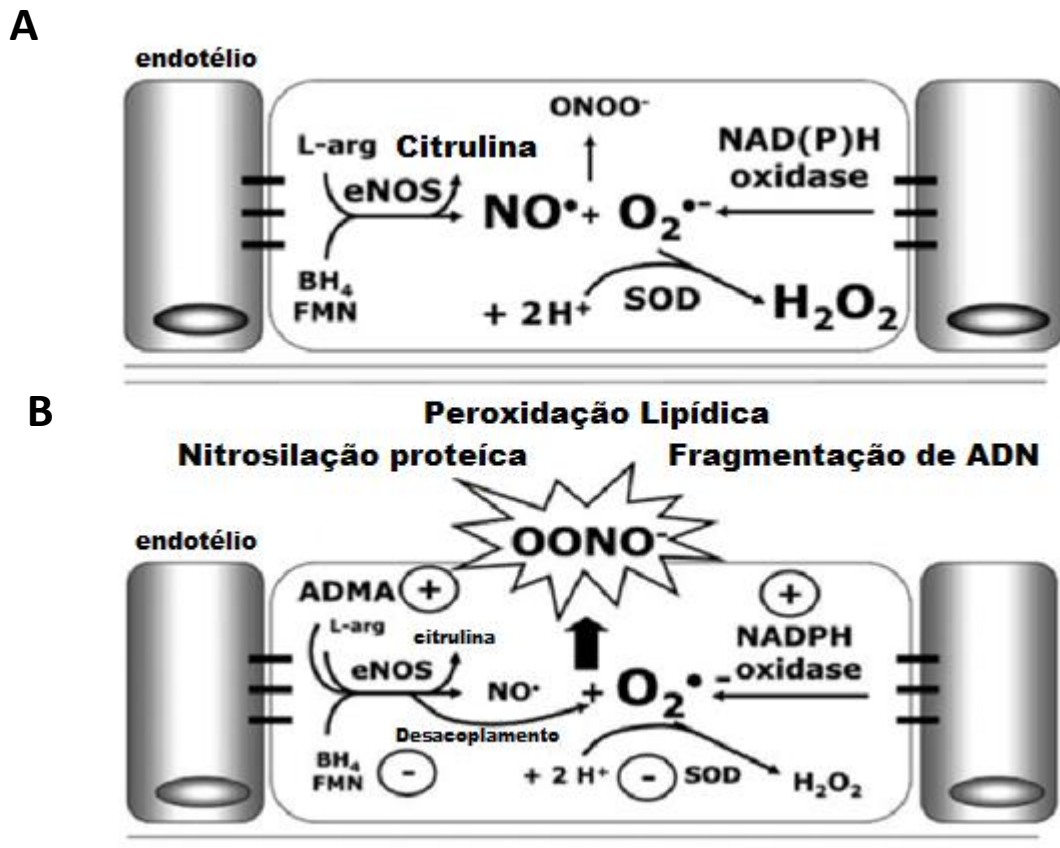


Figura 5- Balanço oxidação/redução das células endoteliais. A) Endotélio sob condições fisiológicas: existe produção de NO, assim como de espécies reativas de oxigénio, nomeadamente o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que neste caso reage com a superóxido dismutase (*Superoxide Dismutase*, SOD) originando peróxido de hidrogénio (H_2O_2), mantendo o balanço redox na célula. B) Disfunção endotelial: sob condições patológicas ocorre uma disfunção dos fatores, que vão concorrer para a diminuição da biodisponibilidade do NO, por vários mecanismos. Através do stress oxidativo, ocorre a diminuição da biodisponibilidade de co-fatores, tais como, a tetraidrbiópterin (*Tetrahydrobiopterin*, BH_4) e o mononucleótido de flavina (*Flavine Mononucleotide*, FMN) aumentando os níveis intracelulares da dimetilarginina assimétrica (*Asymmetric Dimethylarginine*, ADMA) que por sua vez, contribuem para o desacoplamento da eNOS gerando $O_2^{\bullet-}$ ao invés de NO. A atividade da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase*, NADPH-oxidase) também está aumentada, resultando numa reação entre a produção de NO e $O_2^{\bullet-}$ mais rápida do que a reação com a SOD. Deste modo origina peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de oxigénio, que produz lesões celulares, nitrosilação proteica, peroxidação lipídica e fragmentação do ADN. Adaptado de: (Potenza *et al.*, 2009).

As concentrações elevadas de glicose no sangue são uma característica da DMTI e vários mecanismos envolvidos na disfunção endotelial, que ocorrem em resposta à hiperglicemia, promovendo vários acontecimentos tais como: a ativação da via do sorbitol, a formação de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End products*, AGEs) que aumentam o stress oxidativo e inativam o fator de relaxamento derivado do endotélio (*Endothelium Derived Relaxing Factor*, EDRF) (Rusak *et al.*, 2017; Vitek *et al.*, 1994). O stress oxidativo é gerado maioritariamente pela disfunção mitocondrial que ocorre devido aos níveis elevados da glicose e de lípidos no sangue, tornando o complexo enzimático da cadeia respiratória mitocondrial

disfuncional. Isto permite um aumento da saída de elétrons da cadeia, resultando na ativação da NADPH oxidase (NOX) que é um gerador de ROS (Dai e Dai, 2010). As ROS vão então contribuir para a vasoconstrição através de vários mecanismos, que incluem a inibição da atividade da Dimetilarginina dimetilamino-hidrolase (DDHA), a formação ONOO⁻, a inibição de co-factores da eNOS, a inibição direta da produção de NO e a promoção da inflamação das paredes do vaso sanguíneo (Potenza *et al.*, 2009).

Assim sendo de uma maneira geral, temos que a disfunção endotelial resulta no aumento de ROS, na diminuição da biodisponibilidade de NO, assim como na diminuição da mobilização das EPCs. Isto, juntamente com o estado hiperglicêmico característico da DM, leva ao contínuo recrutamento de macrófagos, neutrófilos que se irão acumular nas paredes vasos contribuindo para o processo inflamatório. Daqui resulta um ciclo vicioso de progressão de inflamação e promoção do desenvolvimento de doenças arteriais (Shah, M. S. e Brownlee, 2016).

Óxido Nítrico Sintetase (eNOS)

A eNOS é uma das isoformas da sintase do óxido nítrico (*Nitric Oxide Synthase*, NOS), está envolvida na produção do NO no endotélio vascular sob condições basais, quando se encontra na sua forma ativa, ou seja, quando se encontra na sua forma dimérica e fosforilada.

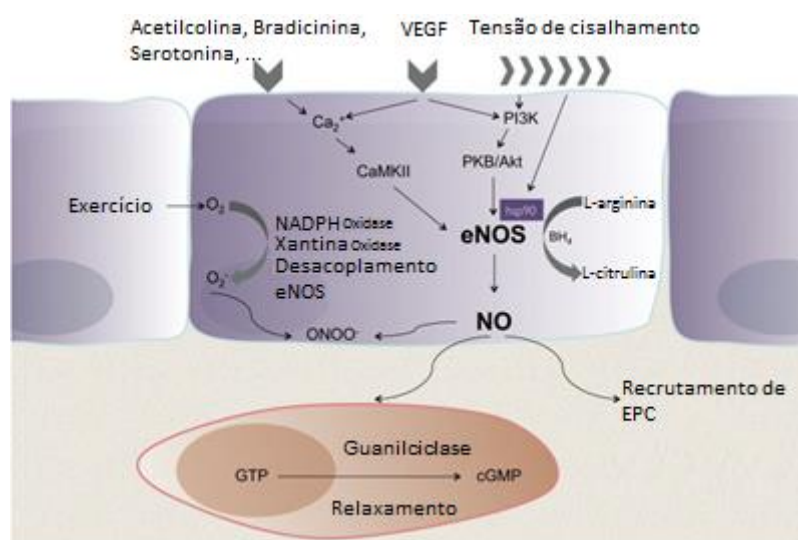


Figura 6- Via de sinalização e ativação da eNOS no estado fisiológico. A ativação da eNOS leva à produção NO, que por sua vez é um fator importante envolvido tanto no vasorrelaxamento como também no recrutamento de EPCs a partir da medula óssea. Adaptado de: (Duda *et al.*, 2004).

A expressão da eNOS é considerada benéfica para a proteção vascular e proteção anti-aterosclerótica. Esta afirmação é verdadeira em condições normais, pois em circunstâncias fisiopatológicas o excesso de ativação da eNOS está associado à rápida progressão da aterosclerose e à vasoconstrição, devido ao desacoplamento da eNOS (Thum *et al.*, 2007). Aquando de um estado hiperglicémico característico da DMII, existe aumento da produção do O_2^- pela mitocôndria e pela NADPH oxidase. Assim sendo, este O_2^- em excesso vai reagir com o NO existente originando $ONOO^-$, que causa lesões celulares (Figura 6). Para além disto, o $ONOO^-$ reage ainda com o co-factor da eNOS, o BH_4 , não permitindo desta forma que este realize a sua função junto da mesma, ou seja, resulta numa eNOS desacoplada, onde ao invés de transferir 1 eletrão para a L-arginina, transfere-o para o oxigénio molecular, formando anião superóxido, ao invés de óxido nítrico (Patcher, Beckman e Lioudet, 2007; Potenza *et al.*, 2009).

O estado hiperglicémico torna a atividade da DDHA disfuncional, isto é, a sua atividade é inibida resultando numa acumulação de substrato da ADMA, uma enzima com estrutura semelhante à L-arginina. Assim, através de antagonismo competitivo, compete com a L-arginina pelo local catalítico da eNOS, o que leva a uma diminuição da produção de NO (Potenza *et al.*, 2009). Este estado ainda permite de uma forma direta a diminuição também da biodisponibilidade do NO, pois a ação da pouca insulina existente fica alterada na presença de *stress oxidativo*, isto é, aquando da existência de ROS, aumenta a fosforilação da serina do IRS-1 resultando num mediador disfuncional, que posteriormente compromete a via de sinalização da PI3K/Akt e diminui a produção de NO (Potenza *et al.*, 2009).

Para além de tudo isto, a contínua hiperglicemia contribui para a formação de AGEs que se acumulam alterando as propriedades funcionais dos componentes da matriz celular, e ligam-se aos seus recetores produzindo anião superóxido, promovendo a inflamação das paredes do vaso com a infiltração de macrófagos, e ainda contribuem para a aceleração da degradação do mRNA da eNOS (Potenza *et al.*, 2009).

Portanto, o aumento da produção de O_2^- deve-se a várias falhas de diversos mecanismos, sendo que a maior contribuição, vem por parte do desacoplamento da eNOS. Esta afirmação é comprovada por estudos realizados na presença do inibidor da enzima eNOS o N^G -nitro-L-arginina (N^G -nitro-L-Arginine, L-NNA), cujo resultado se traduz na diminuição da produção de O_2^- (Thum *et al.*, 2007).

Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma pequena molécula hidrofóbica que atravessa membranas celulares sem necessidade de recetores ou canais. É considerada uma molécula muito importante principalmente devido à sua capacidade de produção de guanosina monofosfato cíclico (*Cyclic Guanosine Monophosphate*, GMPc), através da ligação à guanilciclase (*Guanylyl Cyclase*, GC). Esta molécula tem a capacidade de se difundir rapidamente nas células e de se deslocar rapidamente às células vizinhas à qual foi sintetizada, e ativar a GC produzindo GMPc. O GMPc, por sua vez, através de cinases GMPc dependentes, modula os níveis intracelulares de cálcio, modulando diversas atividades nos tecidos alvo (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina sob a ação catalítica da eNOS que se encontra no endotélio. A eNOS atua então no sentido de catalisar o azoto final do grupo guanidina da L-arginina, formando deste modo, quantidades equimolares de NO e L-Citrulina. Uma vez formado, o NO é libertado rapidamente por difusão para as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, onde irá ativar a GC e diminuir o Ca^{2+} intracelular, promovendo o relaxamento (Zago e Zanesco, 2006).

Assim, o NO tem uma grande importância em termos do controlo do relaxamento vascular. Para além desta função, ainda está implicado na agregação e adesão plaquetar, sendo ele um potente inibidor e ainda controlador da expressão de alguns genes envolvidos na aterosclerose. Está envolvido na diminuição da expressão do *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) e do *Cluster of Differentiation 11/Cluster of Differentiation 8* (CD11/CD18), na superfície celular. Isto deve-se ao facto da via PI3K/Akt causar o “sequestro” do fator de transcrição *forkhead box protein O* (foxO) no citoplasma, prevenindo desta forma a transcrição de vários genes pró-aterogénicos e promovendo a mobilização de EPCs (Shah e Brownlee, 2016).

Células progenitoras endoteliais (EPCs)

As células progenitoras endoteliais são células mononucleadas originárias da medula óssea capazes de se diferenciar em células endoteliais maduras (Miller-Kasprzak e Jagodziński, 2007). Têm a particularidade de poderem ser mobilizadas pelo NO para a corrente sanguínea

e substituir células endoteliais lesadas da vasculatura, limitando também a formação de placas e a aterosclerose (Thum *et al.*, 2005).

Estas células encontram-se em número reduzido e em forma disfuncional, aquando da patologia da diabetes, tanto a tipo 1 como a tipo 2, o que concorre para a disfunção da neovascularização e diminuição da capacidade de proliferação, adesão e incorporação nas estruturas vasculares por parte das mesmas (Thum *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que em elevadas concentrações de glicose “*in vitro*” ocorre o desacoplamento da eNOS juntamente com o aumento da produção de ROS e a diminuição do número e mobilização de EPCs, contribuindo para o aumento das complicações micro e macrovasculares da diabetes e efetivamente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Thum *et al.*, 2007).

Glucagon-like peptide I, Recetor, Localização e Vias de sinalização

Glucagon-like peptide I (GLP-I)

O GLP-I é uma hormona, mais concretamente uma incretina crucial para a manutenção da normoglicemia. É produzida no jejuno distal, no íleo e no colon sendo posteriormente secretada pelas células L em resposta aos nutrientes (Tasyurek *et al.*, 2014). A sua secreção é bifásica, com uma fase inicial de 15 minutos que começa logo após a ingestão de alimentos, não necessitando do contacto direto com os nutrientes, e uma segunda fase retardada que varia entre 30-60 minutos após o final da ingestão (Szmitko *et al.*, 2010). A secreção da hormona é então realizada sobre influência neuronal e de fatores endócrinos, tais como, o peptídeo intestinal vasoativo (*vasoactive intestinal peptide*, VIP) que levam à ativação do segundo mensageiro adenilciclase e ao desencadear de várias cascatas metabólicas (Tasyurek *et al.*, 2014).

A sua síntese começa pela ação da convertase PC1/3 sobre o polipeptídeo proglucagon, dando origem à oxintomodulina, glicentina, GLP-2 e GLP-I₍₇₋₃₇₎/GLP-I₍₇₋₃₆₎ (formas equivalentes), sendo o GLP-I o único capaz de dar resposta à glicose por via de aumento de produção de insulina. Este último tem um tempo de meia-vida muito curto, sendo posteriormente degradado pela ação da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) (Lorenzati *et al.*, 2010). No entanto, exerce vários efeitos pleiotrópicos benéficos em múltiplos órgãos, tais como:

pâncreas, fígado, rim, tecido adiposo, sistema gastrointestinal, cérebro, músculo e sistema cardiovascular. Fá-lo por uma via direta, através da sua ligação ao recetor, ou por uma via independente do recetor (Pabreja *et al.*, 2014).

A sua principal função é sobre as células β pancreáticas e envolve estimulação da secreção de insulina. Como o GLP-1 é glicose dependente, este estimula a secreção da insulina apenas na presença de níveis aumentados de glicose no sangue. Para além disso, a hormona a nível pancreático é capaz de induzir a supressão do glucagon, função esta, também dependente da glicose. Esta hormona, segundo diversos dados experimentais publicados, parece ter também efeitos benéficos noutros sistemas tais como, no sistema cardiovascular, no cérebro, nos vasos sanguíneos, fígado, tecido adiposo e sistema imunológico, que mais à frente serão novamente referidos (Kang e Jung, 2016).

Recetor do *glucagon-like peptide I* (GLP-1R)

O GLP-1R é um recetor acoplado à proteína G pertencente à família *secretin-like*, também denominada por família B, é constituído por 463 aminoácidos, e apresenta 8 domínios, sendo 7 transmembranares (Pabreja *et al.*, 2014). Tem sido identificado em vários tecidos; ilhéus pancreáticos, coração, aorta, pulmão, glândulas gástricas, em parte do sistema nervoso periférico e central, rim, e na pele. Apresenta regiões de extrema importância, tais como, a região extracelular N-terminal (essencial à ligação GLP-1/GLP-1R), e o 3º loop intracelular (crítico para o acoplamento eficiente entre o recetor e a proteína G)(Grieve, Cassidy e Green, 2009; Baggio e Drucker, 2007).

Mecanismos de ação

O GLP-1 tem diversas funções no organismo, no entanto o principal efeito desencadeado pela ligação ao GLP-1R ocorre a nível das células β pancreáticas e denomina-se efeito incretina. De um modo geral este efeito baseia-se na síntese de insulina maximizada aquando da entrada de nutrientes no organismo, na inibição da secreção do glucagon e na melhoria do funcionamento das próprias células β .

A ligação do GLP-1 ao respetivo recetor nas células β leva à ativação da adenilciclase e consequente aumento da adenosina monofosfato cíclico (*cyclic Adenosine Monophosphate*, AMPc) intracelular. O AMPc atua sobre os canais de potássio sensíveis ao ATP. Assim o ATP

liga-se aos canais K_{ATP} transformando-se em ADP, sendo que este balanço energético contribui para o fecho dos canais de potássio e despolarização da membrana (Pabreja *et al.*, 2014). Como consequência deste evento os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem abrem-se permitindo a entrada do mesmo, aumentando os seus níveis intracelulares, promovendo a estimulação de vesículas secretoras armazenadoras de insulina que se irão fundir com a membrana celular, e por excitação a insulina será libertada (Baggio e Drucker, 2007).

Para além da secreção de insulina, a ligação do GLP-1 ao seu recetor envolve a via de sinalização AMPc/(Protein Kinase A, PKA) que induz o regulador transcricional da células β promovendo a inibição das caspases e inibindo desta forma a apoptose celular, Figura 7 (Drucker, 2006). Como também leva à transcrição do gene e expressão do *pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX-1), que também está associado a efeitos protetores como se pode observar pela Figura, tem efeitos proliferativos e anti-poptóticos e deste modo contribui para a neogénese dos ilhéus pancreáticos (Pabreja *et al.*, 2014).

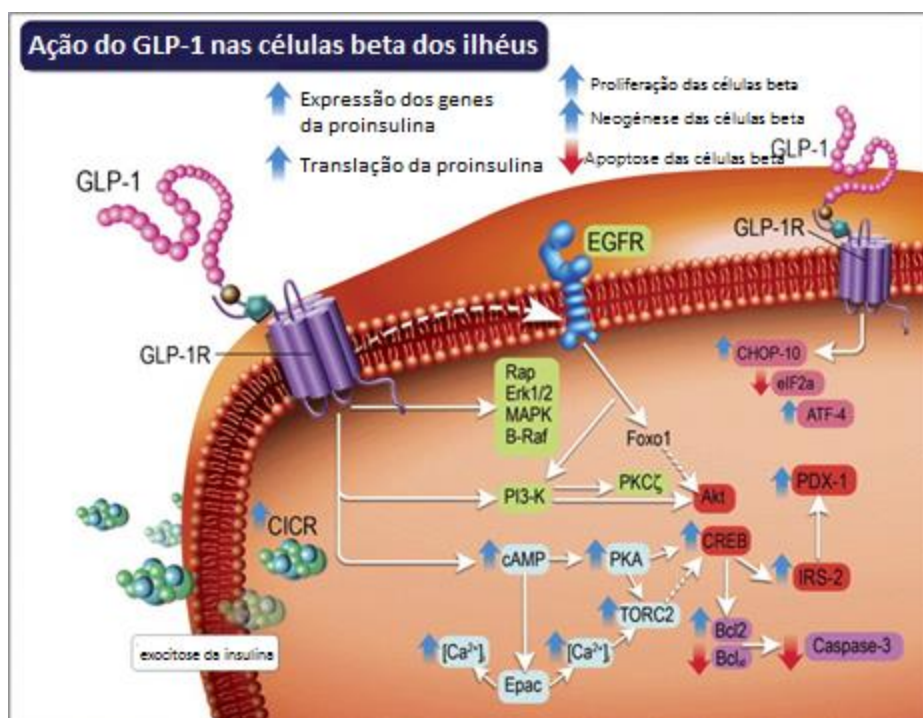


Figura 7- Representação da ação do GLP-1 nas células β pancreáticas e dos seus efeitos proliferativos e anti-apoptóticos. Adaptado de: (Pabreja *et al.*, 2014).

O GLP-1 tem a capacidade também de suprimir a secreção do glucagon nas células α pancreáticas, função esta, que é importante em termos de regulação da normoglicemia e manutenção da homeostase. No entanto este mecanismo é pouco compreendido. Alguns investigadores defendem que o mecanismo possa envolver a ligação direta do GLP-1 ao seu

recetor nas células α pancreáticas, começando pela produção de AMPc/PKA dependente do encerramento dos canais K_{ATP} contribuindo para a despolarização da membrana, daqui resulta a inativação dos canais de Na^+ e Ca^{2+} tipo T, seguida da inibição dos canais de K^+ tipo A, inibindo desta forma a repolarização da membrana das células α , reduzindo o Ca^{2+} intracelular que por fim leva à supressão da libertação do glucagon. Outros investigadores, sugerem uma via indireta, que recorre à estimulação simultânea, parácrina pancreática e do sistema nervoso central, levando à secreção de insulina e/ou de somatostatina, hormonas que por sua vez suprimem o glucagon, quando aumentadas (Baggio e Drucker, 2007).

Decorrente do descrito na presença de níveis de glicose elevados, o GLP-1 para além de aumentar o AMPc/PKA contribuindo para o aumento do fator de transcrição celular CREB e ativação da Akt, estimula a secreção de insulina e contribui para o aumento da produção do fator *β -cell lymphoma 2 (Bcl-2)* (proteína anti-apoptótica) (Drucker, 2006). A ativação do GLP-1R em linhas celulares demonstrou gerar células autónomas, pela via de sinalização β -arrestina-1, que participa em processos de dessensibilização dos recetores acoplados a proteínas G, causando uma resposta celular diminuída a estímulos, com efeitos inibitórios da Bax (proteína pró-apoptótica também denominada de *bcl-2-like protein 4*), e contribuindo desta forma também para a inibição do processo apoptótico (Pabreja et al., 2014).

O GLP-1 é conhecido também por exercer efeitos na regulação de via de sinalização PI3K/Akt através da ligação ao seu recetor (Shah et al., 2011), onde a Akt leva à fosforilação da eNOS e conseqüente libertação de NO (Sussman et al., 2011), sendo este último, um regulador essencial à função cardiovascular e que contribui para o relaxamento dos vasos sanguíneos (Förstermann e Sessa, 2011).

Para além destas funções, o GLP-1R está envolvido na diminuição da motilidade intestinal e esvaziamento gástrico e conseqüente aumento da saciedade; a nível do sistema imunológico contribui para a diminuição da inflamação; no tecido adiposo, para a inibição da lipogénese e diminuição dos níveis dos triglicéridos (Kang e Jung, 2016); no sistema cardiovascular, têm sido reportados efeitos positivos na disfunção endotelial, na indução do vasorrelaxamento, na pressão sanguínea, na melhoria da função do miocárdio, na performance cardíaca em doentes com enfartes agudos do miocárdio, na disfunção do ventrículo esquerdo e na redução da área de enfarte num modelo animal de isquémia cardíaca (Tasyurek et al., 2014).

Sistema cardiovascular

O enfarte do miocárdio e os acidentes vasculares cerebrais são responsáveis por 75% das mortes em doentes com DM. Estes doentes apresentam uma probabilidade 2-4 vezes maior de desenvolverem doenças arteriais-coronárias (Kang e Jung, 2016).

Evidências pré-clínicas e a presença de recetores do GLP-I no sistema cardiovascular, nomeadamente, a nível dos cardiomiócitos, das células endoteliais e das células musculares lisas, reforçam a ideia que o GLP-I e os agonistas do GPL-IR (GLP-IRA) possam ser benéficos a nível do sistema cardiovascular (Kang e Jung, 2016).

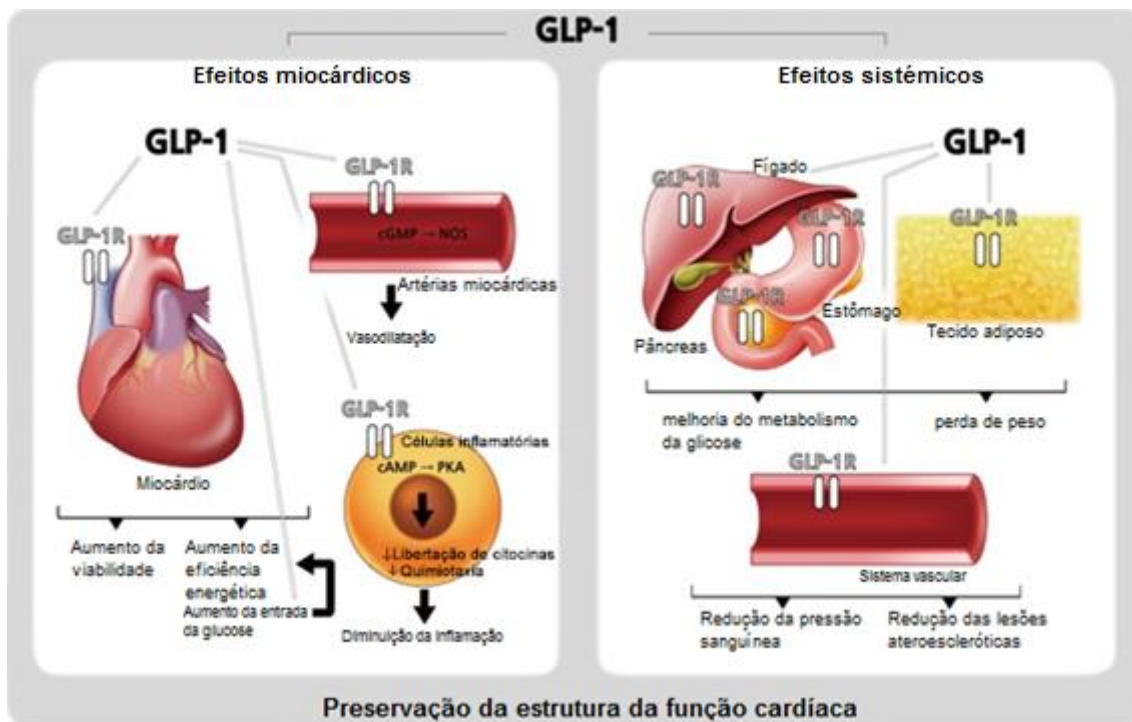


Figura 8- Representação esquemática da distribuição do GLP-IR e os efeitos fisiológicos a nível cardiovascular, tais como o aumento da entrada de glicose, diminuição da apoptose e aumento da viabilidade, vasodilatação e diminuição da inflamação. A nível sistémico a redução das lesões por aterosclerose, diminuição da pressão sanguínea, melhoria no metabolismo da glicose e perda de peso. Adaptado de: (Kang e Jung, 2016).

O GLP-IR encontra-se muito expresso no sistema cardiovascular, sendo detetado no endocárdio, nos cardiomiócitos, no sarcolema e nas células endoteliais (Ban *et al.*, 2008).

Vários estudos reportaram que o GLP-I a nível cardiovascular desempenha funções importantes, que incluem a ativação e manutenção das vias de sobrevivência celulares, a manutenção da função endotelial (Shah *et al.*, 2011), funções no metabolismo miocárdico, na pressão sanguínea, nas condições pré/pós-isquémica, na performance do ventrículo esquerdo, na redução da área de enfarte, no aumento da produção de NO e indução do

vasorrelaxamento e no aumento da entrada de glicose no miocárdio (Chilton, 2015). A deleção genética do recetor em murganhos induziu uma função cardíaca anormal, com hipertrofia ventricular esquerda, diminuição da frequência cardíaca e aumento da pressão diastólica final, para além de uma resposta anormal à insulina (Advani *et al.*, 2013).

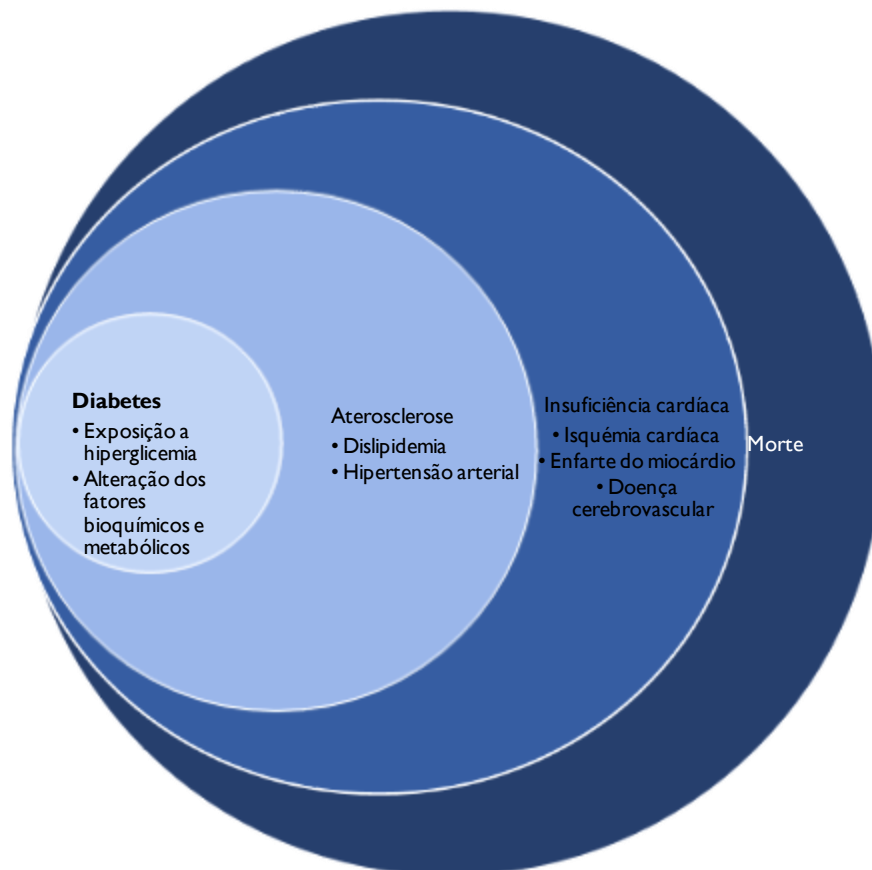


Figura 9- O estado hiperglicémico em conjunto com as alterações metabólicas e bioquímicas, promovem um desequilíbrio metabólico, contribuindo desta forma para o aparecimento de doenças secundárias cardiovasculares que quando não tratadas podem progredir levando à morte dos indivíduos.

O estado hiperglicémico induzido pela diabetes e as alterações bioquímicas e metabólicas concorrem para o aparecimento de fatores de risco e possível desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como as que podemos observar pela Figura 9. Alguns estudos demonstraram que tanto o GLP-I endógeno como os GLP-IRA podem prevenir o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, tais como, aterosclerose, isquémia e insuficiência cardíaca.

A aterosclerose é uma doença que está intimamente relacionada com a dislipidemia e basicamente resulta da formação de placas de ateroma nas paredes dos vasos sanguíneos,

devido à acumulação de triglicerídeos e colesterol, ou devido a baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoprotein*, HDL), contribuindo para a diminuição do fluxo sanguíneo e levando a uma possível obstrução do vaso. Na realidade o que acontece no organismo é que, aquando de uma concentração elevada de lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*, LDL) em circulação, o sistema de remoção de lípidos encontra-se saturado, ou seja, não consegue remover os mesmos. Sendo que estes lípidos permanecem em circulação durante mais tempo, permitindo que sejam oxidados pelas ROS, por iões ou por enzimas libertados pelas células endoteliais e fagócitos, depositando-se posteriormente nos vasos, formando assim as placas (Zago e Zanesco, 2006). Segundo estudos, a contínua infusão de um GLP-IRA (Exenatido-4) faz reduzir a adesão de monócitos nas paredes dos vasos e reduz os marcadores inflamatórios, reduzindo desta forma o tamanho da lesão causada pela aterosclerose (Arakawa *et al.*, 2010). A infusão do agonista aumenta a libertação de NO, importante na inibição da oxidação das LDL e agregação plaquetar. Estas funções são desempenhadas através de mecanismos antioxidantes, que impedem ou diminuem a formação de ROS, e através da formação de GMPc que contribui como anteriormente descrito para a redução da concentração dos iões Ca^{2+} no interior das células musculares lisas conduzindo à vasodilatação (Zago e Zanesco, 2006).

A isquémia cardíaca é caracterizada pela diminuição da passagem de sangue das artérias coronárias para o coração. Vários estudos pré-clínicos demonstraram que em modelos animais com isquémia cardíaca, tanto o GLP-I como os GLP-IRA apresentam efeitos cardioprotetores, sendo que ambos demonstraram melhorar a recuperação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo após a isquémia (Zhao *et al.*, 2006).

Na insuficiência cardíaca tanto o GLP-I como os GLP-IRA parecem apresentar melhorias desta patologia. Por exemplo, num estudo envolvendo animais com insuficiência cardíaca foi demonstrado que a administração de GLP-I exercia efeitos isulinomiméticos, diminuía a frequência cardíaca, aumentava a função sistólica do ventrículo esquerdo e diminuía os níveis plasmáticos de Noradrenalina (*Norepinephrine*, NA) e glucagon. De uma forma geral melhorava a sobrevivência e preservação da função contráctil do ventrículo esquerdo e consequentemente contribuía para a redução da apoptose dos cardiomiócitos (Poornima *et al.*, 2008).

Outros estudos revelaram que a administração do GLP-I em indivíduos com DMT2 e doença cardíaca coronária estável tinham melhorado em termos da função endotelial, isto porque apresentaram melhorias na vasodilatação da artéria braquial contribuindo para uma

maior passagem de sangue independentemente de alterações na pressão sanguínea sistólica ou diastólica durante um estado de hiperglicemia (Ussher e Drucker, 2012).

Em situação de insuficiência ou lesão cardíaca, o GLP-1 parece influenciar positivamente os resultados, sendo que para além de melhorar a sensibilidade à insulina e entrada de glicose para as células cardíacas, diminui a pressão diastólica do ventrículo esquerdo e inibe a lipólise através da diminuição dos níveis de ácidos gordos no plasma (Ussher e Drucker, 2012). Segundo a análise de resultados de corações isolados em modelos animais de ratos com isquémia, o GLP-1 parece apresentar também funções citoprotetoras o que leva à redução da área de enfarte.

Já se percebeu que tanto o GLP-1 como os GLP-1RA têm efeitos cardioprotetores e reparadores. No entanto os mecanismos pelo os quais o GLP-1 desenvolve cardioproteção não estão bem esclarecidos, mas parece existir duas possíveis vias: a via direta, já anteriormente falada, que envolve a ativação do GLP-1R e da via de sinalização PI3K/Akt, que vai resultar na libertação de insulina e normalização da glicose plasmática e da entrada da mesma para as células, assim como a inibição da apoptose e efeitos proliferativos. E a via indireta, que envolve o metabolito GLP-1(9-36) que anteriormente pensava-se ser fisiologicamente inativo e que não tem afinidade para o recetor (Drucker, 2006).

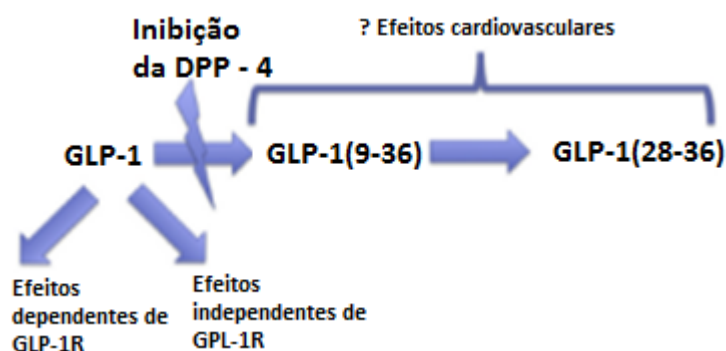


Figura 10- Mecanismos que podem exercer efeitos cardiovasculares. Via dependente da ligação do GLP-1 ao recetor, e via independente do recetor que envolve o metabolito GLP-1(9-36). Adaptado de: (Advani *et al.*, 2013).

De facto, segundo Ban e colaboradores, algumas das ações cardioprotetoras e vasodilatadoras do GLP-1 demonstraram ser independentes do recetor e seriam mediadas pelo metabolito GLP-1(9-36) (Ban *et al.*, 2008). Foi demonstrado que o efeito vasodilatador

tanto do GLP-I como do GLP-I(9-36) levava ao aumento do GMPc. Este efeito era atenuado com uma pré-incubação com um inibidor da eNOS, sugerindo que parte da ação vasodilatadora é mediada pela via PI3K/Akt e fosforilação da eNOS (Shah *et al.*, 2011).

Num estudo, onde foram utilizados corações de ratos com reperfusão isquémica, os autores avaliaram o impacto do GLP-I, GLP-IR e do metabolito GLP-I(9-36) no sistema cardiovascular e na recuperação cardíaca. De facto, comprovaram que o GLP-I tem efeitos inotrópicos positivos através do GLP-IR, pois verificaram, que com pré-tratamento com GLP-I havia melhoria na pressão diastólica ventricular. Verificaram também que o tratamento com GLP-I(9-36) durante a fase de reperfusão aumentava significativamente a recuperação funcional. Também mediram a libertação de lactato desidrogenase (*Lactate Dehydrogenase*, LDH) durante a reperfusão em ratos *Wild type* e GLP-IR *-/-* pré-tratados com GLP-I depois da isquémia, verificando que a libertação de LDH era menor comparativamente a ratos controlo. Também foi reduzida a libertação de LDH em ratos pós-tratados com o metabolito. Concluíram então que parte do efeito protetor era realizado pelo GLP-I(9-36) e realizado por uma via independente do recetor. Neste estudo ainda foi avaliada a ação vasodilatadora, onde os resultados demonstraram que as respostas vasodilatadoras entre o GLP-I e o seu metabolito não diferiram significativamente, e que aquando do bloqueio da DPP-4 e da não conversão de GLP-I em GLP-I(9-36), a resposta vasodilatadora diminuía, mas não era totalmente abolida. Posto isto, mais uma vez foi provado que parte do efeito é realizado pela ligação ao recetor e parte realizada pelo metabolito. Percebe-se portanto, que tanto o GLP-I como o GLP-I(9-36) têm um papel importante na vasodilatação e na proteção/recuperação funcional (Ban *et al.*, 2008).

Num outro estudo onde corações de ratos isolados foram também submetidos a isquémia seguida de reperfusão, observou-se que os grupos tratados com GLP-I, comparativamente aos não tratados, apresentavam uma melhoria na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, consequência que coincide com o aumento da entrada de glicose nos cardiomiócitos, da produção de NO e da translocação do transportador I da glicose. Ainda no mesmo estudo os grupos de ratos submetidos também a isquémia/reperfusão com pré-tratamento com o metabolito demonstraram cardioproteção assim como um potente efeito vasodilatador juntamente com um aumento da libertação de GMPc, comprovando uma vez mais a importância do metabolito GLP-I(9-36) na protecção do sistema cardiovascular (Szmitko *et al.*, 2010).

A informação decorrente dos estudos acima mencionados permite concluir que o metabolito realiza ações benéficas no sistema cardiovascular. O modo como as realiza é que ainda não está bem esclarecido, mas parece fazê-lo através da ligação a um recetor específico do metabolito envolvendo diretamente a ativação da via PKB/Akt, ERK1/2 e do CREB. Ou seja, exercendo protecção através da via de sinalização PI3K e ERK1/2 (Ban *et al.*, 2010).

Agonistas do GLP-1R: Liraglutido

Nos últimos anos tem ocorrido uma forte aposta na investigação em torno da terapêutica baseada no uso de miméticos de incretinas para o tratamento da DM. As duas incretinas com maior destaque são o GLP-1 e *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP), que têm um papel importante na secreção de insulina pancreática dependente de glicose, ou seja, após a ingestão de nutrientes, e na supressão do glucagon.

O GLP-1, como anteriormente descrito, é uma hormona endócrina libertada para a corrente sanguínea pelas células L e, é essencial à manutenção da normoglicemia e da homeostase do organismo, para além de ter outros efeitos pleiotrópicos benéficos. Como o GLP-1 é rapidamente degradado pela DPP-4, a investigação tem-se focado muito na terapêutica baseada em insulinossecretores análogos do GLP-1 que são resistentes à ação da DPP-4 e, nos inibidores da DPP-4.

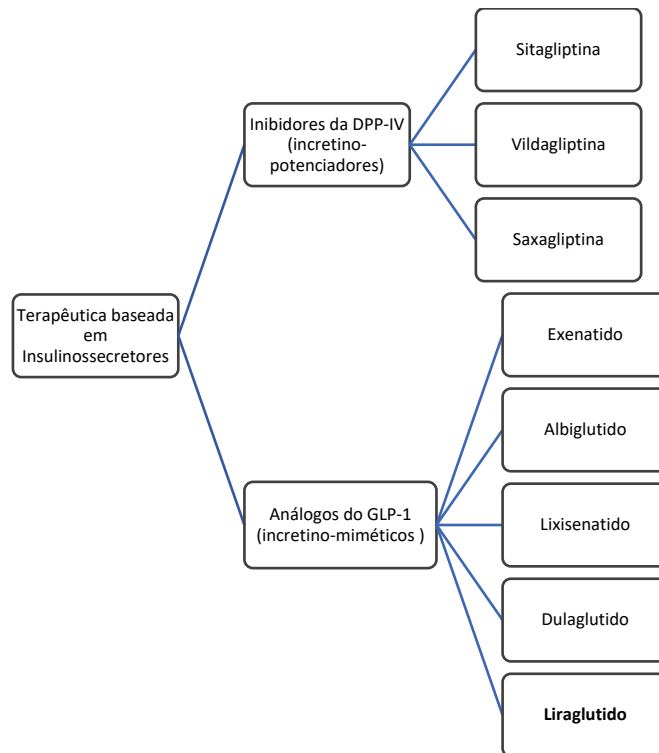


Figura 11 - Esquema dos fármacos em comercialização, utilizados na terapêutica baseada nas incretinas.

Os inibidores da DPP-4 atuam, como o próprio nome indica, pela inibição da enzima que degrada as incretinas, deste modo contribui para o aumento do GLP-1 endógeno. São fármacos com características farmacocinéticas e farmacodinâmicas que permitem a sua administração por via oral para o tratamento da DMT2. Atualmente no mercado estão comercializados a Sitagliptina, Vildagliptina e Saxagliptina, (Lorenzati *et al.*, 2010). Relativamente aos incretino-miméticos, encontram-se no mercado o Exenatido, Dulaglutido, Albiglutido, Lixisenatido e o Liraglutido para o tratamento de DMT2. São fármacos que apresentam os efeitos benéficos do GLP-1 endógeno com a particularidade de serem resistentes à degradação pela DPP-4 devido a modificações na sua estrutura.

Estas duas classes de fármacos com indicação clínica para o tratamento da DMT2 apresentarem efeitos pleiotrópicos muito vantajosos tais como, a regeneração da massa das células β , redução da taxa apoptótica, controlo glicémico com baixo risco de hipoglicemia, entre outras.

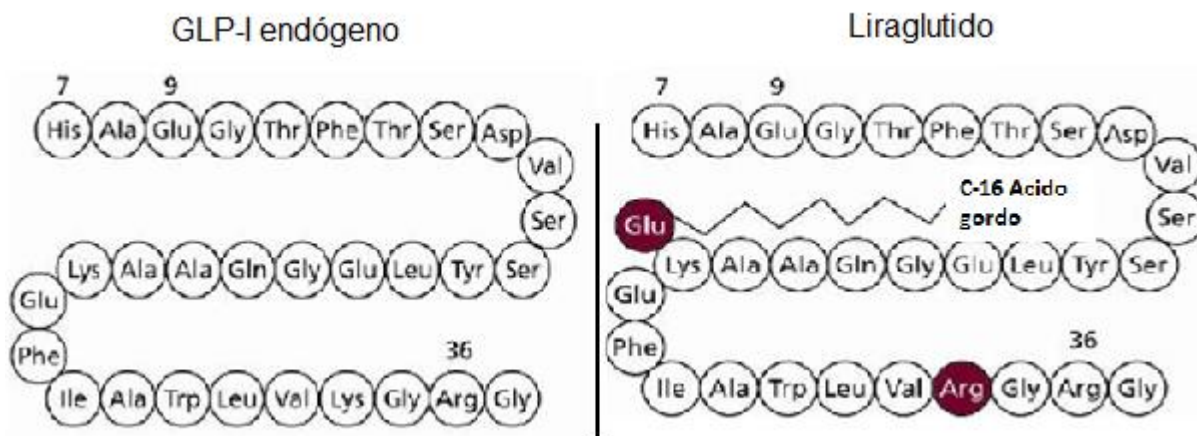


Figura 12- Comparação da estrutura do GLP-I endógeno e do Liraglutido Adaptado de: (Sjöholm e Åke, 2010).

O Liraglutido (Victoza[®]), um análogo do GLP-I humano e um agonista do GLP-1R, é um fármaco de longa duração de ação administrado por via subcutânea uma vez por dia nos humanos, com 97% de homologia da sequência de aminoácidos linear do GLP-I humano. Apresenta uma modificação no resíduo de aminoácido de lisina na posição 26, onde é conjugado ao grupo ϵ -amino o glutamato e a cadeia de ácidos gordos (16 C) (ácido palmítico) e apresenta uma substituição da lisina por arginina na posição 34 (Bode *et al.*, 2012). Estas modificações contribuem para que, após administração subcutânea, a cadeia lateral constituída pelo ácido palmítico se auto-associe formando heptâmeros no local da administração. O tamanho dos heptâmeros e a força da auto-associação retarda a absorção do Liraglutido a partir do local da injeção. Assim, o Liraglutido é absorvido mais lentamente atingindo uma concentração plasmática máxima ao fim de 8-12h após a sua administração (Rigato e Fadini, 2014). Após a passagem para a corrente sanguínea o ácido palmítico permite a formação de ligações reversíveis não-covalentes com a albumina plasmática, que juntamente com a modificação da lisina por arginina resulta numa maior resistência à ação da DPP-4, numa redução da clearance renal (CL=1,2L/h) e num volume aparente de distribuição maior (Vd=17L). O Liraglutido apresenta assim num maior tempo de semi-vida passando de cerca de 2 minutos para aproximadamente 13 horas após administração subcutânea (Lorenzati *et al.*, 2010; Pabreja *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do Liraglutido, que envolve a ligação do fármaco ao recetor do GLP-1, que resulta na ativação da cascata intracelular com consequente aumento do AMPc influencia a secreção de ambas as células β e α pancreáticas (Rigato e Fadini, 2014).

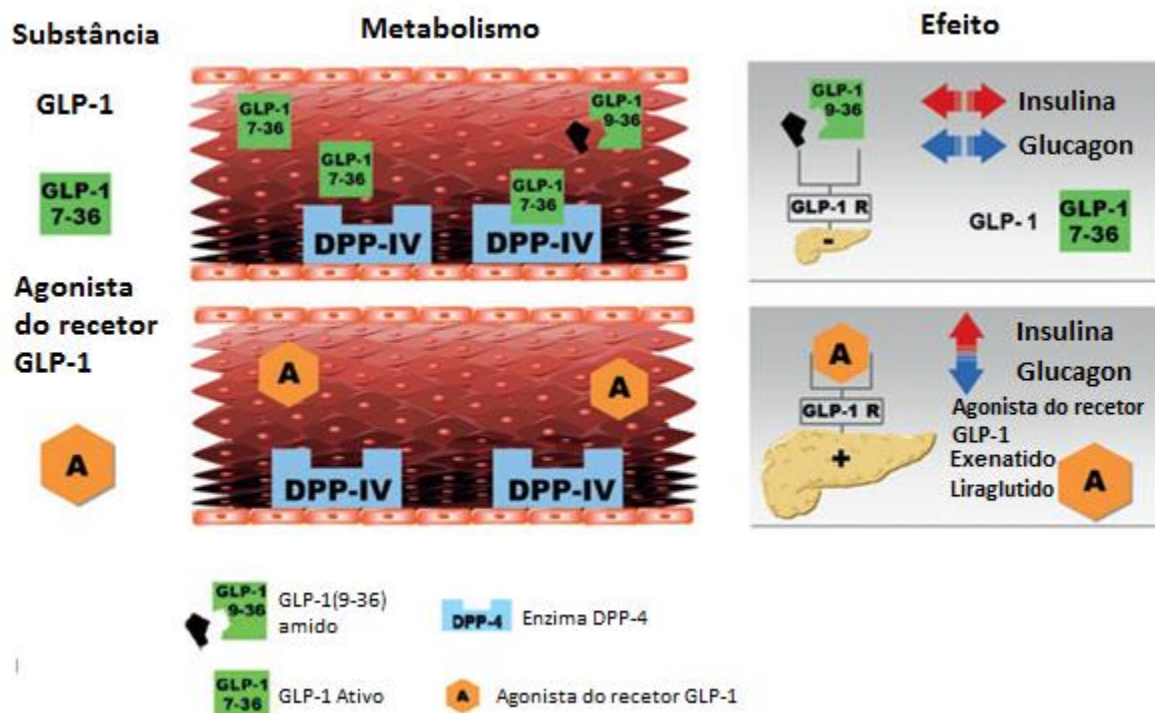


Figura 13- A) O GLP-1 está a ser rapidamente degradado pela DPP-4 em GLP-1 (9-36)-amida. B) Os GLP-IRA são resistentes à degradação pela DPP-4 contribuindo diretamente para a estimulação do GLP-IR Adaptado de: (Burgmaier, Heinrich e Marx, 2013).

O Liraglutido apresenta eficácia clínica no tratamento da DMT2, baixando os níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c) em cerca de 1%, e com a particularidade da ação insulinossecretora ser glicose dependente, apresentando baixo risco de hipoglicemia (Rigato e Fadini, 2014). Na DMT1 já foi verificado que o Liraglutido administrado em conjunto com a insulina reduz de forma modesta a HbA1c e a glicose plasmática (Janzen, Steuber e Nisly, 2016). Para além disto, ainda aumenta a proliferação das células β pancreáticas. O Liraglutido através de efeitos no sistema nervoso autónomo atrasa o esvaziamento gástrico e a secreção de ácido, reduz a hiperglicemia pós-prandial e aumenta a saciedade, levando a uma diminuição da ingestão calórica e contribuindo para a perda de peso de cerca de 2.3 Kg em 4 semanas de tratamento (Janzen, Steuber e Nisly, 2016). Já foi demonstrado também que o Liraglutido pode melhorar a função cognitiva reduzindo a deposição de placas amiloides e aumentando a longo prazo a transmissão sináptica sugerindo um efeito preventivo nos estadios iniciais da doença de Alzheimer. O Liraglutido melhora ainda a função miocárdica e endotelial e melhora o perfil lipídico e a pressão sanguínea (Rigato e Fadini, 2014).

Como todos os fármacos, o Liraglutido não é exceção e apresenta efeitos adversos, sendo os mais frequentes os efeitos gastrointestinais, tais como náuseas, vômitos e diarreia (Tasyurek *et al.*, 2014). Os efeitos adversos graves são reduzidos e comparáveis ao efeito do placebo, sendo assim considerado um fármaco com boa tolerabilidade e segurança (Bode *et al.*, 2012).

Apesar de presentemente o tratamento da DMT1 estar limitado à insulino-terapia e da utilização dos GLP-1RA ser recomendada para a DMT2, alguns dos efeitos desta nova classe farmacológica, nomeadamente a sua capacidade de inibir a apoptose das células β dos ilhéus de Langerhans e de estimular a sobrevivência destas, preconiza a sua utilização no tratamento daquele tipo de DM. Assim recentemente surgiram novas formulações compostas por GLP-1RA e insulina e estão a decorrer ensaios clínicos que associam estes fármacos a insulina numa fase inicial da doença. Os GLP-1RA preveniriam muitas das complicações micro e macrovasculares da DM através dos seus efeitos pleiotrópicos benéficos resultantes da ativação de vias de sinalização extra pancreáticas e, juntamente com insulina, conduzir a um bom controlo da glicemia e prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas à DMT1.

O que se pretende avaliar neste trabalho, recorrendo para isso a estudos funcionais em aorta isolada de rato Wistar e de um modelo animal de DMT1 induzida, é não só avaliar os efeitos do tratamento com um GLP-1RA, o Liraglutido, na resposta vasorrelaxante NO-dependente induzida pela Acetilcolina (Acetilcholine, ACh), avaliando o grau de disfunção endotelial e sua reversão/atenuação, como também caracterizar farmacologicamente a resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de ratos Wistar e de ratos diabéticos tipo I.

Temos que ter presente que se por um lado as ROS podem atuar como fator contrátil endotelial, por outro, a insulina através da ativação do seu recetor e consequentemente da via da PI3K/Akt a ele associada, pode induzir a libertação de NO num doente diabético (Cohen, 1995; Saltiel e Kahn, 2001), embora essa libertação não vai ser tão eficaz devido à pouca insulina disponível. No contexto de uma insulino-terapia instituída, dado que a hormona dependendo da via de sinalização pode induzir vasoconstrição ou vasodilatação (Katakam *et al.*, 2009), torna-se importante também determinar a interação farmacodinâmica da associação Liraglutido-insulina em termos de reatividade vascular.

Capítulo 2.

Objetivos

Objetivos

Este estudo tem como principal objetivo avaliar os efeitos de um agonista do GLP-1R, o Liraglutido (Victoza[®]), no sistema cardiovascular de animais com diabetes tipo I induzida. Assim sendo, podemos identificar como objetivos:

- Caracterizar o modelo animal de DMTI induzida avaliando o peso corporal e o perfil bioquímico, nomeadamente a glicemia, e os níveis de HbA1C e insulina.
- Através de estudos funcionais avaliar o efeito do tratamento com Liraglutido na resposta vasorrelaxante NO-dependente induzida pela ACh de aorta isolada de um modelo animal de ratos *Wistar* com DMTI induzida por estreptozotocina.
- Caracterizar farmacologicamente a resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de ratos *Wistar* e de ratos diabéticos tipo I, com recurso à execução de curvas cumulativas concentração-resposta de Liraglutido na presença e na ausência do inibidor seletivo da eNOS, o L-NAME e do antagonista seletivo do GLP-1R, o Exendin-3.
- Através da técnica de *Western blotting* quantificar a densidade do GLP-1R na aorta isolada de ratos *Wistar* e ratos diabéticos tipo I tratados e não tratados com Liraglutido, bem como avaliar a sua via de sinalização, isto é, a forma total e fosforilada da enzima eNOS.
- Complementar os estudos funcionais e moleculares através de estudos histoquímicos e imunohistoquímicos de modo a caracterizar a micro-anatomia dos anéis de aorta dos animais controlo e diabéticos tipo I e a determinar a localização celular do GLP-1R.
- Avaliar a interação farmacodinâmica da associação Liraglutido-insulina através de estudos funcionais em aorta isolada de animais controlo e diabéticos tipo I, bem como determinar a densidade da forma total e fosforilada do recetor de insulina em animais dos dois grupos, tratados e não tratados com Liraglutido.

Capítulo 3.

Material e Métodos

Materiais e métodos

Estudo *in vivo*

Modelo animal

Neste trabalho laboratorial foram utilizados ratos Wistar machos com 12 semanas, fornecidos pela *Charles River Laboratories* (Barcelona, Espanha) a metade dos quais foi induzida diabetes tipo I. Os animais foram mantidos num biotério, ventilados sob condições controladas de temperatura (22°C), humidade relativa (60%), ciclos de luz/obscuridade de 12 horas e tiveram acesso *ad libitum* a água e a uma dieta *standard* para roedores (dieta padrão 4RF21, Mucedola, Itália).

A diabetes tipo I foi induzida a metade dos animais por injeção intraperitoneal de uma dose única de estreptozotocina (*Streptozotocin*, STZ) (65 mg/Kg em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) seguida de um período de 24 horas, no qual os animais, para além da dieta, beberam solução aquosa de glicose a 10%, de forma a estimular a produção de insulina pelo pâncreas. Após 48h, os animais que apresentavam níveis de glicemia superiores a 250 mg/dL foram considerados diabéticos (Wu e Huan, 2008).

Às 14 semanas os animais Wistar controlos e diabéticos foram sujeitos a tratamento durante 15 dias, sendo divididos em dois grupos, um ao qual foi administrado subcutaneamente o fármaco Liraglutido (Victoza[®], Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) (200 µg/kg X2/dia) e outro ao qual foi administrado soro fisiológico (NaCl 0,9%, X2/dia). A última dose de tratamento foi administrada 2h antes do sacrifício do animal.

Assim para o estudo *in vivo* foram estabelecidos 4 grupos diferentes de animais. 1- Wistar controlos tratados com soro fisiológico; 2- Wistar controlos tratados com Liraglutido; 3- Wistar diabéticos tratados com soro fisiológico; 4- Wistar diabéticos tratados com Liraglutido.

Parâmetros Bioquímicos

Foram realizadas medições diárias do peso corporal. A glicemia foi monitorizada com um glucómetro (Accu-Chek Aviva, Roche, E.U.A.) a partir de um volume mínimo de sangue obtido por punção da veia da cauda, ao fim de 48h após a administração do STZ, para determinar o sucesso da indução do estado diabético, ao fim dos 10 dias para confirmação da

manutenção do mesmo e ao fim de 14 e 21 dias para monitorização do tratamento com o fármaco.

Foram também medidos os níveis de HbA1c no sangue total com uso do sistema analisador DCA systems (Siemens Healthcare, USA), bem como os níveis de insulina a partir de plasma com um sistema ELISA (Mercodia, Suécia), ambos de acordo com as indicações do fabricante.

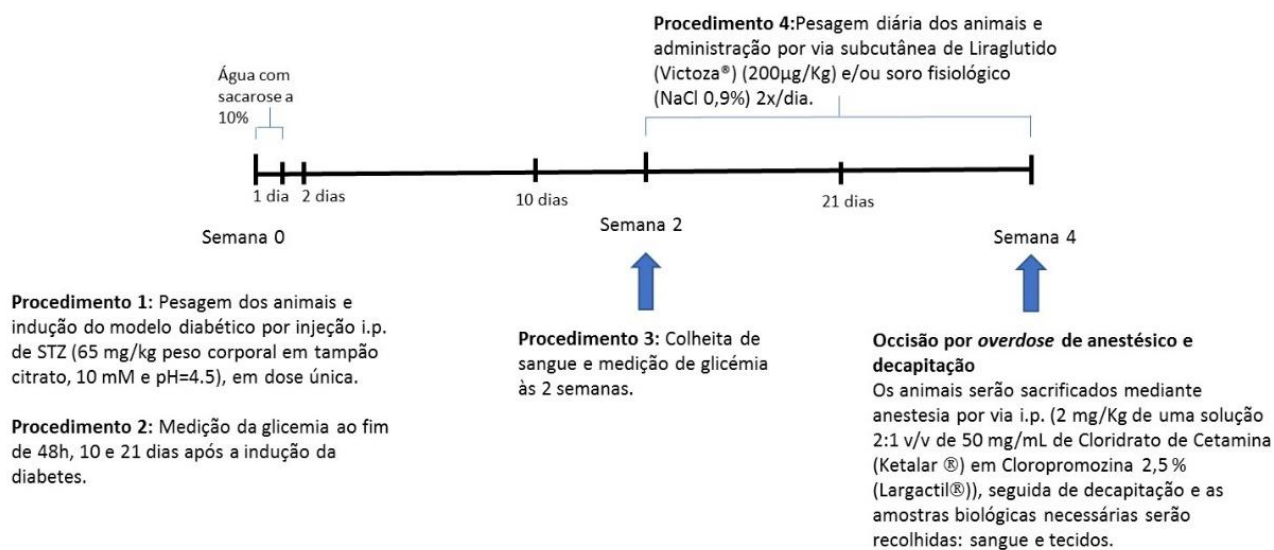


Figura 14- Protocolo experimental do estudo *in vivo*.

O protocolo experimental do estudo *in vivo* (Figura 14) foi aprovado pelo Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde os animais estiveram alojados (ID: 4-2017) e todos os procedimentos foram realizados por investigadores devidamente creditados para o efeito e de acordo com a Federação de Associações de Ciências em Animais de Laboratório (FELASA).

Estudo *in vitro*

Preparação dos órgãos

Quando atingiram as dezasseis semanas, ambos os ratos Wistar, controlos e diabéticos, foram sacrificados por decapitação após prévia anestesia com 2 mg/kg de uma solução 2:1 (v/v)

de 50 mg/mL de cloridrato de cetamina (Ketalar[®]) em clorpromazina 2,5% (Largactil[®]) através de uma injeção intraperitoneal. Recolheu-se o sangue por punção cardíaca, com agulhas heparinizadas para tubos de plasma (*Vacurette K3E K3EDTA*) e tubos para soro (*BD Vacutainer SST II Advance*); o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante quinze minutos a 4°C, e depois aliquoteado e guardado a -80°C. Após decapitação procedeu-se à excisão da aorta que foi utilizada para estudos de função vascular, moleculares e imunohistoquímicos.

Após o isolamento da aorta esta foi imediatamente colocada numa solução fisiológica de *Krebs-Henseleit*, fria e arejada com carbogénio (95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono), com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO₄.7H₂O 0,57; CaCl₂ 1,90; KH₂PO₄.2H₂O 0,90; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,1; pH 7,4, eliminando-se o tecido conjuntivo adjacente. De seguida, após eliminação do tecido conjuntivo adjacente, a aorta foi dividida em anéis com 3-4 mm de comprimento que foram suspensos entre duas ansas de fio de platina, sob uma tensão ótima basal de 19,6 mN e colocados em banhos de órgãos de 10 mL com a solução fisiológica *Krebs-Henseleit* mantida a 37°C e ligados a transdutores de força isométrica (*Letica Scientific Instruments*, Barcelona, Espanha) associados a um polígrafo (*Polygraph 4006*, *Letica Scientific Instruments*, Barcelona, Espanha) de quatro canais.

Os restantes anéis de aorta não utilizados nos estudos funcionais tiveram outros 2 destinos: 1- As aortas foram fixadas numa solução de formol tamponado a pH 6,9 e processados de forma convencional, com posterior inclusão em parafina, 2- congeladas (-80°C) para posterior lise e homogeneização.

Protocolo Experimental - Estudos Funcionais para avaliação do efeito do tratamento com Liraglutido

Após um período de equilíbrio de 2 horas durante o qual os anéis de aorta foram lavados periodicamente, procedeu-se a uma pré-incubação dos mesmos, durante 30 minutos, com 10 µM de cocaína para inibir o *uptake* neuronal, e 40 µM de Deoxicorticosterona (DOCA) para inibir o *uptake* extraneuronal, foi induzida a contração máxima do músculo liso da aorta com Noradrenalina (*Noradrenaline*, NA) exógena (10 µM), sendo esta a nossa linha de base, para posterior comparação de resultados das diferentes experiências. A partir dos platôs de contração à NA procedeu-se ao registo do relaxamento isométrico de duas curvas cumulativas concentração-resposta (CR) de Acetilcolina (*Acetylcholine*, ACh), na ausência e na

presença do éster metílico de N^G-Nitro-L-arginina (*N^G-Nitro-L-arginine methylesther*, L-NAME), um inibidor da eNOS, adicionado ao banho de órgãos 30 minutos antes da segunda curva CR, de forma a confirmar o relaxamento NO-dependente induzido pela ACh. Em todas as experiências foram utilizados anéis controlo aos quais não foi adicionado o inibidor.

Após cada curva, foi permitido um tempo de recuperação de 60 minutos, durante o qual as preparações foram lavadas com solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* até atingirem novamente o tónus basal inicial, tal como descrito em Silva e colaboradores (2007).

Em ambas as curvas, as respostas à ACh, e nomeadamente a respetiva resposta máxima ($E_{m\acute{a}x}$), foram expressas em percentagem de inibição da resposta contráctil de cada anel à NA. A potência foi traduzida através do pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar de agonista 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 2.6.2 para Windows).

Protocolo experimental – Estudos funcionais para caracterização da resposta contráctil ao Liraglutido

Paralelamente ao estudo conducente à avaliação do efeito do tratamento com Liraglutido na resposta contráctil da aorta isolada de rato à ACh e sua comparação num modelo animal de diabetes tipo I, realizaram-se estudos *in vitro* para caracterizar a resposta contráctil da aorta isolada ao fármaco. Para isso utilizaram-se igualmente ratos Wistar machos de 12 semanas que serviram de controlos e ratos Wistar aos quais foi induzida a diabetes tipo I de acordo com os procedimentos descritos. Nestes animais não se procedeu à administração do fármaco *in vivo*. Quando atingiram as dezasseis semanas, ambos os ratos Wistar, controlos e diabéticos, foram sacrificados por decapitação após prévia anestesia, e as aortas isoladas e montadas em banho de órgãos de acordo com o protocolo descrito anteriormente. Foram avaliados o peso e a glicemia pós-prandial imediatamente antes do sacrifício.

Depois do tempo de estabilização, os anéis de aorta sofreram pré-contração com 10 μ M de NA exógena. A partir do respetivo platô de contração, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta de Liraglutido.

Para caracterizar a resposta contráctil ao Liraglutido em ambos os modelos animais, realizou-se uma segunda curva cumulativa concentração-resposta (CR) na presença e na ausência de 300 nM Exendin-3 (Ex-3), um antagonista seletivo do GLP-1R, que foi adicionado

ao banho de órgão 7 minutos antes da referida curva, e também curvas CR ao Liraglutido na presença e ausência de 10 μ UI/mL de insulina. Foram também realizadas curvas cumulativas CR à insulina em animais controlo e diabéticos de forma a determinar a sua atividade intrínseca e potência, e curvas cumulativas CR à ACh na presença e ausência de Liraglutido adicionado a banho de órgão 7 minutos antes. Finalmente foram também realizadas curvas CR ao Liraglutido na presença e na ausência de 250 μ M de L-NAME em animais controlo.

Nas experiências em que se realizaram duas curvas CR, obedeceu-se a um intervalo de recuperação do tónus basal e estabilização do órgão de aproximadamente uma hora entre elas, tempo, durante o qual, o órgão foi lavado regularmente.

As respostas contráteis ao Liraglutido foram expressas em percentagem da resposta contrátil de cada anel à NA. Cada anel funcionou como controlo de si próprio, visto que a resposta ao Liraglutido na segunda curva foi calculada em percentagem da contração máxima que fora obtida na primeira curva do mesmo anel. Em todas as experiências foram utilizados anéis controlo, aos quais não foi adicionado o antagonista ou o péptido. Os resultados finais de cada ensaio foram expressos em percentagem da resposta obtida nos anéis de aorta que serviram como controlos.

As respostas contráteis do Liraglutido e da insulina foram igualmente traduzidas em mN de tensão de forma a representar a eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) e o pEC_{50} foi calculado para traduzir potência.

Reagentes e fármacos utilizados 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: Noradrenalina, Cloridrato de Acetilcolina, Cocaína, DOCA e STZ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, E.U.A.), éster metílico de N^G -Nitro-L-arginina (*N^G-Nitro-L-arginine methylester*, L-NAME), Exendin-3 (Tocris Bioscience, Bristol, GB), Liraglutido (Victoza[®] - Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca), insulina (Humulin[®] - Lilly, Lisboa, Portugal). As soluções foram preparadas com os solventes indicados pelos fabricantes.

Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais

Para a determinação das diferenças estatísticas entre os 4 grupos dos estudos *in vivo* (diabéticos/controlos, tratados/não-tratados com Liraglutido) dos valores da pEC_{50} e $E_{m\acute{a}x}$ da

ACh, foi utilizado o teste ANOVA (Analysis of variance) seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas e o teste de *t* de Student para dados não emparelhados para comparação da resposta contrátil de aorta isolada de ratos dos 4 grupos à ACh na ausência e na presença de L-NAME.

Quanto ao tratamento estatístico dos resultados dos estudos *in vitro*, foram avaliadas as diferenças entre os valores de $E_{m\max}$ e pEC_{50} do Liraglutido e da insulina em animais controle e diabéticos, bem como as diferenças entre as respostas contráteis induzidas por cada dose da curva CR de Liraglutido realizada na ausência e na presença de L-NAME, Ex-3 e insulina. Para calcular as diferenças estatísticas foi utilizado o teste *t* de Student para dados não emparelhados. 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 em valores médios \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de anéis de aorta (*a*) por animal (*n*) indicado.

Relativamente aos parâmetros bioquímicos dos estudos *in vivo* a análise e comparação dos dados obtidos para os níveis de glicose plasmática, HbA1c e insulina, a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste de Tukey de comparações múltiplas, uma vez verificada pela análise de variância (*Analysis of Variance*, ANOVA) que as amostra não provinham da mesma população. Todos os dados foram processados e analisados por métodos computacionais, nomeadamente *GraphPad Prism* PC Software e *IBM SPSS Statistics*.

Estudos moleculares

Preparação de lisados para Western Blotting

Os anéis de aorta foram cortados em pequenas porções e colocados num potter, à razão de 100 mg de aorta para 300 μ L de RIPA (150 mM de NaCl; 50 mM de Tris-base; 5mM de EGTA; 1% de Triton; 0.5% de DOC; 0.1% SDS) suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks, Roche) e fosfatases (PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks, Roche). Após a homogeneização mecânica as amostras foram mantidas durante 1h em gelo e seguidamente foram sonicadas 5x a uma frequência de 40 Hz, sendo posteriormente centrifugadas durante 10 minutos à temperatura de 4°C e a 16000 g. Após este processo, foi recolhido o sobrenadante correspondente ao extrato total, aliquoteado e guardado para posterior determinação da concentração de proteína pelo método do ácido bicinonínico (*bicinchoninic acid*, BCA) (Pierce, Rockfor, IL, E.U.A.).

Após a quantificação da concentração de proteína procedeu-se à desnaturação das alíquotas com tampão Laemmli para posterior análise electroforética.

Protocolo experimental de determinação da densidade de GLP-1R, eNOS, eNOSp, recetor da insulina, e recetor de insulina fosforilado por Western Blotting

Na análise por *Western Blotting*, foram carregadas 30 µg de proteína por poço em géis de poliacrilamida de SDS-8% (SDS-PAGE) onde as amostras foram posteriormente separadas por eletroforese em tampão de corrida 125 mM Tris (pH 8,3) contendo 125 mM bicina e 0,5% (m/v) SDS, a 140 V. Seguiu-se a eletrotransferência para as membranas de fluoreto de polivinilideno (polyvinilidene fluoride, PVDF), onde a transferência do *Western Blot* decorreu em tampão de eletrotransferência (CAPS 100 mM, pH=11) durante 1h30m a 0,75 A e à temperatura de 4°C. De modo a evitar ligações inespecíficas, os locais proteicos residuais das membranas foram bloqueados, incubando-se com uma solução de TBS-T 1% e BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 5% (m/v) para as formas fosforiladas, ou com uma solução de TBS-T 1% e leite a 5% (m/v) para as formas totais em tampão Tris salino (TBS: 20 mM Tris (pH 7,6) e 150 mM NaCl, contendo 0,1% (v/v) Tween-20 (TBS-Tween)), durante 1 hora sob agitação e à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela I) diluído em TBS-T suplementado com 1% (m/v) de leite desnatado ou 5% (m/v) de BSA, durante a noite, a 4°C, seguida de mais 1h de incubação à temperatura ambiente. No fim, procedeu-se às lavagens das membranas com TBS-T 1% durante 45 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (Tabela I) sob agitação, durante 1h30m e à temperatura ambiente. No fim deste procedimento procedeu-se novamente a lavagens com TBS-T. A intensidade das bandas foi seguidamente detetada utilizando o kit Western Bright Sirius. O substrato foi adicionado à membrana e a revelação das membranas foi realizada no sistema de deteção de luminescência VersaDoc (BioRad, EUA), sendo posteriormente analisada e quantificada com recurso ao software Image studio Lite Ver 5.2 (Li-cor Biosciences, Nebraska USA). No final deste procedimento, de modo a se confirmar a existência de uma quantidade equivalente de proteína e avaliar se a transferência havia sido bem efetuada, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-actina β e respectivo anticorpo secundário (Tabela I). Para normalizar os dados, utilizou-se a β-actina como uma proteína de *loading*. A densidade óptica das bandas foi quantificada com recurso ao software Image studio Lite Ver 5.2, e os resultados foram normalizados em função dos resultados para a β-actina correspondente.

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 ANOVA seguida do método de Tukey de comparações múltiplas. Os valores de $P < 0,05$ 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*.

Reagentes e Soluções usados na técnica *Western Blotting*

Os reagentes usados foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). E os anticorpos primários e secundários utilizados foram:

Anticorpo	Peso molecular	Diluição	Fabricante
Anticorpo de ratinho anti-p-eNOS (pS1177)	140 KDa	1:250	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA)
Anticorpo de ratinho anti-eNOS/ NOS Type III	140 KDa	1:250	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA)
Anticorpo policlonal de coelho anti-GLP-IR	53 KDa	1:400	Abcam
Anticorpo policlonal de coelho anti-receptor de insulina (phospho Y1361)	97 KDa	1:1000	Abcam
Anticorpo monoclonal de ratinho insulina Rβ (CT-3): sc-57342	95KDa	1:100	Santa Cruz Biotechnology, INC.
Anticorpo monoclonal anti-Actin	42 KDa	1:10000	Sigma-Aldrich Co.
Alkaline phosphatase conjugate secondary anti-mouse	-	1:10000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Alkaline phosphatase conjugate secondary anti-rabbit	-	1:10000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Tabela 1- Anticorpos utilizados na técnica de *Western Blotting*, peso molecular da proteína, a diluição utilizada e o fabricante ao qual o anticorpo foi encomendado.

Protocolo experimental de determinação da localização celular do GLP-1R por Imunohistoquímica

Foram realizados estudos histoquímicos com o objetivo de determinar a natureza elástica da artéria submetida a estudo, alterações da sua micro-anatomia ou possíveis alterações induzidas pela patologia.

Começou-se por realizar cortes histológicos de aproximadamente 3 µm de espessura de amostras representativas dos animais Wistar controlo e Wistar diabéticos, que foram sujeitos a coloração com hematoxilina/eosina convencional (HE). Posto isto, outros 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). De seguida incubou-se os cortes em tampão citrato 10% (v/v), pH 6 (solução *Bond Epitope Retrieval*, Leica Biosystems), durante 20 minutos, para recuperar os epítomos, sendo seguidamente lavados e incubados durante 5 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-1R de rato (*Bioss*, E.U.A.), diluído (1:200) na solução de diluição *Bond Primary Antibody Diluent* (Leica Biosystems) durante 15 minutos. Os cortes foram novamente lavados, e incubados com um anticorpo de união pós-primário (*Post Primary BOND*, Leica Biosystems) durante 8 minutos. Seguiu-se uma nova lavagem onde os cortes foram incubados agora com um reagente polimérico que inclui conjugados de anticorpos terciários de peroxidase polimérica de rábano picante (HRP) (*Polymer BOND*, Leica Biosystems) durante 8 minutos. Por fim, os cortes foram novamente lavados com solução tampão seguindo-se uma lavagem com água destilada. Realizou-se a revelação dos cortes com o cromogénio diaminobenzidina (*Mixed DAB Refine BOND*, Leica Biosystems) durante 10 minutos, e após uma nova lavagem com água destilada, foram contrastados com hematoxilina (*Hematoxylin BOND*, Leica Biosystems) durante 5 minutos. E por fim fez-se se a diafanização, desidratação e montagem em meio sintético DPX. Os cortes foram então, analisados no microscópio ótico Nikon *Eclipse 80i*.

Capítulo 4.

Resultados

Resultados

Resultados do estudo *in vivo*

Caracterização do modelo animal de DTI induzida

Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento com Liraglutido no sistema cardiovascular de animais com DMTI induzida, paralelamente à resposta vasorrelaxante à ACh da aorta isolada destes animais e de animais controle, foi avaliada a glicemia pós-prandial, a HbA1c, a insulina e o peso corporal (Tabela 2), assim como a percentagem de perda de peso (Figura 15).

No que diz respeito ao peso corporal, os ratos controles foram os mais pesados, e os restantes grupos apresentam diferenças estatisticamente significativas relativamente ao grupo controle ($P < 0,05$). Verificou-se ainda que entre os grupos tratados com o fármaco, o grupo diabético (WL-STZ) apresentou o peso mais baixo. Ainda em termos de peso e olhando agora para a Figura 15, observa-se que os ratos ao fim de 15 dias de tratamento (Liraglutido ou salino) apresentaram perda de peso, com a exceção do grupo controle. Os ratos sujeitos a tratamento com fármaco apresentaram uma maior percentagem de perda de peso corporal quando comparados com os tratados com salino, tendo diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). O grupo dos ratos diabéticos tratados com salino (W-STZ) apresentou também diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo controle.

Relativamente à HbA1c houve diferenças estatísticas entre os grupos diabéticos relativamente aos grupos controles, como expectável. Entre os dois grupos diabéticos (tratado com Liraglutido e com salino) não houve diferenças estatisticamente significativas, porém temos que ter presente que os animais foram sujeitos apenas a 1 mês de diabetes e a 2 semanas de tratamento.

A glicemia pós-prandial também está de acordo com as expectativas sendo que os diabéticos apresentaram valores muito elevados comparativamente com os controles, e com significância estatística ($P < 0,05$).

Por fim, os níveis de insulina foram substancialmente mais baixos nos grupos diabéticos apresentando significância estatística relativamente aos grupos controles.

Em conclusão os resultados destes parâmetros bioquímicos permitiram garantir o modelo animal de DTI que pretendíamos utilizar para estudar os efeitos extra-pancreáticos do tratamento com Liraglutido no sistema cardiovascular.

Relativamente aos animais diabéticos temos que fazer uma ressalva, pois os resultados apresentados na tabela incluem as amostras com concentrações dentro dos limites de deteção do kit ELISA utilizado para quantificar a insulina. No caso das amostras de W-STZ, foram testadas 8 amostras, no entanto apenas 3 apresentaram valores dentro da janela de deteção do kit, sendo que 5 foram descartados por se encontrarem abaixo do respetivo limite de 0,15 µg/L. A situação repetiu-se com o grupo WL-STZ, onde foram testadas 8 amostras e destas, apenas 5 apresentaram concentrações no sangue superiores ao limite de deteção.

	W Controlo	W Liraglutido	W-STZ Controlo	W-STZ Liraglutido	n/ grupo
Peso (g)	371,40 ± 7,94	325,36 ± 6,59*	296,08 ± 10,13*	271,8 ± 4,45*§	5-6
HbA1C (%)	3,60 ± 0,04	3,94 ± 0,22	8,04 ± 0,31*§	7,90 ± 0,14*§	4-5
Glicemia (mg/dL)	107,78 ± 2,44	103,89 ± 3,20	523,88 ± 29,54*§	487,25 ± 13,76*§	8-9
Insulina (µg/L)	1,76 ± 0,34	1,27 ± 0,15	0,26 ± 0,07*§	0,35 ± 0,09*§	3-8

Tabela 2- Avaliação e comparação do perfil bioquímico de ratos Wistar e ratos diabéticos tipo I (STZ) tratados e não tratados com Liraglutido: WC, Ratos Wistar controlo; WL, Ratos Wistar tratados com Liraglutido; W-STZ, Ratos Wistar diabéticos tipo I e WL-STZ, Ratos Wistar diabéticos tipo I tratados com Liraglutido (200 µg/Kg, 2x/dia). Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. $P < 0,05$; * vs. WC; § vs. WL.

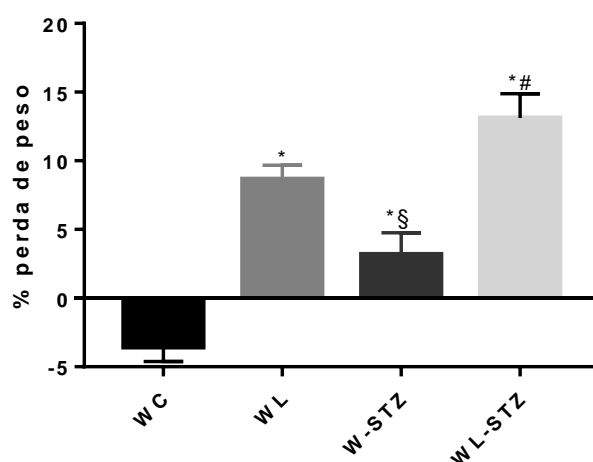


Figura 15 – Comparação da perda de peso no final do tratamento com Liraglutido: WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido; W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido (200µg/Kg, 2x/dia). Os resultados estão expressos como média ± S.E.M. de 8-9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M.; as diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Turkey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; * vs. WC; § vs. WL; # vs. W-STZ.

Estudo da resposta vasorrelaxante à ACh da aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI tratados com Liraglutido.

A ACh é o neurotransmissor do Sistema Nervoso Autónomo Parassimpático que medeia o relaxamento endotélio-dependente da musculatura lisa no sistema cardiovascular, através da produção de NO. Tanto na Tabela 3 como pela Figura 16 podemos observar os resultados obtidos pela análise das curvas concentração-resposta da ACh na aorta isolada de ratos Wistar e ratos DTI sujeitos ou não a tratamento com Liraglutido durante 15 dias.

A ACh, testada em concentrações de 0,01 to 90 μM , induziu relaxamentos dependentes da concentração na aorta isolada de rato nos diferentes grupos em estudo.

Relativamente ao efeito máximo foi o grupo Wistar com administração *in vivo* de Liraglutido aquele que apresentou um maior relaxamento induzido pela ACh ($P < 0,05$). Curiosamente entre os grupos de ratos diabéticos, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, o grupo WL-STZ relaxou menos do que o W-STZ. Quanto ao pEC_{50} verificou-se uma perda de potência nos grupos de animais diabéticos relativamente aos grupos controlo. Assim pode-se afirmar que a ACh foi mais potente nos controlos do que nos diabéticos, e entre os grupos controlo, no grupo WL foi tendencialmente mais potente, como se pode verificar pelos dados da Tabela 3 e pela observação de um ligeiro desvio para a esquerda na Figura 16. Assim, ao contrário dos animais controlo, o tratamento com Liraglutido parece comprometer o efeito vasorrelaxante da ACh nos animais diabéticos, com uma redução não significativa da resposta máxima e da potência.

	$E_{m\acute{a}x}$ (%NA)	pEC_{50} ($-\log[M]$)	a/n
WC	38,99 ± 4,00	6,29 ± 0,16	18/5
WL	52,61 ± 4,95 *	6,48 ± 0,17	18/5
W-STZ	21,16 ± 2,45 *§	5,59 ± 0,09 *§	20/5
WL-STZ	17,81 ± 2,90 *§	5,48 ± 0,09 *§	19/5

Tabela 3- Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para a ACh em aorta isolada de ratos Wistar controlo (WC), ratos Wistar controlo tratados com Liraglutido (WL), ratos Wistar diabéticos tipo I (W-STZ) e ratos Wistar diabéticos tipo I tratados com Liraglutido (WL-STZ). $E_{m\acute{a}x}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pela noradrenalina (NA); pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de ACh necessária para induzir 50% da resposta máxima. A coluna a/n representa o quociente entre o número de anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se retiraram os anéis. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M e as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; * vs. WC; § vs. WL.

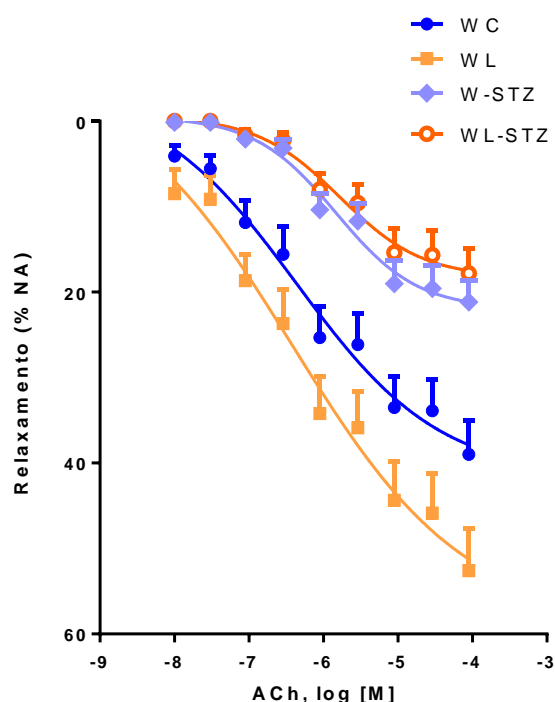


Figura 16- Relaxamento induzido pela ACh (em % de inibição da contração induzida pela NA) em anéis de aorta isolada de ratos Wistar e DTI tratados e não tratados com Liraglutido; WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 µg/Kg, 2x/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. Os resultados estão expressos como média ± S.E.M. do número de experiências indicado na Tabela 3, sendo que as barras verticais representam o S.E.M..

Efeito do L-NAME na resposta vasorrelaxante à ACh da aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI tratados com Liraglutido

Para comprovar que a resposta vasorrelaxante à ACh das aortas isoladas dos 4 grupos de estudo é NO-dependente, utilizou-se o L-NAME, um inibidor da isoforma endotelial da NOS, na concentração de 250 μM . A pré-incubação com L-NAME praticamente aboliu a resposta vasorrelaxante à ACh nos quatro grupos de animais, demonstrando um antagonismo de tipo não competitivo com redução significativa da resposta máxima ($E_{\text{máx}}$) (Figura 17 a, b, c e d) e confirmando que o relaxamento induzido pela ACh ocorre segundo uma via de sinalização NO-dependente.

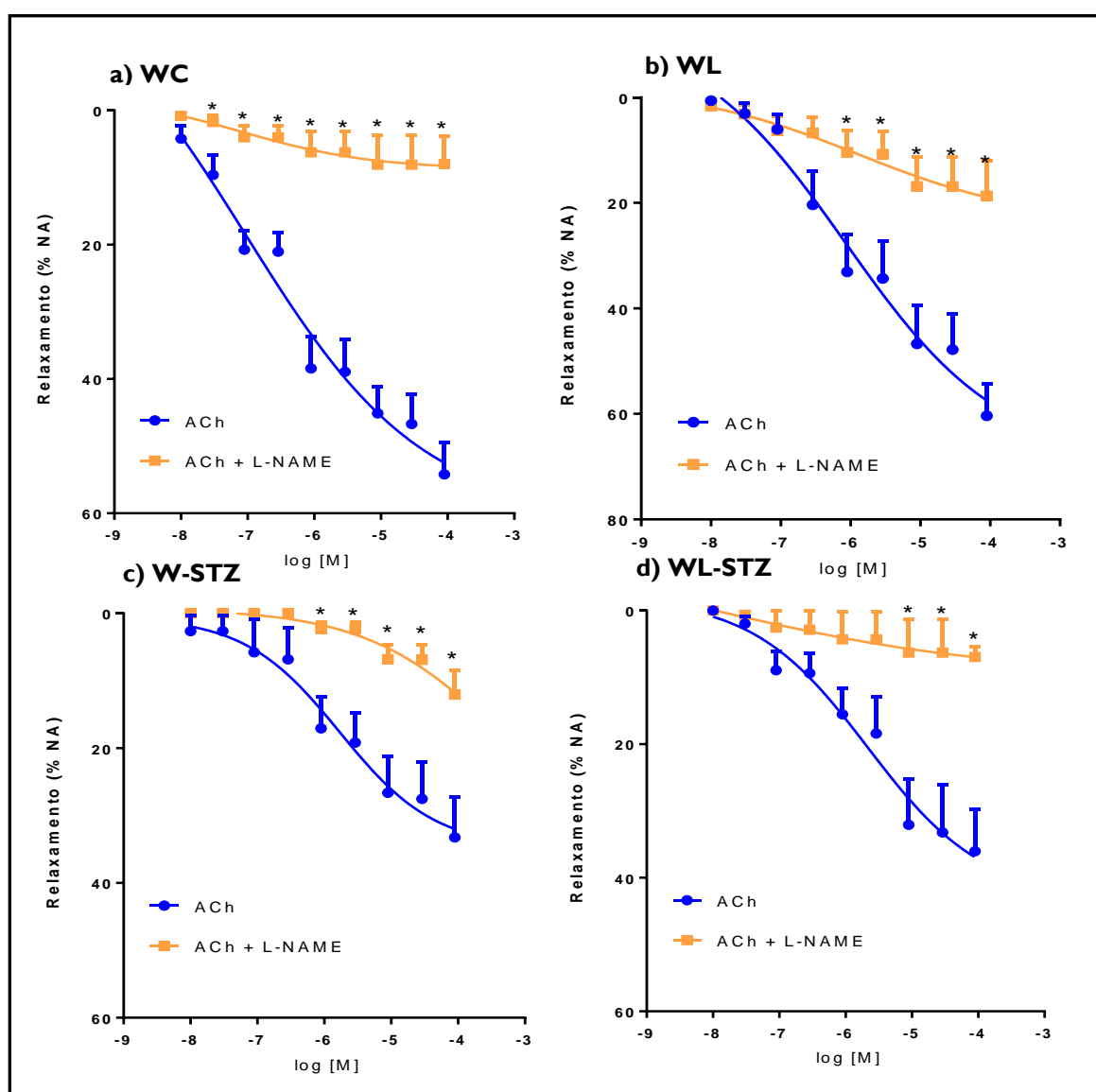


Figura 17- Resposta vasorrelaxante da aorta isolada de ratos WC, WL, W-STZ e WL-STZ à Acetilcolina na ausência e na presença de 250 μM de L-NAME. Os resultados encontram-se expressos em médias \pm S.E.M. de 9-10 experiências por grupo; as barras verticais representam S.E.M. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste *t*-Student. * $P < 0,05$ vs. ACh.

Resultados do estudo *in vitro*

Caracterização da resposta contrátil da aorta isolada de rato ao Liraglutido

Com o intuito de caracterizar farmacologicamente a resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de ratos Wistar e de ratos diabéticos tipo I, foram executadas curvas cumulativas concentração-resposta de Liraglutido na presença e na ausência do inibidor seletivo da eNOS, o L-NAME, em ratos Wistar, e do antagonista seletivo do GLP-1R, o Exendin-3, nos dois modelos animais, não sujeitos a tratamento *in vivo*.

Dados demográficos e bioquímicos dos animais Wistar e DTI não sujeitos a tratamento

Os dados demográficos e bioquímicos dos animais não sujeitos a tratamento com Liraglutido *in vivo* também foram recolhidos; tanto os 13 ratos Wistar controlo como os 10 ratos diabéticos tipo I foram pesados e foram medidas as glicemias pós-prandiais no dia do sacrifício. Como se pode observar na Tabela 4, o peso corporal dos animais controlo foi significativamente superior ($P < 0,05$) quando comparado com o dos animais diabéticos. Inversamente, e como expectável, a glicemia pós-prandial no grupo diabético foi largamente superior, apresentando também diferenças estatísticas relativamente ao grupo controlo.

	WC	W-STZ	n
Peso (g)	378,69 ± 8,52	292,00 ± 5,68*	10-13
Glicemia (mg/dL)	109,23 ± 2,28	526,80 ± 20,62*	10-13

Tabela 4- Dados demográficos e bioquímicos dos grupos de animais não sujeitos a tratamento: WC, ratos Wistar controlo; W-STZ, ratos Wistar diabéticos tipo I. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M.; n=10-13 por grupo; as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t-Student. * $P < 0,05$ vs. WC.

Efeito do L-NAME na resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar

Contrariamente ao que seria expectável dada a via de sinalização PI3K/Akt/eNOS associada ao GLP-1R, nos anéis de aorta isolada de rato Wistar, o Liraglutido provocou, não relaxamento, mas uma contração dependente da concentração, dentro da gama de concentrações usadas (0,05 nM a 111,1 nM) como demonstra a Figura 18, na qual é possível

visualizar uma curva CR ao Liraglutido após previa contração com 10 μM de NA. Na presença de 250 μM de L-NAME, o inibidor seletivo da eNOS (Figura 19), não foram registadas diferenças estatisticamente significativas, o que levou a concluir que a resposta contráctil ao Liraglutido não é NO-dependente.

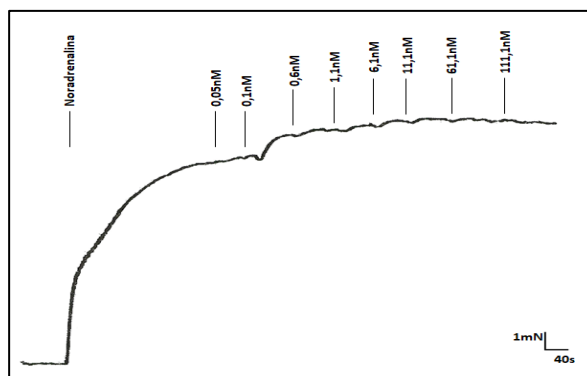


Figura 18- Registo representativo de uma curva concentração-resposta ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar, após pré-contração com 10 μM Noradrenalina.

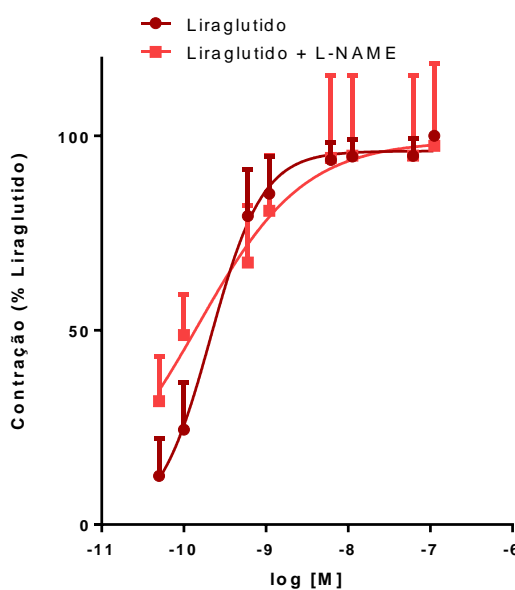


Figura 19-Resposta contráctil da aorta isolada de ratos Wistar controlo ao Liraglutido, na presença e ausência de L-NAME (250 μM). Os resultados encontram-se expressos em valores médios \pm S.E.M. de 4 experiências, sendo que as barras verticais representam o S.E.M..

Efeito do Exendin-3 na resposta contráctil ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI

De modo a perceber se a resposta contráctil ao Liraglutido era mediada pelo recetor do GLP-1, as aortas isoladas tanto de animais controlo (Figura 20a), como as de animais

diabéticos tipo I (Figura 20b) foram sujeitos a curvas CR ao Liraglutido na ausência e na presença de 300 nM de Exendin-3 (Ex-3), antagonista seletivo do GLP-1R.

Deste modo, foi possível verificar que a presença de Ex-3 provocou alterações significativas na curva CR ao Liraglutido, no caso dos ratos Wistar (Figura 20a), com uma redução significativa da resposta máxima ($E_{\text{máx}}$ do Liraglutido + Ex3 de $42,08 \% \pm 11,31$, $n=7$ vs. $E_{\text{máx}}$ Liraglutido de $100 \% \pm 0,00$, $n=15$; $P<0,05$, teste t-Student), dentro da janela de concentrações utilizada, sem alteração da potência (pEC_{50} do Liraglutido + Ex3 de $9,18 \pm 0,28$, $n=7$ vs. pEC_{50} Liraglutido de $8,99 \pm 0,29$, $n=7$) e que a resposta contrátil ao Liraglutido é parcialmente mediada pelo GLP-1R. No caso dos anéis de aorta provenientes de ratos diabéticos tipo I (Figura 20b), não se verificaram alterações na presença do antagonista, nem na resposta máxima nem na potência.

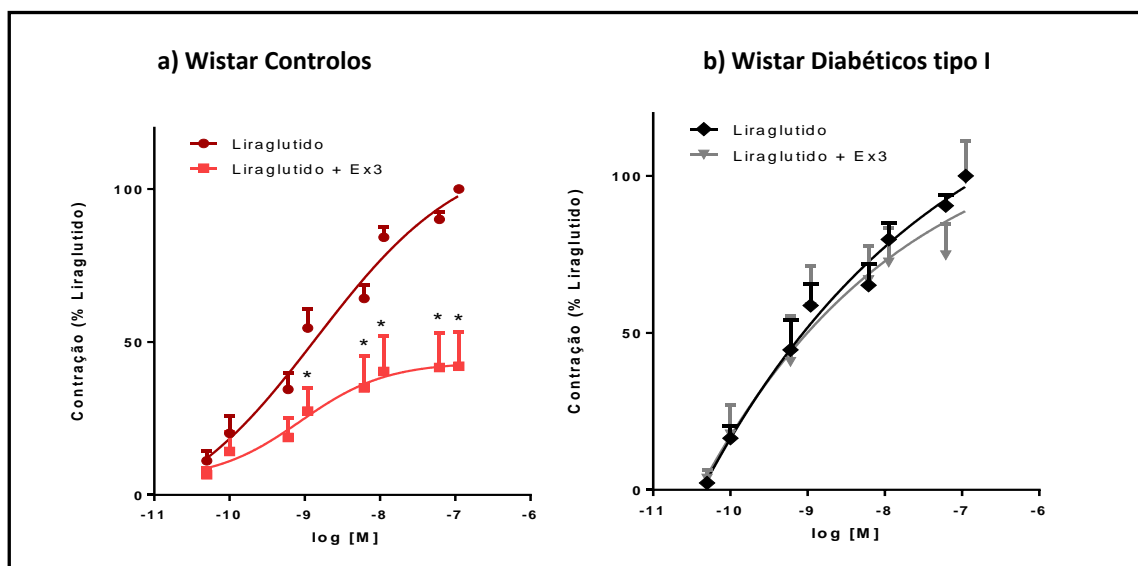


Figura 20- Comparação da resposta contrátil da aorta isolada de rato Wistar controlo (a) e Wistar diabético tipo I (b) ao Liraglutido na presença e ausência de (300nM) de Exendin-3. Os resultados encontram-se expressos em valores médios \pm S.E.M. de 7 a 15 experiências para (a) e de 8 a 11 experiências para (b) sendo que as barras verticais representam S.E.M. e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste t-Student. $P<0,05$; * vs. Liraglutido.

Efeito da insulina na resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de rato Wistar e de rato DTI

Com o objetivo de avaliar a interação farmacodinâmica da associação Liraglutido-insulina em aorta isolada de ratos controlo e ratos diabéticos tipo I, à semelhança dos ensaios

anteriores, as aortas isoladas dos dois grupos de animais foram sujeitas a curvas CR ao Liraglutido na presença e ausência de 10 $\mu\text{UI/mL}$ de insulina de modo a compreender o potencial contrátil de uma insulina de ação intermédia em concentrações que mimetizam as concentrações plasmáticas de insulina entre refeições (8 a 11 $\mu\text{UI/mL}$) e o possível efeito de uma formulação injetável de Liraglutido/insulina em doentes com DMT1.

No caso dos ratos Wistar controlo (Figura 21a) verificou-se um desvio para a direita da curva CR do Liraglutido na presença de insulina, mas sem uma redução de resposta máxima, dados que levam a crer que existe algum tipo de antagonismo do tipo competitivo entre a insulina e o Liraglutido. De facto, os dados do $p\text{EC}_{50}$ traduziram uma perda de potência estatisticamente significativa ($p\text{EC}_{50}$ do Liraglutido + insulina de $8,25 \pm 0,18$, $n=8$ vs. $p\text{EC}_{50}$ Liraglutido de $8,72 \pm 0,10$, $n=13$; $P<0,05$, teste t -Student), sem alteração da resposta máxima.

Na resposta contrátil de ratos diabéticos tipo I ao Liraglutido (Figura 21b), a insulina aparentou ter uma tendência para potenciar o efeito contrátil do Liraglutido ($E_{\text{máx}}$ do Liraglutido + insulina de $117,67 \% \pm 15,61$, $n=11$ vs. $E_{\text{máx}}$ Liraglutido de $100 \% \pm 0,00$, $n=11$), no entanto, não existem diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$), nem em termos de resposta máxima, nem em termos de potência.

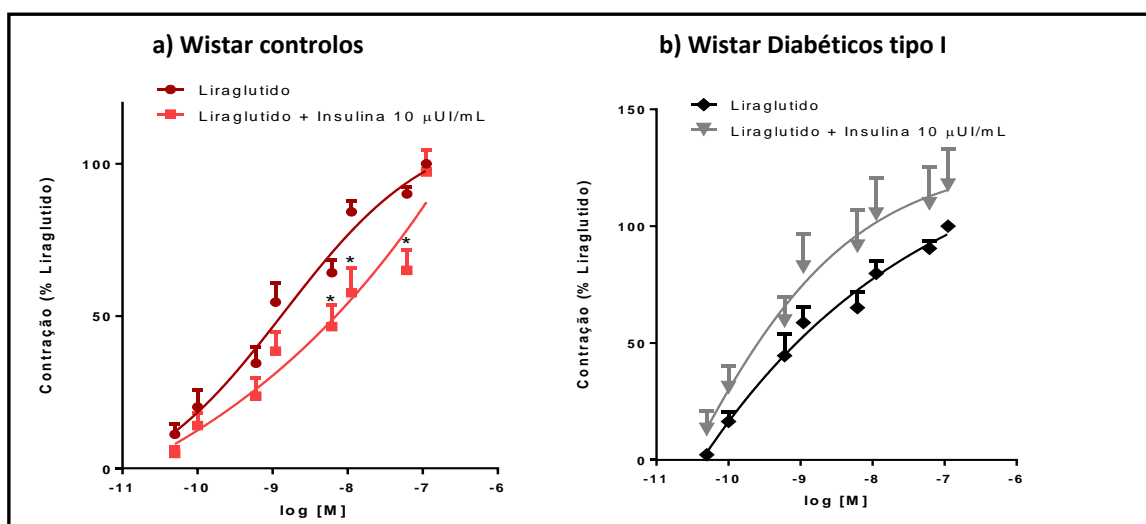


Figura 21- Comparação da resposta contrátil da aorta isolada de rato Wistar controlo (a) e diabético tipo I (b) ao Liraglutido na presença e ausência de 10 $\mu\text{UI/mL}$ de insulina. Os resultados encontram-se expressos em valores médios \pm S.E.M. de 9 a 15 experiências para (a) e de 11 experiências para (b), sendo que as barras verticais representam S.E.M. e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste t -Student. $P < 0,05$; * vs. Liraglutido.

Caracterização farmacológica das respostas contrácteis de aortas isoladas de ratos Wistar e ratos DTI ao Liraglutido e à insulina

Na sequência dos resultados anteriores, achámos pertinente analisar a resposta contráctil da aorta isolada à insulina. De facto, nos anéis de aorta isolada de rato Wistar, à semelhança do Liraglutido, a insulina provocou uma contração dependente da concentração, dentro da gama de concentrações usadas (0,0089 nM a 19 nM) como se pode visualizar na curva CR representativa da Figura 22.

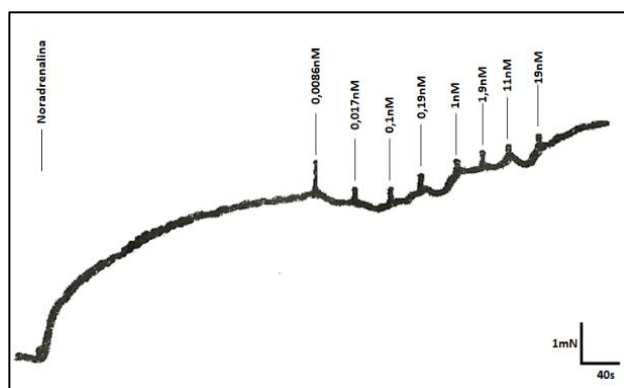


Figura 22- Registo representativo de uma curva concentração-resposta à insulina em aorta isolada de rato Wistar, após pré-contracção com Noradrenalina.

Na Tabela 5 constam os parâmetros farmacológicos de resposta máxima ($E_{máx}$) e potência (pEC_{50}) dos dois fármacos nos dois modelos animais. Quanto ao efeito máximo, não houve diferenças estatisticamente significativas, sendo que o Liraglutido e a insulina foram tendencialmente mais eficazes a induzir a contração nos animais diabéticos. O mesmo se pode dizer do Liraglutido em relação à insulina em ambos os modelos animais. No que diz respeito à potência do Liraglutido em induzir contração, este demonstrou ter sido significativamente mais potente em animais diabéticos.

	$E_{m\acute{a}x}$ (mN) WC	$E_{m\acute{a}x}$ (mN) W-STZ	pEC_{50} (-log[M]) WC	pEC_{50} (-log[M]) W-STZ	a/n WC	a/n W- STZ
Liraglutido	0,94 ± 0,07	0,96 ± 0,05	8.72 ± 0,10	9,16 ± 0,08*	48/13	38/10
Insulina	0,64 ± 0,11	0,77 ± 0,11	9,25 ± 0,19	9,56 ± 0,26	7/2	7/2

Tabela 5- Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pEC_{50} para o Liraglutido e insulina em aortas isoladas de ratos Wistar controlos e ratos Wistar diabéticos tipo I não sujeitos a tratamento *in vivo*. O valor de $E_{m\acute{a}x}$ traduz o máximo de contração em mN de tensão, enquanto que o valor de pEC_{50} traduz o logaritmo negativo da concentração molar do agonista necessária a induzir 50% da resposta máxima. A coluna a/n representa o quociente entre os anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se retiraram os anéis. Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t*-Student. $P < 0,05$; *vs. WC.

Efeito do Liraglutido na resposta vasorrelaxante à ACh em aorta isolada de rato Wistar e rato DTI

Finalmente achámos também pertinente esclarecer se o Liraglutido, *in vitro*, mimetizando uma administração aguda, teria um efeito no vasorrelaxamento NO-dependente induzido pela ACh, diverso do observado após tratamento *in vivo*. Assim realizaram-se curvas CR à ACh (Figura 23) na presença e ausência de 1 μ M de Liraglutido em aortas isoladas de ratos Wistar e ratos diabéticos tipo I.

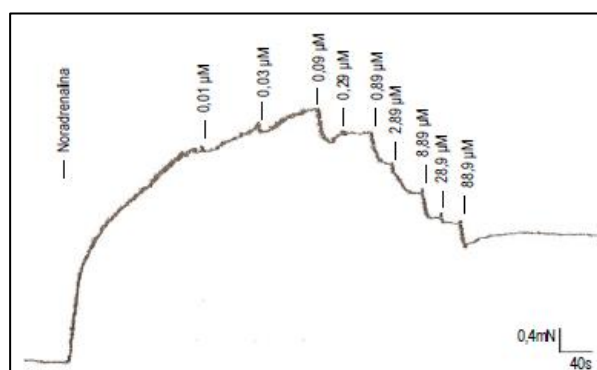


Figura 23: Registo representativo de uma curva concentração-resposta à Acetilcolina na aorta isolada de rato Wistar, após pré-contração com Noradrenalina.

Em termos de resposta máxima (Tabela 6) verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, no entanto existe uma tendência para um maior relaxamento nos animais com pré-incubação com Liraglutido quando comparados com os seus controlos (Figura 24), sendo que o grupo que apresentou maior resposta máxima foi o dos ratos Wistar controlos com pré-incubação com Liraglutido. Da ANOVA realizada seguida do

teste de comparações múltiplas de Tukey, as diferenças estatisticamente significativas apenas foram observadas nas doses de 0,01 μM , 0,09 μM e 0,29 μM ACh nos ratos diabéticos quando comparados com os ratos controlos na presença de Liraglutido.

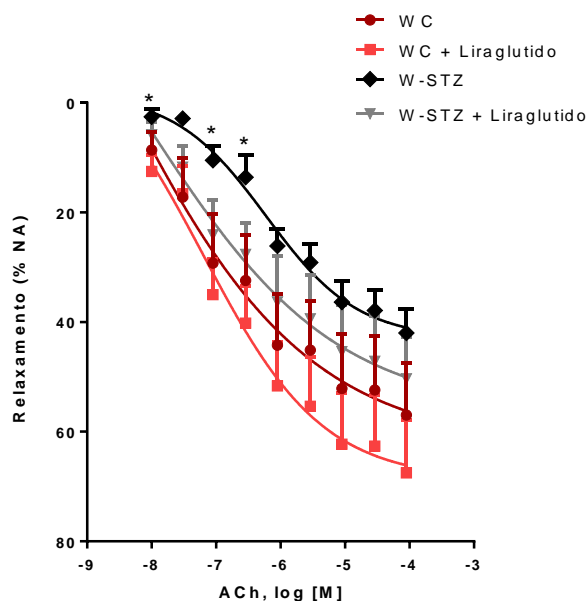


Figura 24- Comparação da resposta vasorrelaxante da aorta isolada de rato Wistar e rato diabético tipo I à ACh, na presença e ausência de 1 μM de Liraglutido. Os resultados encontram-se expressos em valores médios \pm S.E.M., de 8 a 10 experiências, sendo que as barras verticais representam S.E.M.; as diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$, * vs. WC + Liraglutido.

	WC	WC + Liraglutido	W-STZ	W-STZ + Liraglutido	a/n WC	a/n W-STZ
$E_{\text{máx}}$	56,95 \pm 9,41	67,52 \pm 9,71	41,97 \pm 4,36	50,33 \pm 7,50	8/2	10/2

Tabela 6 - Valores de $E_{\text{máx}}$ para a ACh na presença e na ausência de pré-incubação com 1 μM de Liraglutido em aortas isoladas de ratos Wistar controlos e ratos Wistar diabéticos tipo I não sujeitos a tratamento *in vivo*. O valor de $E_{\text{máx}}$ = resposta máxima de relaxamento em percentagem de inibição da contração induzida pela noradrenalina (NA). A coluna a/n representa o quociente entre o número de anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se retiraram os anéis. Os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M e as diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas.

Resultados bioquímicos da densidade dos recetores

Com o objetivo de estudar os efeitos quer da DMTI, quer do tratamento com Liraglutido, na via de sinalização do GLP-1R envolvida na vasodilatação, foram analisadas, através da técnica de *Western Blotting*, as densidades do GLP-1R, bem como da forma total e

fosforilada da eNOS. Por último, dado o nosso interesse em avaliar os efeitos a nível cardiovascular de uma formulação Liraglutido-insulina no modelo animal utilizado, também foi avaliada a densidade do Ir β e respetiva forma fosforilada, quer de lisados totais de aortas isoladas de animais controlo, quer de animais diabéticos tipo I, tratados e não tratados com o fármaco.

No que diz respeito ao GLP-IR, o grupo diabético não tratado apresentou tendencialmente a menor densidade da proteína (W-STZ= 77,13 \pm 11,59 %), quando comparado com os outros grupos e no grupo diabético tratado com Liraglutido observou-se um aumento estatisticamente significativo na densidade do recetor (WL-STZ= 127,94 \pm 18,03 %) comparativamente ($P < 0,05$) à da respetiva situação controlo (Figura 25).

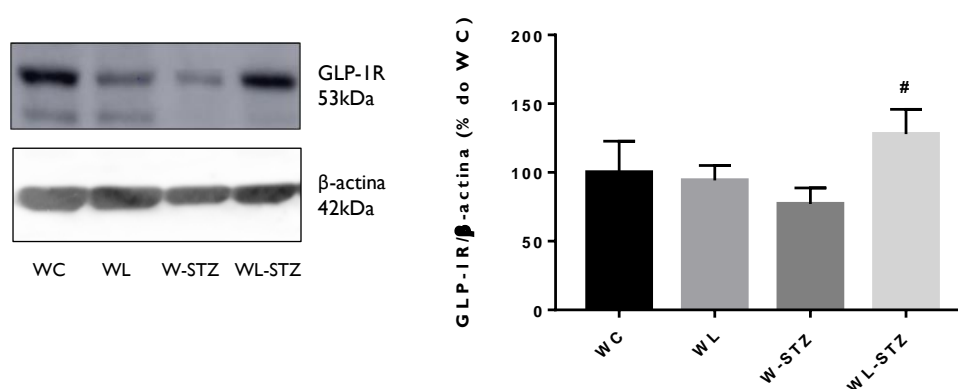


Figura 25- Comparação da densidade do GLP-IR na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo). As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; # vs. W-STZ.

Relativamente aos níveis proteicos da eNOS, os resultados nos diferentes grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, no entanto, como podemos observar pela Figura 26, os ratos Wistar controlo tratados com Liraglutido apresentaram tendencialmente uma menor densidade da enzima relativamente aos restantes (WL= 77,05 \pm 7,03 %).

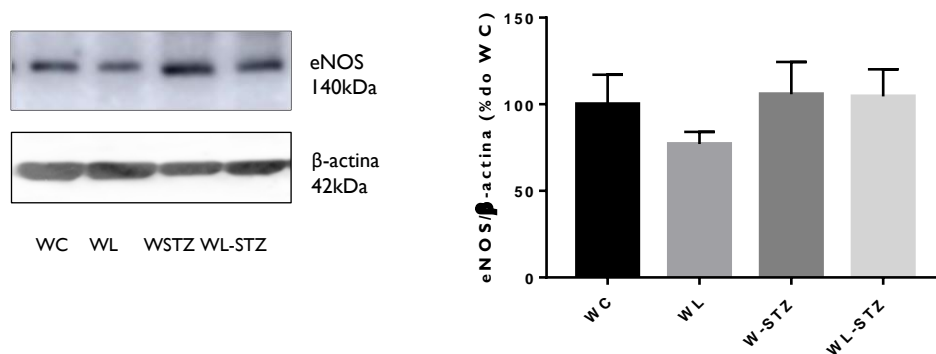


Figura 26- Comparação da densidade da enzima eNOS na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).

Quanto à forma fosforilada da eNOS (Figura 27), a densidade entre os diferentes grupos também não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

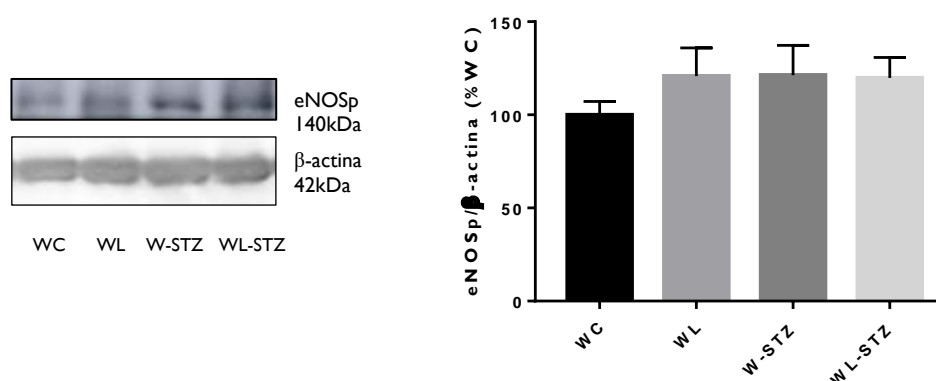


Figura 27- Comparação da densidade da enzima eNOSp na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).

No que diz respeito aos níveis da eNOS ativa, traduzida pela razão eNOSp/eNOS total, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos de animais (Figura 28), no entanto, parece existir uma tendência embora que ligeira para o aumento da

fosforilação e atividade da enzima nos animais controlo tratados com Liraglutido ($WL=134,72 \pm 13,55 \%$) o que está de acordo com o aumento significativo do vasorrelaxamento neste grupo de animais tratado com o fármaco, como os estudos funcionais anteriormente descritos o demonstraram.

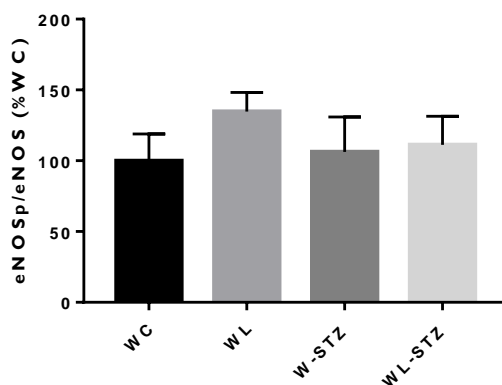


Figura 28- Comparação dos níveis proteicos de eNOS ativa, através da razão eNOSp/eNOS na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 µg/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).

O gráfico da Figura 29 traduz os níveis proteicos do recetor de insulina ($Ir\beta$) em aortas isoladas de ratos controlo e ratos diabéticos tipo I, após o tratamento *in vivo* com Liraglutido. Observa-se a tendência para uma maior densidade do recetor no grupo controlo tratado com Liraglutido ($WL= 159,33 \pm 43,76 \%$), e uma redução estatisticamente significativa ($P<0,05$), relativamente a este, nos grupos de ratos diabéticos com ($WL-STZ= 68,91 \pm 10,08 \%$) e sem tratamento ($W-STZ= 64,16 \pm 13,39 \%$).

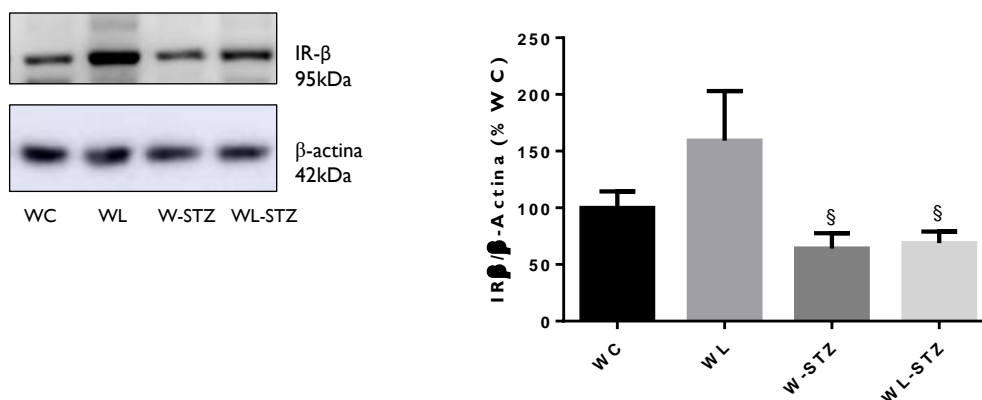


Figura 29- Comparação da densidade do recetor da insulina (Irβ) na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 µg/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC ± S.E.M (n=5-6 por grupo). As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas. $P < 0,05$; § vs. WL.

Relativamente à densidade da forma fosforilada do recetor (IR-p), não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos, embora exista uma tendência ($P < 0,05$) para uma menor densidade nos grupos de animais diabéticos, W-STZ (W-STZ= 67,93 ± 10,44 %) e WL-STZ (WL-STZ= 66,65 ± 9,79 %), à semelhança do que se observou para a forma total do recetor (Figura 30).

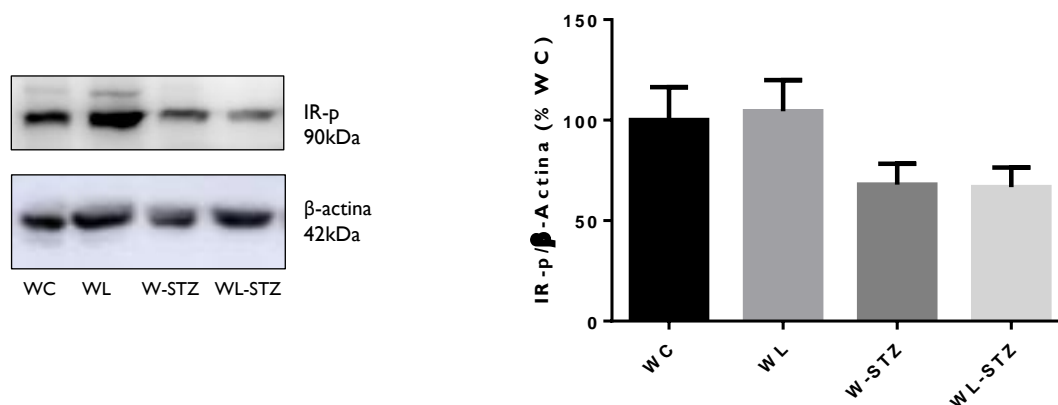


Figura 30- Comparação da densidade do IR-p na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 µg/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. O Western blot apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC ± S.E.M (n=5-6 por grupo).

De modo a analisar a forma ativa do recetor de insulina foi calculada a razão IR-p/IRβ. Embora não haja diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos de animais,

na situação controlo, existe uma tendência para um comprometimento da fosforilação e ativação do IR β , nos ratos tratados com Liraglutido (WL= 75,89 \pm 15,35 %), ao contrário do que sucedeu à forma ativa da eNOS. A mesma tendência foi observada nos animais diabéticos tratados e não tratados (W-STZ= 71,25 \pm 13,56 %; WL-STZ= 78,07 \pm 5,72 %) relativamente ao grupo controlo (WC= 100 \pm 20,42 %) (Figura 31).

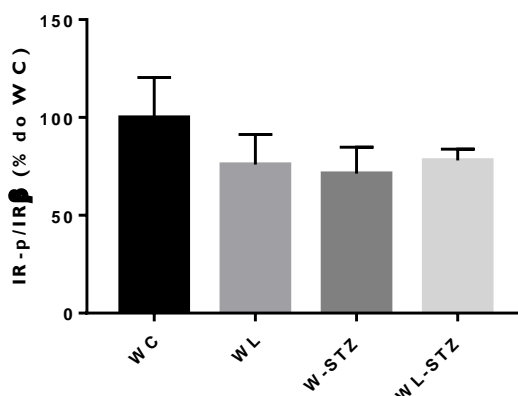


Figura 31- Comparação dos níveis proteicos de IR ativo, através da razão IR-p/IR β , na aorta isolada de ratos Wistar controlo e ratos Wistar com DTI, tratados ou não tratados com Liraglutido. WC, Rato Wistar controlo; WL, Rato Wistar com administração de Liraglutido (200 μ g/Kg, 2X/dia); W-STZ, Rato Wistar diabético tipo I; WL-STZ, Rato Wistar diabético tipo I administrado com Liraglutido. Os resultados são expressos em percentagem média do grupo WC \pm S.E.M (n=5-6 por grupo).

Localização celular do GLP-IR através de estudos imunohistoquímicos em aortas isoladas de ratos Wistar e ratos DTI

Para complementar os estudos funcionais e moleculares e, com o objectivo de caracterizar a micro-anatomia dos anéis de aorta dos animais controlo e diabéticos tipo I e determinar a localização celular do GLP-IR, recorreremos às técnicas de histoquímica e imunohistoquímica, utilizando cortes histológicos representativos de aortas dos dois modelos animais.

Os resultados dos estudos com coloração hematoxilina/eosina (HE) (Figura 32) revelaram que os animais diabéticos (Figura 32b, 32c e 32d) quando comparados com os controlos (Figura 32a) apresentaram um espessamento da média, alterações matriciais da constituição das fibras elásticas com duplicação das mesmas (1) e ainda alterações na densidade da matriz (2). Dependendo da região fotografada do corte da aorta, os diabéticos apresentaram ainda redução do número de camadas de fibras elásticas (3) e espessamento da membrana basal dos vasa vasorum (4).

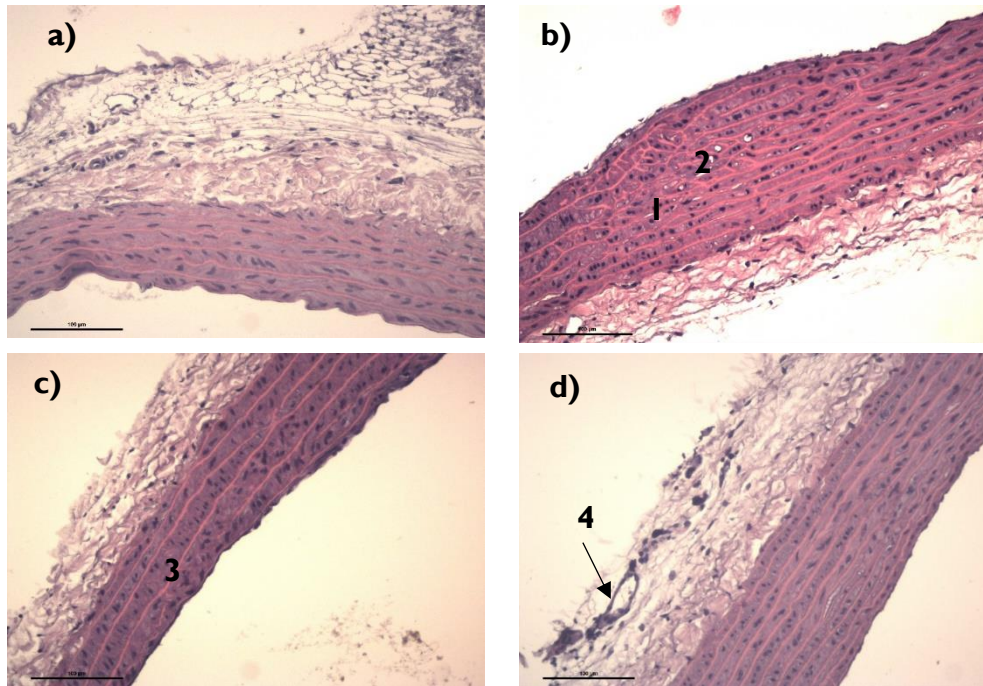


Figura 32- Visualização da micro-anatomia de aorta isolada de ratos Wistar controlo e diabéticos tipo I pela técnica HE. (a) Corte histológico representativo de aorta de ratos Wistar controlo; (b, c e d) cortes histológicos representativos de aorta de ratos diabéticos tipo I. (1) Duplicação das fibras elásticas; (2) alterações da densidade da matriz; (3) redução do número de camadas de fibras elásticas e (4) espessamento da membrana basal dos vasa vasorum.

O GLP-1R foi localizado tanto no grupo controlo como no grupo diabético de forma heterogénea no endotélio da aorta (Figura 33). Relativamente ao grupo controlo (a) verificou-se imunomarcção para o recetor nas células endoteliais (1), uma imunomarcção mais discreta nas células musculares lisas (2), imunomarcção nos vasa vasorum (3) e nas células ganglionares (4). Quanto ao grupo diabético (b) apresentou uma imunomarcção discreta subendotelial da artéria (5).

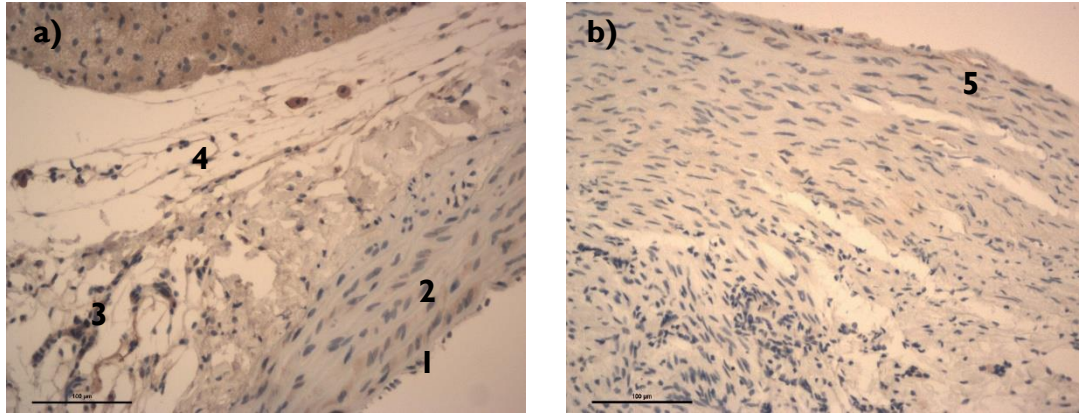


Figura 33- Localização celular do GLP-IR em aorta isolada de ratos Wistar controlo e diabéticos tipo I por imunohistoquímica. (a) refere-se ao corte histológico de aorta isolada de ratos Wistar controlo e (b) ao corte de histológico de ratos diabéticos tipo I, com imunomarcção a castanho do GLP-IR.

Capítulo 5.

Discussão

Discussão

A DMT1 ocorre quando o pâncreas é incapaz de produzir insulina, de forma absoluta ou, a produz em baixa quantidade devido à inexistência total ou parcial das células β . A inexistência/insuficiência de produção de insulina implica a manutenção de um estado de hiperglicemia crônico, que promove vários efeitos colaterais tais como a poliúria, a perda de peso, entre outros, incluindo algumas formas mais severas, como cetoacidose, síndrome hiperosmolar não cetótico, o coma e a morte (Alberti e Zimmet, 1998). Provoca também alterações na gliconeogênese promovendo a não supressão do glucagon durante as refeições, contribuindo para a hiperglicemia pós-prandial (Harris e Boland, 2016). Esta hiperglicemia característica da DTI tem como consequência primária a nível cardiovascular, a disfunção das células endoteliais. A comunicação entre as células endoteliais e as células musculares lisas tem um importante papel na regulação do tônus vascular, e o NO produzido pela eNOS exerce múltiplas funções benéficas na vasculatura. A disfunção endotelial, caracterizada pela redução da biodisponibilidade de NO e pelo aumento da produção de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Ding e Triggle, 2005), contribui para o aparecimento de doenças cardiovasculares (Sun *et al.*, 2012). Desta maneira a diabetes está associada a complicações vasculares e a maiores problemas clínicos apresentando um aumento da taxa de mortalidade de cerca de 2-4 vezes superior nos doentes diabéticos comparativamente à população em geral (Haffner *et al.*, 1998).

A descoberta da insulina em 1921-22 foi de longe a descoberta mais significativa da história terapêutica da DTI. No entanto a insulino terapia nem sempre oferece a regulação metabólica necessária para evitar o aparecimento de uma ou mais comorbidades cardiovasculares (Atkinson, Eisenbarth e Michels, 2014). Assim sendo, nos últimos anos tem-se verificado uma forte incrementação da investigação no tratamento da DM, focando-se na utilização de terapêuticas baseadas nas incretinas, nomeadamente nos miméticos do GLP-I, primariamente desenvolvidos para o tratamento da DMT2, e que apresentam a capacidade de reduzir a hiperglicemia com baixo risco de hipoglicemia (Monami *et al.*, 2014). Aliando-se ao chamado “efeito incretina”, que representa a potenciação da secreção de insulina induzida pela entrada de nutrientes e consequente potenciação do controlo glicémico, existem evidências crescentes que sugerem que a terapia baseada no peptídeo possui efeitos pleiotrópicos benéficos nos fatores de risco cardiovascular (Oyama, Higashi e Node, 2014). Posto isto, utilizou-se neste estudo um GLP-IRA, o Liraglutido, na sua forma comercialmente disponível Victoza[®], um agonista do GLP-IR com 97% de homologia da sequência de aminoácidos linear do GLP-I humano, e com modificações que permitem um maior tempo de semi-vida (Bode *et al.*, 2012).

A disfunção endotelial é um ponto importante na unificação da diabetes e das doenças cardiovasculares. Assim, deve ser avaliada recorrendo a estudos funcionais com vasos sanguíneos isolados em banho de órgãos e analisando a capacidade de indução de relaxamento por fatores vasodilatadores dependentes do endotélio, como é o caso da Acetilcolina, na presença de um tónus pré-existente (Mulvany e Halpern, 1978).

Tendo por base este enquadramento utilizou-se como órgão de estudo a artéria aorta, uma artéria elástica constituída por três camadas, sendo a camada mais interna (túnica íntima), constituída por células endoteliais, a que mantém contato direto com o fluxo sanguíneo (Ross M., Kaye G.I., Pawlina Histology, a Text and Atlas). As células endoteliais estão envolvidas em diferentes tarefas sendo a sua principal função a regulação da homeostase do tónus vascular e da manutenção de um fluxo sanguíneo apropriado. Assim, estas células são capazes de prevenir a adesão, agregação e ativação de plaquetas, através da libertação de prostaciclina e óxido nítrico, metabolizando o ATP/ADP e prevenindo a ação da trombina. Deste modo, os produtos derivados do endotélio promovem por um lado a fluidez sanguínea e a vasodilatação, contrariando a cascata de coagulação sanguínea e a vasoconstrição, de modo a assegurar a homeostase (Félétou, 2011).

Considerando os problemas cardiovasculares associados à DM foi elaborada uma estratégia metodológica que esclarecesse o efeito do Liraglutido em aorta isolada de um modelo animal de DTI. Para isso foi induzida a DTI com estreptozotocina e os resultados dos parâmetros peso, glicemia pós-prandial e insulina permitiram garantir o modelo animal de DTI que pretendíamos utilizar para estudar os efeitos extra-pancreáticos do tratamento com Liraglutido no sistema cardiovascular. De facto, observou-se uma perda significativa de peso no grupo diabético tipo I, comparativamente com os ratos Wistar controlo, com perda de 3,2% do peso corporal, o que era expectável pois a perda de peso é uma característica da DTI (Alberti e Zimmet, 1998). Relativamente à HbA1c Fadini, descreveu que na DMT2 a administração de Liraglutido promovia a sua diminuição em cerca de 1% (Rigato e Fadini, 2014); num outro estudo foi verificado que na DMT1 a administração do fármaco juntamente com insulina promovia também uma diminuição dos valores embora de forma ténue (Janzen, Steuber e Nisly, 2016). No entanto, os nossos resultados não demonstraram isto. Tal pode-se dever ao facto de estarmos a avaliar o efeito do fármaco em monoterapia e ao facto da HbA1c nos indicar a glicose plasmática relativa a um período de três meses e o nosso estudo ser de curta duração, onde os animais foram sujeitos a um mês de diabetes e quinze dias de tratamento com o Liraglutido.

Os níveis de glicemia pós-prandiais e de insulina estão concordantes com um quadro de DTI, com uma hiperglicemia muito acentuada nos animais diabéticos comparativamente aos animais controle e níveis de insulina substancialmente mais baixos nos grupos diabéticos, com animais a apresentar valores abaixo de 0,15 µg/L.

Os estudos funcionais conducentes à avaliação do efeito do tratamento *in vivo* com Liraglutido na resposta vasorrelaxante induzida pela ACh dependente do endotélio da aorta isolada deste modelo animal de DTI induzida, tiveram como objetivo perceber se o endotélio se encontrava funcional, se o relaxamento era NO-dependente e se o Liraglutido afetava a resposta vasodilatadora. Efetivamente a ACh induziu relaxamentos dependentes da concentração nos diferentes grupos em estudo e a pré-incubação com L-NAME, um inibidor seletivo da eNOS, praticamente aboliu a resposta vasorrelaxante ao neurotransmissor confirmando que o relaxamento induzido pela ACh ocorre segundo uma via de sinalização NO-dependente como descrito na literatura. A ACh promove o relaxamento da maior parte dos vasos sanguíneos segundo uma via directa dependente de NO, onde ativa a eNOS e consequentemente contribui para o aumento da biodisponibilidade do NO. No entanto, induz também relaxamento com uma menor contribuição por uma via independente do NO, mas endotélio-dependente, onde promove uma hiperpolarização das células musculares lisas e consequentemente o vasorrelaxamento (Hansen e Olesen, 1997).

Adicionalmente para além da ACh ter sido mais eficaz e potente em induzir vasorrelaxamento nos animais controle comparativamente aos animais diabéticos, revelando uma possível disfunção endotelial nestes últimos com um mês de hiperglicemia crónica, o tratamento com Liraglutido favoreceu significativamente o relaxamento nos animais controle sem alteração da potência. Estes resultados estão de acordo com a razão eNOSp/eNOS que se encontra tendencialmente aumentada, no grupo controle com tratamento, isto é, o tratamento tende a aumentar a forma ativa da eNOS e consequentemente o relaxamento. Erdogdu e colaboradores, também verificaram algo semelhante em células endoteliais coronárias humanas, onde a utilização de um GLP-1RA contribuía para o aumento da eNOSp (Erdogdu *et al.*, 2010). Outro autor demonstrou no seu trabalho, que o Liraglutido também tem tendência a aumentar a eNOSp em diabéticos, algo que não se visualizou no nosso estudo. No entanto este autor observou tal acontecimento em nefropatias renais com tratamento com Liraglutido durante 12 semanas, o que significa que tal resultado poderia ter sido alcançado no nosso estudo, caso o período de tratamento fosse mais alargado (Zhou *et al.*, 2014).

De acordo com estes resultados do tratamento *in vivo* estão os resultados do protocolo *in vitro* que realizámos, no qual pretendíamos mimetizar a administração aguda de Liraglutido. Assim realizaram-se curvas CR à ACh na presença e ausência de 1 μ M de Liraglutido em aortas isoladas de ratos Wistar e ratos diabéticos tipo I sem prévio tratamento, com o objetivo de analisar o efeito do fármaco em administração aguda no vasorrelaxamento NO-dependente induzido pela ACh. De facto, embora sem diferenças estatisticamente significativas, observou-se uma tendência para um maior relaxamento em ambos os modelos animais com pré-incubação com Liraglutido, quando comparados com os seus respetivos controlos.

Já nos animais diabéticos, o tratamento *in vivo* com Liraglutido parece comprometer o efeito vasorrelaxante da ACh, com uma redução não significativa da resposta máxima e da potência e sem alterações nos níveis proteicos da forma ativa da eNOS relativamente ao seu grupo controlo. Já Thum e colaboradores, observaram que a eNOS ativada nos vasos sanguíneos de diabéticos se encontrava comprometida e desacoplada resultando num efeito contrário ao desejado, aumentando a produção de ROS e diminuindo a biodisponibilidade de NO (Thum *et al*, 2007).

A análise da densidade do recetor do GLP-I por *Western blotting* revelou que o grupo diabético não tratado apresentou tendencialmente a menor densidade da proteína no vaso sanguíneo e um aumento estatisticamente significativo da mesma com o tratamento. Estas alterações poderão ser explicadas pela hiperglicemia crónica característica deste modelo animal. Um outro grupo de investigadores, verificou algo semelhante num estudo que envolvia linhas celulares do epitélio tubular humano, sujeitas a concentrações elevadas de glicose onde chegaram à conclusão que a expressão do GLP-IR estava diminuída nestas condições, mas que, no entanto, com a administração de Liraglutido a situação revertia-se aumentando a expressão do recetor (Zhao *et al.*, 2015).

As alterações na densidade do recetor induzidas pelo tratamento poderão explicar os resultados opostos entre a resposta vasorrelaxante à ACh na aorta isolada dos animais DTI não tratados e obtida na presença de Liraglutido, mimetizando a administração aguda (favorecendo o vasorrelaxamento), e aquela obtida após tratamento *in vivo* com Liraglutido. O comprometimento do relaxamento NO-dependente e um aumento da densidade do recetor do GLP-I na sequência do tratamento com Liraglutido, indiciava uma ação predominantemente vasoconstritora deste fármaco e não vasorrelaxante.

No seguimento destes resultados foi pertinente e necessário caracterizar farmacologicamente a resposta contrátil ao Liraglutido em aorta isolada de ratos Wistar e de ratos diabéticos tipo I, não sujeitos a tratamento com o fármaco, com recurso à execução de curvas cumulativas concentração-resposta de Liraglutido na presença e na ausência do inibidor seletivo da eNOS, o L-NAME e do antagonista seletivo do GLP-1R, o Exendin-3. À semelhança do estudo *in vivo*, os animais Wistar controlos e DTI foram pesados e foi-lhes medida a glicemia pós-prandial, apresentando resultados expectáveis e idênticos aos anteriormente obtidos, característicos de um modelo animal de DTI.

Ao contrário do que era esperado, dada a via de sinalização PI3K/Akt/eNOS associada ao GLP-1R (Shah *et al.*, 2011), o Liraglutido provocou, não relaxamento, mas uma contração dependente da concentração, não NO-dependente e parcialmente mediada pelo GLP-1R. Contração que parece não ser de origem adrenérgica, dado que se sobrepôs àquela induzida pela noradrenalina que utilizámos para pré-contrair o vaso sanguíneo, como os protocolos experimentais de vasorrelaxamento o exigem, sendo que na ausência desta pré-contração não foram observadas respostas contráteis mensuráveis induzidas pelo Liraglutido de forma sistemática em todos os animais. De facto, os resultados de imunohistoquímica revelaram uma imunomarcção heterogénea endotelial e subendotelial para o GLP-1R, em ambos os modelos animais. Portanto, a resposta contrátil não é de natureza adrenérgica, mas encontra-se dependente do aumento do tónus do órgão.

No que diz respeito ao papel do NO, resultados idênticos já tinham sido observados pelo nosso grupo de investigação em tiras de estômago isolado de rato Wistar e de rato Goto-Kakizaki (GK), um modelo animal de DMT2 não obeso, no qual mais uma vez o GLP-1RA induziu contração não dependente da nNOS (Carrêlo, 2016). Noutro estudo realizado por Thomas Nyström, comprovou-se que o efeito vasorrelaxante do GLP-1 em artérias femorais de ratos, era induzido por uma via NO-independente (Nyström, 2004).

Quanto ao efeito do antagonista seletivo do GLP-1R, Exendin-3, o facto de este apenas reduzir em parte a resposta contrátil do vaso sanguíneo ao Liraglutido, já foi descrito por outros autores, nomeadamente Ding e Zhang (2012), para além de que estão descritos efeitos do GLP-1 mediados e não mediados pelo recetor. De facto, Ban e colaboradores, demonstraram que a faceta vasodilatadora e cardioprotetora do GLP-1 e do seu metabolito GLP-1(9-36), eram independentes do recetor (Ban *et al.*, 2008), envolvendo o aumento do GMPc e que eram apenas atenuadas com uma pré-incubação com um inibidor da eNOS, sugerindo que parte da ação vasodilatadora é mediada pela via PI3K/Akt e fosforilação da

eNOS (Shah *et al.*, 2011). Pela mesma ordem de ideias a faceta vasoconstritora que agora observámos pode envolver também uma via independente do recetor.

Ainda relativamente à caracterização farmacológica da resposta contráctil ao Liraglutido, paradoxalmente, nos ratos diabéticos tipo I não se observaram alterações estatisticamente significativas na curva CR do Liraglutido na presença do antagonista seletivo do GLP-IR. Assim a patologia parece comprometer, não só a componente endotelial vasodilatadora da homeostase vascular, que se traduz no facto da contração induzida pelo Liraglutido ter sido tendencialmente mais eficaz e significativamente mais potente em ratos diabéticos do que em ratos controlo, como também parece ter comprometido a função do recetor. Este para além de estar presente nas células endoteliais também se encontra em células musculares lisas de aortas de ratos controlo e, como os nossos resultados dos estudos histo- e imunohistoquímicos o revelam, nos ratos diabéticos são por demais evidentes as alterações na túnica média com remanejamento das fibras elásticas e diminuição da densidade da matriz. Outros autores demonstram também este tipo de alterações nas aortas de ratos diabéticos tipo I (Franco, 2014; Komolafe *et al.*, 2013).

Finalmente, dadas as formulações já existentes que associam agonistas de GLP-IR com uma insulina de ação intermédia, sentimos a necessidade de estudar a interação farmacodinâmica da associação Liraglutido-insulina em aorta isolada de ratos controlo e ratos diabéticos tipo I. À semelhança de protocolos experimentais anteriormente descritos, as aortas isoladas dos dois grupos de animais foram sujeitas a curvas CR ao Liraglutido na presença e ausência de insulina, numa concentração que mimetiza as concentrações plasmáticas de insulina entre refeições (8 a 11 $\mu\text{UI/mL}$) (Katakam *et al.*, 2009), tendo sido também avaliado o potencial contráctil de uma insulina de ação intermédia. Para além de ter induzido contração e não relaxamento em ambos os modelos animais, à semelhança do GLP-IRA, a insulina antagonizou competitivamente a ação do Liraglutido em ratos controlo, isto é, na presença de insulina houve perda de potência na contração induzida pelo GLP-IRA. É provável que esta situação ocorra pelo facto de ambos os fármacos concorrerem pela mesma via de sinalização PI3K/Akt (Bevan, 2001; Shah *et al.*, 2011). No caso do modelo animal de DTI, pareceu existir uma tendência para a insulina potenciar a resposta contráctil ao Liraglutido. Como a insulina ativa várias vias de sinalização, uma que induz contração e outra que envolve a via PI3K/eNOS e induz relaxamento de modo a manter a homeostase (Muniyappa e Sowers, 2013), este resultado pode ser explicado pela disfunção endotelial que irá potenciar a contração, visto que está descrito que a insulina tanto pode induzir vasorrelaxamento como vasoconstrição (Kataham *et al.*, 2009). No entanto, não sendo a suposta potenciação

estatisticamente significativa, não há um risco cardiovascular acrescido, em termos de vasoconstrição, na utilização de formulações que associam Liraglutido à insulina em indivíduos diabéticos, a menos que já exista doença cardiovascular.

No que diz respeito aos parâmetros farmacológicos estudados a insulina foi tendencialmente mais eficaz e potente em animais diabéticos do que em animais controlo. Se num quadro de insulinoresistência e consequente hiperinsulinémia se assiste a uma *downregulation* dos recetores de insulina, num quadro de diabetes, como não há produção de insulina ou existe produção em baixa quantidade, não existe a internalização do recetor (Hachiya, 1986; Saltiel & Kahn, 2001). Assim sendo, aquando da adição de insulina esta provoca uma maior ativação do seu recetor e da via de sinalização, promovendo uma maior resposta, que devido ao estado de hiperglicemia crónica se traduz numa maior libertação de fatores constritores (Muniyappa e Sowers, 2013) contribuindo para um aumento, mesmo que não estatisticamente significativo, da contração máxima.

Quanto à quantificação da densidade do recetor da insulina e da sua forma fosforilada, de modo a compreender o efeito da patologia e do tratamento com Liraglutido, os nossos resultados demonstraram que tanto a forma total como a fosforilada estavam diminuídas na presença da patologia, com diferenças estatisticamente significativas apenas na forma total quando comparados com o controlo sujeito a tratamento.

O tratamento com Liraglutido teve tendência a aumentar a forma total do recetor no grupo controlo, mas não a forma fosforilada, sendo que a razão IR-p/IR β sugere algum comprometimento nos níveis proteicos do IR ativo. Curiosamente, esta diminuição tendencial da fosforilação do IR ocorreu paralelamente ao aumento da densidade da eNOS_p, no mesmo grupo. Dado que a ligação insulina-IR e Liraglutido-GLP-IR desencadeiam a mesma via de sinalização PI3K, pode existir algum tipo de interação que leve à diminuição do IR-p neste tecido não insulino-dependente em animais controlo, na sequência da ativação do GLP-IR. Isto seria concordante com os estudos *in vitro*, por nós apresentados, da resposta contrátil do Liraglutido na presença de insulina.

Finalmente ainda resta salientar o facto de em ratos Wistar controlo o tratamento *in vivo* com Liraglutido ter aumentado a resposta vasorrelaxante à ACh, quando o fármaco *in vitro* em animais não tratados induziu contração e não relaxamento. Coloca-se a hipótese de que o Liraglutido induza contração por via de um mecanismo independente de NO, mas que, no entanto, tenha a capacidade de facilitar ou potenciar a produção de NO por meio da ativação da via PI3K/Akt/eNOS associada ao recetor, aquando da presença de um fator

indutor/ativador da eNOS como é a ACh. Para compreender melhor este mecanismo, seria necessário realizar ensaios onde se conjugasse a presença de Liraglutido com fatores dadores de NO, independentes da via PI3K, como por exemplo o nitroprussiato de sódio, e verificar se existiria sinergismo no relaxamento.

Capítulo 6.

Conclusão e Perspetivas Futuras

Conclusão e Perspetivas Futuras

Com este trabalho procurámos perceber os mecanismos farmacológicos subjacentes aos efeitos vasculares de um agonista do GLP-1R, o Liraglutido, utilizado na terapêutica da DMT2, mas com formulações já disponíveis para a DMT1 em co-administração com insulina. A associação Liraglutido-insulina pretende então aliar ao seu efeito potenciador de controlo glicémico, por inibição da apoptose de células β pancreáticas, os seus potenciais efeitos benéficos nos fatores de risco cardiovascular. Para isso, estudaram-se as variações de tensão isométrica de aortas isoladas de um modelo animal de DMT1 induzido por STZ, submetido ou não a tratamento com o fármaco.

Primeiramente nos estudos *in vivo* os parâmetros peso, glicemia pós-prandial e insulina permitiram confirmar o modelo animal de DTI e, nas aortas isoladas a ACh induziu relaxamento que foi praticamente abolido na presença de L-NAME, verificando-se que o endotélio se encontrava funcional e que o relaxamento era NO-dependente. Verificou-se também que o tratamento com Liraglutido afetou a resposta vasodilatadora à ACh, uma vez que induziu um relaxamento mais eficaz e tendencialmente mais potente nos animais que serviram de controlos do que nos animais diabéticos, corroborado pela tendência para o aumento da forma ativa da eNOS. Nos animais diabéticos o Liraglutido comprometeu o relaxamento induzido pela ACh, acontecimento que, em conjunto com os resultados obtidos por *Western blotting* relativamente à densidade do recetor do GLP-1, nos levaram a concluir que, na presença da hiperglicemia crónica e com a administração do fármaco, ocorria uma adaptação por parte do recetor aumentando a sua densidade e levando a uma redução não significativa do vasorrelaxamento.

A caracterização farmacológica da resposta contrátil ao Liraglutido, que se impôs na sequência dos resultados obtidos no estudo *in vivo*, verificou que o fármaco induzia contração de natureza não adrenérgica dependente da concentração, através de um mecanismo NO-independente, provado pela não alteração da resposta contrátil ao fármaco na presença de L-NAME. Também foi possível concluir que esta contração é parcialmente mediada pela ligação do fármaco ao GLP-1R, uma vez que o grupo controlo apresentou uma diminuição da resposta contrátil na presença de Ex-3, algo que não foi verificado no grupo diabético. No grupo diabético não houve diferença significativa nem da potência, nem da resposta máxima, na presença do antagonista seletivo do GLP-1R, algo que pode ser explicado pelo desarranjo/desorganização do tecido aórtico, observado pela histoquímica.

Com o propósito de avaliar a ação farmacodinâmica da associação Liraglutido-insulina, procedeu-se igualmente à caracterização farmacológica da resposta contrátil de aorta isolada de rato à insulina, tendo-se verificado que esta induz contração tanto em animais controlo como em diabéticos tipo I. No grupo de ratos Wistar controlos, a presença de insulina antagonizou competitivamente o efeito do Liraglutido, demonstrado pela perda de potência deste fármaco na indução da contração, enquanto que no grupo diabético a presença de insulina teve tendência a potenciar a resposta contrátil do Liraglutido. Relativamente à quantificação da densidade do IR, conclui-se que ambas as formas do recetor estão diminuídas na presença da patologia, e que o tratamento com o Liraglutido no grupo controlo apresentou tendência para comprometer a forma ativa do recetor.

Assim sendo, com base nestes resultados, podemos afirmar que o Liraglutido induz constrição de vasos sanguíneos isolados pré-contraídos com NA e que a sua utilização na DMTI reduz o vasorrelaxamento induzido pela ACh da aorta através de uma *upregulation* do recetor do GLP-1. Verifica-se que a insulina também apresenta uma ação vasoconstritora *in vitro*. Posto isto, a utilização da formulação conjunta de Liraglutido e insulina possivelmente não será a terapêutica mais indicada para a DMTI em doente com histórico clínico de doenças cardiovasculares. No entanto, numa fase precoce da DMTI a administração conjunta pode ser benéfica, usufruindo dos efeitos benéficos do Liraglutido sobre as células β , e diminuindo a necessidade da insulina.

No futuro, será necessário realizar estudos cujo período de tratamento com o Liraglutido seja maior de modo a verificar, por exemplo, se há reversão do comprometimento do relaxamento induzido pela ACh na aorta dos animais diabéticos. É necessário também fazer estudos histoquímicos e imunohistoquímicos em cortes de aorta isolada de animais sujeitos ao tratamento com o Liraglutido, de modo a perceber se a administração do fármaco nestes animais conduz a um aumento da densidade da matriz numa tentativa de aproximação da situação controlo. Devido ao facto de termos verificado no nosso estudo uma diminuição do IR nos animais diabéticos, seria também interessante testar os níveis proteicos deste recetor num tecido que seja insulino-dependente. E por fim, tendo em conta os resultados obtidos na mimetização de uma administração aguda de Liraglutido na resposta vasorrelaxante à ACh, seria necessário aprofundar esta situação e, possivelmente, testar novamente o protocolo, desta feita com um doador de NO não dependente das vias envolvendo a eNOS.

Capítulo 7

Bibliografía

Bibliografia

ADVANI, A.; BUGYEI-TWUM, A.; CONNELLY, K. A. - Cardiovascular Effects of Incretins in Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*. ISSN 14992671, 37(5), 309-314. doi: 10.1016/j.jcjd.2013.06.010.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. - Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*. ISSN 0742-3071, 15(7), 539-553. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539:AID-DIA668>3.0.CO;2-S.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, A. D. - Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. ISSN 1935-5548, 33 *Suppl 1* (Suppl 1), S62-9. doi: 10.2337/dc10-S062.

ARAKAWA, M. et al. - Inhibition of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Attenuation of Atherosclerotic Lesion by a Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist, Exendin-4. *Diabetes*. ISSN 0012-1797, 59(4), 1030-1037. doi: 10.2337/db09-1694.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. - Type 1 diabetes. *Lancet* (London, England). ISSN 1474-547X, 383(9911), 69-82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. - Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. ISSN 00165085, 132(6), 2131-2157. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054.

BAN, K. et al. - Cardioprotective and Vasodilatory Actions of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Are Mediated Through Both Glucagon-Like Peptide 1 Receptor-Dependent and -Independent Pathways. *Circulation*. ISSN 0009-7322, 117(18), 2340-2350. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.739938.

BAN, K. et al. - Glucagon-Like Peptide (GLP)-1(9-36) Amide-Mediated Cytoprotection Is Blocked by Exendin(9-39) Yet Does Not Require the Known GLP-1 Receptor. *Endocrinology*. ISSN 0013-7227, 151(4), 1520-1531. doi: 10.1210/en.2009-1197.

BEVAN, P. - Insulin signalling. *Journal of Cell Science*., 114(8).

BODE, B. - An overview of the pharmacokinetics, efficacy and safety of liraglutide. *Diabetes Research and Clinical Practice*. ISSN 01688227, 97(1), 27-42. doi: 10.1016/j.diabres.2011.12.015.

BURGMAIER, M.; HEINRICH, C.; MARX, N. - Cardiovascular effects of GLP-1 and GLP-1-based therapies: implications for the cardiovascular continuum in diabetes? *Diabetic Medicine*. ISSN 07423071, 30(3), 289-299. doi: 10.1111/j.1464-5491.2012.03746.x.

CAMPBELL, J. E.; DRUCKER, D. J. - Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. *Cell Metabolism*. ISSN 15504131, 17(6), 819-837. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.008.

CARRÊLO, A. C. L. - Alterações da motilidade gástrica na diabetes mellitus tipo II: o efeito dos agonistas do recetor do glucagon-like peptide I (GLP-IRA).

CHILTON, R. J.; ROBERT CHILTON, P. J. - Diabetes & Metabolism Potential Cardiovascular Effects of the Glucagon-like Peptide-I Receptor Agonists. *J Diabetes Metab.*, 64172(6), 4832155-6156.

COHEN, R. A. - The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*. ISSN 00330620, 38(2), 105-128. doi: 10.1016/S0033-0620(05)80002-7.

DAI, D.-Z.; DAI, Y. - Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Vascular health and risk management*. ISSN 1178-2048, 6, 787-94.

Diabetes: how could stem cells help? | Eurostemcell - [on line] [Consult. 8 set. 2017]. Disponível em: <http://www.eurostemcell.org/diabetes-how-could-stem-cells-help>.

DING, H.; TRIGGLE, C. R. - Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: assessing the health of the endothelium. *Vascular health and risk management*. ISSN 1176-6344, 1(1), 55-71.

DING, L.; ZHANG, J. - Glucagon-like peptide-I activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. ISSN 1671-4083, 33(1), 75-81. doi: 10.1038/aps.2011.149.

DRUCKER, D. J. - The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*. ISSN 15504131 doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.004.

DUDA, D. G.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. - Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends in molecular medicine*. ISSN 1471-4914, 10(4), 143-5.

ERDOGDU, O. et al. - Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-I receptor. *Molecular and cellular endocrinology*. ISSN 1872-8057, 325(1-2), 26-35. doi: 10.1016/j.mce.2010.04.022.

FÉLÉTOU, M. - The Endothelium. *The Endothelium: Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* [on line]. [S.l.] : Morgan & Claypool Life Sciences, 2011. [Consult. 26 jan. 2017]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850763>.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. - Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. ISSN 0195-668X, 33(7), 829-837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

FRANCO, M. T. - A influência da sitagliptina no vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de rato: comparação com um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo I.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. - Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*. ISSN 1875-6417, 9(1), 25-53.

GRIEVE, D. J.; CASSIDY, R. S.; GREEN, B. D. - Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-I: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *British Journal of Pharmacology*. ISSN 00071188, 157(8), 1340-1351. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00376.x.

HACHIYA, H. L. et al. - THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Regulation of Insulin Receptor Internalization in Vascular Endothelial Cells by Insulin and Phorbol Ester*, 262(13), 6417-6424.

HAFFNER, S. J.; CASSELLS, H. - Hyperglycemia as a cardiovascular risk factor. The American journal of medicine. ISSN 0002-9343, 6S-I IS.

HAFFNER, S. M. et al. - Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. New England Journal of Medicine. ISSN 0028-4793, 339(4), 229-234. doi: 10.1056/NEJM199807233390404.

HALPERN, W.; MULVANY, M. J.; WARSHAW, D. M. - Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of arterial resistance vessels. The Journal of physiology. ISSN 0022-3751, 275, 85-101.

HANSEN, P. R.; OLESEN, S. P. - Relaxation of rat resistance arteries by acetylcholine involves a dual mechanism: activation of K⁺ channels and formation of nitric oxide. Pharmacology & toxicology. ISSN 0901-9928 , 80(6), 280-5.

HARRIS, K. B.; BOLAND, C. L. - Adjunctive Role of Glucagon-Like Peptide-I Receptor Agonists in the Management of Type I Diabetes Mellitus. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. ISSN 02770008, 36(9), 1011-1020. doi: 10.1002/phar.1804.

Insulina - [on line] [Consult. 8 set. 2017]. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/insulina/>.

ISLAM, M. Z. et al. - Rho-kinase and the nitric oxide pathway modulate basilar arterial reactivity to acetylcholine and angiotensin II in streptozotocin-induced diabetic mice.

JANZEN, K. M.; STEUBER, T. D.; NISLY, S. A. - GLP-I Agonists in Type I Diabetes Mellitus. Annals of Pharmacotherapy. ISSN 1060-0280, 50(8), 656-665. doi: 10.1177/1060028016651279.

KANG, Y. M.; JUNG, C. H. - Cardiovascular Effects of Glucagon-Like Peptide-I Receptor Agonists. Endocrinology and Metabolism. ISSN 2093-596X, 31(2), 258. doi: 10.3803/EnM.2016.31.2.258.

KATAKAM, P. V. G. et al. - Cerebrovascular Responses to Insulin in Rats. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. ISSN 0271-678X, 29(12), 1955-1967. doi: 10.1038/jcbfm.2009.177.

KOMOLAFE, O. A. et al. - Histological and Histochemical Studies of the Aorta and Pulmonary Trunk in STZ-induced Diabetic Wistar Rats Treated with Momordica charantia. International Journal of Morphology. ISSN 0717-9502, 31(2), 716-723. doi: 10.4067/S0717-95022013000200060.

LORENZATI, B. et al. - Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 3(9), 3005-3020. doi: 10.3390/ph3093005.

LOVSHIN, J.; CHERNEY, D. - GLP-1R Agonists and Endothelial Dysfunction: More Than Just Glucose Lowering?: Figure 1. Diabetes. ISSN 0012-1797, 64(7), 2319-2321. doi: 10.2337/db15-0366.

MARRE, M. et al. - Liraglutide, a once-daily human GLP-I analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-I SU). *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*. ISSN 1464-5491, 26(3), 268-78. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02666.x.

MELLS, J. E. et al. - Glp-I analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. ISSN 0193-1857, 302(2), G225–G235. doi: 10.1152/.

MILLER-KASPRZAK, E.; JAGODZIŃSKI, P. P. - Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. ISSN 0004-069X, 55(4), 247-259. doi: 10.1007/s00005-007-0027-5.

MONAMI, M. et al. - Effects of glucagon-like peptide-I receptor agonists on cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. ISSN 14628902, 16(1), 38-47. doi: 10.1111/dom.12175.

MUNİYAPPA, R.; SOWERS, J. R. - Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. ISSN 1389-9155, 14(1), 5-12. doi: 10.1007/s11154-012-9229-1.

NYSTRÖM, T. et al. - Glucagon-like peptide-I relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regulatory Peptides*. ISSN 01670115, 125(1-3), 173-177. doi: 10.1016/j.regpep.2004.08.024.

OYAMA, J.-I.; HIGASHI, Y.; NODE, K. - Do incretins improve endothelial function? *Cardiovascular diabetology*. ISSN 1475-2840, 13, 21. doi: 10.1186/1475-2840-13-21.

PABREJA, K. et al. - Molecular mechanisms underlying physiological and receptor pleiotropic effects mediated by GLP-1R activation. *British Journal of Pharmacology*. ISSN 00071188, 171(5), 1114-1128. doi: 10.1111/bph.12313.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. - Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. ISSN 0031-9333, 87(1), 315-424. doi:10.1152/physrev.00029.2006.

PINO-GARCÍA, R. DEL et al. - Attenuation of oxidative stress in Type I diabetic rats supplemented with a seasoning obtained from winemaking by-products and its effect on endothelial function. *Food Funct*. ISSN 2042-6496, 7(10), 4410-4421. doi: 10.1039/C6FO01071G.

POORNIMA, I. et al. - Chronic Glucagon-Like Peptide-I Infusion Sustains Left Ventricular Systolic Function and Prolongs Survival in the Spontaneously Hypertensive, Heart Failure-Prone Rat. *Circulation: Heart Failure*. ISSN 1941-3289, 1(3), 153-160. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.766402.

POTENZA, M. et al. - Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Targets. *Current Medicinal Chemistry*. ISSN 09298673, 16(1), 94-112. doi: 10.2174/092986709787002853.

- QIN, X. - GLP-I reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. ISSN 0193-1857, 288(5), G943-G949. doi: 10.1152/ajpgi.00303.2004.
- RIGATO, M.; FADINI, G. P. - Comparative effectiveness of liraglutide in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy.*, 7, 107-20. doi: 10.2147/DMSO.S37644.
- Ross M., Pawlina W., *Histology, a Text and Atlas*, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 4th edition 2002, ISBN 0683302426.
- RUSAK, T. *et al.* - Involvement of hyperglycemia in the development of platelet procoagulant response. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. ISSN 0957-5235, 28(6), 443-451. doi: 10.1097/MBC.0000000000000618.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. - Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. ISSN 00280836, 414(6865), 799-806. doi: 10.1038/414799a.
- SARAIVA, F. K.; SPOSITO, A. C. - Cardiovascular effects of Glucagon-like peptide I (GLP-I) receptor agonists. *Cardiovascular Diabetology*. ISSN 1475-2840, 13(1), 142. doi: 10.1186/s12933-014-0142-7.
- SCHATZ, D. - 2016 Presidential Address: Diabetes at 212°-Confronting the Invisible Disease. *Diabetes Care.*, 39(10).
- SENA, Cristina M. *et al.* - Diabetes mellitus: new challenges and innovative therapies. *The EPMA journal*. ISSN 1878-5077. 1:1 (2010) 138-63. doi: 10.1007/s13167-010-0010-9.7.
- SHAH, M. S.; BROWNLEE, M. - Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, 118(11), 1808-1829. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306923.
- SHAH, Z. *et al.* - Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-I independent pathways. *Vascular Pharmacology*. ISSN 15371891, 55(1-3), 2-9. doi: 10.1016/j.vph.2011.03.001.
- SILVA, S. *et al.* - Contractile effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on the human internal mammary artery. *Toxicology in Vitro*. ISSN 08872333, 34, 187-193. doi: 10.1016/j.tiv.2016.04.002.
- SJÖHOLM, Å.; ÅKE - Liraglutide Therapy for Type 2 Diabetes: Overcoming Unmet Needs. *Pharmaceuticals*. ISSN 1424-8247, 3(3), 764-781. doi: 10.3390/ph3030764.
- Standards of Medical Care in Diabetes-2011 - doi: 10.2337/dc11-S011.
- SUN, H.-X. *et al.* - Essential Role of MicroRNA-155 in Regulating Endothelium-Dependent Vasorelaxation by Targeting Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Hypertension*. ISSN 0194-911X, 60(6), 1407-1414. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197301.
- SUSSMAN, M. A. *et al.* - Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiological reviews*. ISSN 1522-1210, 91(3), 1023-70. doi: 10.1152/physrev.00024.2010.
- SZMITKO, P. E.; LEITER, L. A.; VERMA, S. - The incretin system and cardiometabolic disease. *The Canadian journal of cardiology*. ISSN 1916-7075, 26(2), 87-95.

TASYUREK, H. M. et al. - Incretins: Their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. ISSN 15207552, 30(5), 354-371. doi: 10.1002/dmrr.2501.

THUM, T. et al. - Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling Impairs Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Function in Diabetes. *Diabetes*. ISSN 0012-1797, 56(3), 666-674. doi: 10.2337/db06-0699.

THUM, T. et al. - Suppression of Endothelial Progenitor Cells in Human Coronary Artery Disease by the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor Asymmetric Dimethylarginine. *Journal of the American College of Cardiology*. ISSN 07351097, 46(9), 1693-1701. doi: 10.1016/j.jacc.2005.04.066.

USSHER, J. R.; DRUCKER, D. J. - Cardiovascular Biology of the Incretin System. *Endocrine Reviews*. ISSN 0163-769X, 33(2), 187-215. doi: 10.1210/er.2011-1052.

VITEK, M. P. et al. - Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 0027-8424, 91(11), 4766-70.

WU, K. K.; HUAN, Y. - Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Em Current Protocols in Pharmacology* [on line]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008 [Consult. 8 set. 2017]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294227>. (Vol. Chapter 5, p. Unit 5.47).

Página. ISSN 0066-782X, 87(6), e264-e270. doi: 10.1590/S0066-782X2006001900029.

ZHAO, T. - Direct Effects of Glucagon-Like Peptide-I on Myocardial Contractility and Glucose Uptake in Normal and Postischemic Isolated Rat Hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. ISSN 0022-3565, 317(3), 1106-1113. doi: 10.1124/jpet.106.100982.

ZHAO, X. et al. - Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. ISSN 1107-3756, 35(3), 684-692. doi: 10.3892/ijmm.2014.2052.

ZHOU, S. J. et al. - Liraglutide ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by activating endothelial nitric oxide synthase activity via the downregulation of the nuclear factor- κ B pathway. *Molecular Medicine Reports*. ISSN 17913004 doi: 10.3892/mmr.2014.2555.