



COMUNICAÇÕES ORAIS (Sessão 6)

Sábado, 8 de Março de 2014

(11h45 - 12h45)

SALA NEPTUNO

(Sessão 6.1. a 6.6.)

Sessão 6.1.- Oral - Investigação

NEURODEGENERAÇÃO DA VIA SEROTONINÉRGICA DESCENDENTE DE MODULAÇÃO DA DOR DURANTE A DIABETES: O PAPEL DO STRESS OXIDATIVO

Morgado C.¹, Miranda A.², Raposo D.³, Silva J.², Pereira-Terra P.³, Neto F.³, Tavares I.³

1- Departamento de Biologia Experimental, Faculdade de Medicina do Porto e IBMC, Universidade do Porto, Nutrição, Porto

2- Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho, Braga

3- Departamento de Biologia Experimental, Faculdade de Medicina do Porto e IBMC, Universidade do Porto, Porto

Introdução: As alterações estruturais e funcionais das vias nociceptivas ascendentes parecem contribuir para a dor associada à neuropatia diabética (ND). Os efeitos da diabetes nas vias descendentes de modulação nociceptiva e a sua influência no controlo da dor são ainda desconhecidos. Estudos preliminares demonstraram níveis aumentados de *stress* oxidativo na medula rostroventromedial (RVM), uma área envolvida na modulação descendente da dor mediada pela serotonina, que poderão estar a comprometer a modulação nociceptiva e contribuir para a dor associada à ND.

Objetivos: Este trabalho teve como objetivo principal avaliar se o *stress* oxidativo afeta a integridade neuronal no RVM, nomeadamente dos neurónios serotoninérgicos.

Material e Métodos: A diabetes foi induzida em ratos Wistar machos por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg). Os animais controlo receberam solução veículo. A um grupo de ratos diabéticos foi administrada uma solução aquosa de EGCG (2 g/l) (Diab+EGCG), um potente antioxidante presente no chá verde, durante 10 semanas. Os restantes animais consumiram apenas água (Ctrl e Diab). Os animais foram sacrificados às 10 semanas de diabetes, após avaliação comportamental da sintomatologia dolorosa. A densidade neuronal no RVM foi determinada por contagem do número de células imunorreativas para NeuN (um marcador neuronal). Os neurónios serotoninérgicos foram identificados por imunodeteção da enzima hidroxilase do triptofano (enzima limitante na síntese de serotonina). Os níveis de *stress* oxidativo foram quantificados por imunodeteção de 8-OHdG (marcador de dano oxidativo do material genético). A morte celular foi quantificada por ensaio de TUNEL.

Resultados: O grupo Diab apresentou uma diminuição significativa na densidade neuronal e no número de neurónios serotoninérgicos no RVM, acompanhada por um aumento nos níveis de *stress* oxidativo e morte celular. Estas alterações foram prevenidas pelo tratamento com EGCG, o que se fez acompanhar por uma melhoria da sintomatologia dolorosa.

Conclusão: A diabetes induz neurodegeneração no RVM, nomeadamente dos neurónios serotoninérgicos, por aumento de *stress* oxidativo e morte celular, o que poderá estar a comprometer a inibição serotoninérgica da dor e justificar ineficácia analgésica dos fármacos inibidores da recaptação da serotonina na dor associada à ND. O uso de antioxidantes poderá ser benéfico na prevenção da neurodegeneração e melhorar os efeitos analgésicos dos fármacos referidos.

Apoio IJUP/UNICER e REDDSTAR

Sessão 6.2.- Oral - Investigação

SITAGLIPTINA: NOVOS HORIZONTES TERAPÊUTICOS

Lemos E. T.¹, Mega C.², Vala H.³, Oliveira J.³, Santos P. R.⁴, Marques C.⁵, Mascarenhas-Melo F.⁵, Pinto R.⁶, Teixeira F.⁵, Fernandes R.⁵, Reis F.⁵

1- ESAV, Instituto Politécnico de Viseu e Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra

2- Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra e ESAV, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

3- ESAV, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu e Centro de Estudos Educacionais, Tecnológicos e de Saúde, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

4- Instituto de Imunologia, Fac Medicina, U Coimbra e Lab de Imunologia e Oncologia, Centro de Neurociências e Biologia Celular, Coimbra

5- Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra

6- Departamento de Ciências Farmacêuticas e iMed.UL-grupo PTR, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa

Os inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), ao serem capazes de aumentar e prolongar os efeitos das incretinas endógenas, estimulam a secreção de insulina, inibindo a produção de glucagon, preservando a massa de células β pancreáticas, constituindo-se como uma nova opção terapêutica. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar, num modelo animal de DM2 os mecanismos responsáveis pela protecção pancreática demonstrada pela sitagliptina, um inibidor da DPP-4. Foram utilizados ratos diabéticos obesos (Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (fa/fa)) (n=15) e os seus controlos não diabéticos e não obesos (ZDF (+/+)) (n=5) com 20 semanas de idade. O grupo diabético foi sub-dividido em 2 grupos (n=5 cada): a) veículo e b) tratado com sitagliptina p.o 10 mg/kg (1 vez/dia durante 6 semanas). Às 26 semanas de idade os animais foram sacrificados tendo-se colhido sangue, para avaliação de glicemia, HbA1c, insulinemia, triglicérides e pâncreas. Procedeu-se à avaliação histomorfológica do pâncreas endócrino e exócrino. Efetuou-se ainda à avaliação por RT-qPCR e/ou imunohistoquímica de marcadores de apoptose, inflamação e angiogénese/proliferação (Bax, Bcl2, IL-1 β , VEGF, PCNA e TRIB3).

Resultados apresentam-se em médias \pm e.p.m.; analisados por teste qui-quadrado com simulação de Monte Carlo; ANOVA e teste post-hoc LSD (p<0,05 foi considerado significativo). Os ratos diabéticos tratados com sitagliptina durante 6 semanas apresentaram uma melhoria significativa (p<0,001) em todos os parâmetros metabólicos avaliados prevenindo o aumento da glicemia (16,5%), da trigliceridemia (37,63%) aumentando não só os níveis de insulina nos ratos diabéticos com insulinopenia relativa (33,86%) como também a capacidade funcional das células beta (92,61%). Ao nível do pâncreas endócrino mostraram uma melhoria significativa da fibrose e da congestão vascular, relacionadas com alterações inflamatórias observadas nos ilhéus pancreáticos. No grupo tratado foi evidente a diminuição da apoptose nos ilhéus (rácio Bax/Bcl2 reduzido). Estes efeitos foram complementados com uma redução da sobreexpressão génica de citocinas inflamatórias (IL-1beta) e do TRIB3 e um aumento significativo (p<0,001) da expressão génica dos marcadores proliferativos e de angiogénese (VEGF e PCNA). Também no pâncreas exócrino dos animais diabéticos tratados foi observada uma marcada redução da fibrose e inflamação. A sitagliptina, evidenciou, neste modelo animal de DM2, efeitos que vão para além do controlo metabólico per se, demonstrando a nível dos ilhéus pancreáticos propriedades citoprotectoras, que poderão constituir uma base para novas utilizações da sitagliptina.

Sessão 6.3.- Oral - Investigação

A SUBSTÂNCIA P REGULA A FUNÇÃO DOS MACRÓFAGOS NA PROGRESSÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS

Leal E.¹, Tellechea A.², Kuchibhotla S.³, Auster M.⁴, LoGerfo F.⁴, Pradhan-Nabzdyk L.⁴, Carvalho E.⁴, Veves A.⁵

- 1- Centro de Neurociências e Biologia Celular, Investigação, Coimbra
- 2- Centro de Neurociências e Biologia Celular, Coimbra
- 3- Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Coimbra
- 4- Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA
- 5- Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Endocrinologia, Boston

As ulcerações crónicas do pé diabético ocorrem em áreas afetadas por neuropatia diabética. Como consequência, neuropéptidos, tais como a substância P (SP), que modulam a inflamação, são importantes na cicatrização de feridas. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da SP na ativação de macrófagos. O nosso objetivo foi estudar o efeito de SP na função dos macrófagos na progressão da cicatrização em diabetes. Usamos animais controlo (WT) e dois tipos de animais geneticamente modificados: um sem o receptor de NK1 da SP (NK1RKO) e outro sem o gene que codifica para a SP (TAC1KO). Além disso, tratamos as feridas com SP ou CJ012,255 (CJ), um inibidor do receptor da SP. A diabetes foi induzida por injeção intraperitoneal de streptozotocin, 50 mg/kg, 5 dias. Os animais foram mantidos 8 semanas antes da indução das feridas. Macrófagos, M1 e M2, foram identificados por de imunohistoquímica em várias fases de cicatrização de feridas: basal (Dia-0), Dia-3 e Dia-10 após o ferimento.

O *ratio* M1/M2 aumentou no Dia-0 em murganhos WT e murganhos diabéticos NK1RKO e TAC1KO não diabéticos e diabéticos. Em murganhos WT não diabéticos, a proporção aumentou no Dia-3, mas voltou para níveis normais Dia-10. Em contraste, nos murganhos WT-diabéticos e não-diabéticos e diabéticos NK1R e TAC1 no Dia-0, Dia-3 e Dia-10, a relação M1/M2 permaneceu alta. No Dia-10, o *ratio* M1/M2 aumentou nas feridas tratadas com CJ e murganhos WT-diabéticos. Em contraste, o tratamento com SP reduziu o aumento do *ratio* M1/M2 nos murganhos WT-diabéticos. Resultados similares foram observados na expressão do gene *monocyte chemoattractant 1* (MCP-1) que recruta os monócitos para áreas de inflamação, onde são convertidos em macrófagos. No Dia-0, a expressão do MCP-1 era maior nos murganhos TAC1KO. A expressão do MCP-1 aumentou no Dia-3 em todos os murganhos não-diabéticos e diabéticos. No Dia-10, todos os grupos tiveram uma diminuição da expressão de MCP-1, no entanto, aumentou no WT-diabético. O tratamento com SP aumentou a expressão de MCP-1 no Dia-3 em ambos WT não-diabéticos e diabéticos. No Dia-10, o tratamento com SP reduziu a expressão de MCP-1 em ambos os murganhos WT não-diabéticos e diabéticos, no entanto, os murganhos tratados com CJ tiveram maior expressão comparando com os murganhos tratados com SP.

Em conclusão, a redução da sinalização da SP leva a uma ativação pró-inflamatória de macrófagos da pele antes da indução da ferida. SP desempenha um papel importante na alteração do fenótipo dos macrófagos para M2 promovendo a cicatrização de feridas. Além disso, SP aumenta a expressão do MCP-1 durante as fases iniciais da cicatrização da ferida, mas reduz-se consideravelmente nas fases posteriores.

Sessão 6.4.- Oral - Investigação

ÓXIDO NÍTRICO HIPOTALÁMICO REGULA A BIODISPONIBILIDADE PERIFÉRICA DE INSULINA

Martins F.¹, Tovar S.², Perez-Sieira S.², González-Touceda D.², Jones J. G.³, Natali A.⁴, Diéguez C.², Macedo M. P.⁵

- 1- CEDOC-FCM, Coimbra
- 2- Centro de Investigación de Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, Espanha, Santiago de Compostela
- 3- Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra; Associação Portuguesa de Diabetes (APDP-ERC), Lisboa, Portugal, Coimbra
- 4- Unidade de Metabolismo, Departamento de Medicina Interna, Universidade de Pisa, Pisa, Itália
- 5- Centro de Estudos de Doenças Crónicas, Universidade Nova de Lisboa, Portugal; Associação Portuguesa de Diabetes (APDP-ERC), Lisboa, Portugal

Introdução e Objectivos: A biodisponibilidade de insulina para os tecidos periféricos é definida pelas taxas de secreção e degradação hepática da insulina. Estudos em modelos animais e em humanos demonstraram que o óxido nítrico é um importante regulador da *clearance* hepática da insulina. Contudo, nestes estudos também se observou que o controlo da *clearance* hepática da insulina não é regulada exclusivamente por factores locais. Recentemente o hipotálamo tem aparecido como foco na regulação metabólica. Neste estudo tratamos a hipótese de que a produção de óxido nítrico pelo eixo hipotalâmico regula a *clearance* hepática da insulina e consequentemente a biodisponibilidade periférica da hormona.

Materiais e Métodos: Ratos Wistar machos foram submetidos a cirurgia estereotaxia a fim de se infundir com cânulas simples intracerebroventricular (i.c.v.), ou duplas para a infusão em núcleos específicos. Após a localização do bregma foram usadas as seguintes coordenadas: Lat: 1.2mm, AP: 1.0mm para i.c.v.; AP: -1.8mm, Lat: +/- 0.4mm, DV: -8.0mm para o núcleo paraventricular (PVN); e AP: -2.52mm, Lat: +/- 0.6mm, DV: -9.2mm para a região ventromedial do hipotálamo (VMH). A infusão do bólus de 250ug/2ul de L-NAME, o inibidor da sintase do óxido nítrico, ou de 2ul de soro fisiológico nos controlos, foi efectuada em cada lado do cérebro, no dia da experiência nos animais com infusão aguda (i.c.v., PVN e VMH), ou durante 2 semanas nos animais com infusão crónica (apenas i.c.v. e PVN). Foi efectuada uma prova de tolerância à glucose oral (PTGO) 45min após a infusão de L-NAME com os animais em jejum durante a noite. A glicémia foi monitorizada e foram colhidas amostras de sangue. Os níveis de insulina e péptido-c plasmáticos foram quantificados e a degradação de insulina foi avaliada efectuando a razão entre o péptido-c plasmático e os níveis de insulina durante a PTGO.

Resultados: O inibidor de óxido nítrico, L-NAME, não alterou as excursões de glicémias durante a PTGO. No grupo com infusão aguda apenas os animais dos grupos i.c.v. e PVN demonstraram uma diminuição dos níveis plasmáticos de insulina sem alterações nos níveis de péptido-c sendo estes um reflexo da secreção pancreática de insulina. A *clearance* de insulina foi calculada e a supressão da síntese de óxido nítrico nos grupos i.c.v. e PVN, e não no VMH, resultou num aumento significativo da *clearance* de insulina durante a PTGO. Após a infusão crónica de L-NAME apenas os animais com tratamento na região PVN apresentaram diminuição dos níveis plasmáticos de insulina, sem alterações nos níveis de péptido-c e consequentemente aumento da *clearance* de insulina.

Conclusão: Estes resultados revelam que o aumento hipotalâmico dos níveis de óxido nítrico na região PVN é responsável pela diminuição da *clearance* de insulina o que está de acordo com a hipótese de que a biodisponibilidade periférica de insulina é regulada pela região PVN do hipotálamo.

Financiado por SFRH/BD/51194/2010 e PTDC/DTP-EPI/0207/2012, FCT, Portugal.

Sessão 6.5.- Oral - Investigação

CADEIAS DE INSULINA S-NITROSILADAS: IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Gaspar J. M.¹, Correia M.², Ribeiro R.³, Caldeira J.⁴, Macedo M. P.³

- 1- Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), NOVA Medical School FCM, Universidade NOVA de Lisboa, Investigação, Lisboa
- 2- Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), NOVA Medical School FCM, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa
- 3- Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), NOVA Medical School FCM, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa
- 4- 2REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

Cerca de ~50-70% da insulina portal é removida e degradada durante o efeito de primeira passagem pelo fígado. Este processo é mediado pelas proteína dissulfúto isomerase (PDI) e enzima degradadora de insulina (IDE). Destas, apenas a PDI é capaz de clivar as ligações dissulfídicas da molécula de insulina, separando-a em cadeia A e cadeia B. A restituição dos níveis hepáticos de glutatíon (GSH) e monóxido de azoto (NO), os quais estão diminuídos em jejum, conduz ao aumento da sensibilidade à insulina no estado pós-prandial mecanismo dependente da atividade dos nervos parassimpáticos hepáticos. O processo de clivagem da insulina pela PDI é dependente do GSH sugerindo que no pós-prandial haverá formação das cadeias da insulina em detrimento da degradação. *In vitro* estas cadeias ao serem nitrosiladas (A-SNO e B-SNO) tornam-se estáveis. A hipótese estudada foi de que os derivados nitrosilados da degradação da insulina, A-SNO e B-SNO, existem fisiologicamente no fígado de rato os quais quando atuam no músculo esquelético promovem a captação de glicose. Para detetar a presença de A-SNO e B-SNO *in vivo* foram realizados homogeneizados de fígado de rato (Wistar com 9 semanas de idade), os quais foram submetidos a uma imunoprecipitação para proteínas S-nitrosiladas. Por *western blot* identificámos os derivados B-SNO. Para estudar o seu efeito biológico na captação de glicose utilizámos linhas celulares de músculo esquelético (L6). As células foram estimuladas com cada um dos derivados da insulina (cadeia A, cadeia B, A-SNO e B-SNO), e com insulina 100nM com subsequente avaliação da captação de glicose. A existência *in vivo* de B-SNO foi detetada em homogeneizados de fígado de rato controlo cujos níveis se encontraram diminuídos nos ratos sujeitos a uma desnervação hepática. Observámos ainda que as células musculares quando estimuladas com B-SNO aumentam significativamente a captação de glicose (204.8 ± 30.2% do controlo) na mesma magnitude que a insulina (203.1 ± 15.0% do controlo). O composto A-SNO, embora em menor percentagem, também aumenta significativamente a captação de glicose nas células L6 (159.8 ± 19.1% do controlo). No entanto as cadeias A e B da insulina não têm efeito na captação de glicose nas células L6. Neste estudo identificámos a presença em fígado de ratos de compostos derivados da insulina nitrosilados, nomeadamente B-SNO. Podemos ainda concluir que os derivados nitrosilados da insulina (A-SNO e B-SNO) estimulam a captação de glicose em células musculares.

Este trabalho foi financiado pelas bolsas Albert Renold da EASD e EMBO e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com o projeto PTDC/DTP-EPI/0207/2102 e EXPL/DTP-PIC/0244/2012.

Sessão 6.6.- Oral - Investigação

A ADMINISTRAÇÃO DE ADIPONECTINA ATRAVÉS DE UMA BOMBA INFUSORA DIMINUI A INTOLERÂNCIA À GLICOSE E MELHORA O METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSE EM RATOS MANTIDOS COM DIETA RICA EM GORDURAS

Matafome P.¹, Rodrigues T.¹, Paixão A.¹, Silvério M.¹, Boukari A.¹, Ayari S.¹, Pereira A. M.¹, Letra L.², Azevedo H.³, Almeida A.³, Sena C.¹, Seica R.¹

- 1- Laboratório de Fisiologia, IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra
- 2- Serviço de Neurologia, CHUC, EPE, Coimbra
- 3- Hitag, Biocant, Cantanhede

A adiponectina é uma hormona derivada do tecido adiposo que aumenta o metabolismo lipídico e diminui a lipotoxicidade e a insulino-resistência no tecido adiposo, músculo e fígado. No entanto, a sua administração está longe de ser realidade, devido aos seus elevados custos de produção e os seus níveis circulantes altos, para além da ausência de estudos que comprovem a sua eficácia terapêutica. Assim, o objectivo deste estudo foi produzir adiponectina recombinante e testar a sua eficácia na melhoria do metabolismo, sistémico e do tecido adiposo, em ratos mantidos com dieta rica em gorduras. Ratos Wistar normais foram mantidos com este tipo de dieta entre os 8 e os 12 meses de idade, enquanto a adiponectina foi administrada (2,7mg) num subgrupo destes no último mês, através de uma bomba infusora com libertação contínua. Foi avaliado o perfil metabólico (glicose e lípidos), bem como a activação de vias envolvidas no armazenamento lipídico e na acção da insulina, no tecido adiposo epididimal e subcutâneo. A adiponectina reverteu o aumento de peso causado pela dieta rica em gorduras e reduziu a glicemia em jejum e os níveis de colesterol. A dieta gorda causou uma intolerância à glicose, que foi diminuída pela adiponectina. No tecido adiposo, a dieta causou alterações estruturais, que foram também revertidas pela adiponectina. Na sinalização da insulina, verificou-se uma inibição do IRS-1 e uma activação da Akt em consequência da dieta gorda (maior actividade por vias não canónicas), sobretudo no tecido epididimal. Verificou-se também uma diminuição dos níveis de IκBα, sugerindo maior actividade inflamatória. Apesar dos níveis totais inalterados, aumentou o número de zonas positivas para F4/80 na marcação histológica (acumulação de macrófagos). O tratamento com adiponectina normalizou a activação do IRS-1 e da Akt, os níveis de IκBα e diminuiu as regiões positivas para F4/80. A dieta gorda causou também uma diminuição do nível de PPARγ, o que foi revertido pela adiponectina. De forma consistente com a intolerância à glicose, a dieta rica em gorduras levou a uma menor activação da lipólise (HSL), normal no jejum. Esta activação foi parcialmente restaurada pela adiponectina. A administração de adiponectina recombinante através de uma bomba infusora foi eficaz na melhoria da sinalização da insulina e do armazenamento lipídico após o consumo de uma dieta rica em gorduras. A adiponectina foi igualmente eficaz na melhoria do perfil metabólico.