

# TRATAMENTO FARMACOLÓGICO REVERTE REMODELAMENTO ULTRAESTRUTURAL PANCREÁTICO ADVERSO E RESISTÊNCIA À INSULINA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

*Vanessa Souza-Mello  
Eliete Dalla Corte Frantz  
Bianca Martins Gregório  
Márcia Barbosa Águila  
Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda<sup>1</sup>*

## Resumo

O pâncreas sofre remodelamento estrutural em animais submetidos à sobrecarga alimentar hiperlipídica. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de monoterapias e associações medicamentosas sobre o metabolismo de carboidratos e ultraestrutura pancreática num modelo experimental de síndrome metabólica (SM). **Métodos:** Camundongos C57BL/6 de 3 meses de idade receberam dieta hiperlipídica (60% lipídios) ou dieta padrão (10% lipídios) por 10 semanas, sendo, então, iniciado tratamento farmacológico, oito grupos experimentais foram formados: SC (dieta padrão, sem tratamento); HF (dieta hiperlipídica, sem tratamento); HF-T (HF+Telmisartana, 9mg%); HF-S (HF+Sitagliptina, 1,1g%); HF-M (HF+Metformina, 600 mg%) e as associações HF-TM, HF-TS e HF-SM. O tratamento durou 6 semanas. A presença de esteatose pancreática foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão e a insulinemia por radioimunoensaio. Os índices Homa-IR e Homa-B foram também calculados. **Resultados:** A dieta HF resultou em sobrepeso nos animais após duas semanas de administração quando comparado ao grupo SC, condição que foi mantida ao longo de todo o experimento ( $p<0,0001$ ). Os índices Homa-IR (avalia a resistência à insulina) e HOMA-B (avalia a hipersecreção das ilhotas) encontraram-se aumentados no grupo HF ( $p<0,0001$ ). Todos os tratamentos resultaram em normalização da insulinemia e redução da resistência à insulina. A microscopia eletrônica revelou citoarquitetura preservada e ausência de esteatose nos grupos tratados, enquanto o grupo HF apresentou células desorganizadas e gotículas de gordura no interior dos ácinos. **Conclusão:** Os tratamentos propostos foram eficazes ao tratar a resistência à insulina, promovendo insulinemia normal e redução da esteatose pancreática num modelo experimental de SM. Apoio: CNPq, Faperj.

**Palavras-chave:** Síndrome metabólica. Ultraestrutura pancreática. Sitagliptina. Telmisartana. Metformina.

<sup>1</sup> Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular ([www.lmmc.uerj.br](http://www.lmmc.uerj.br)), Departamento de Anatomia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – RJ. e-mail: elietedcf@gmail.com

## Introdução

A síndrome metabólica (SM) inclui aumento da circunferência abdominal, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia e resistência à insulina (RI) ou Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Eckel, Grundy *et al.*, 2005). O excesso de tecido adiposo visceral é um pilar para o desenvolvimento dos caracteres da SM, onde o tecido adiposo falha ao tentar armazenar os lipídios pós-prandiais, levando ao acúmulo ectópico de gordura em órgãos como o pâncreas, um fenômeno conhecido como lipotoxicidade (McGarry; Dobbins, 1999; Sharma; Engeli, 2006).

Novas drogas propostas para o tratamento da SM apresentam ação sobre o metabolismo de lipídios e/ou carboidratos (Kurtz, 2005; Erbe *et al.*, 2006). A Telmisartana é um anti-hipertensivo que bloqueia o receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II (BRA) (Burnier; Brunner, 2000), mas também é agonista parcial do PPAR- $\alpha$  (Benson, 2004). Integrando essas duas ações, o desarranjo metabólico e inflamatório da SM pode ser contornado (Benndorf *et al.*, 2006).

A sitagliptina pertence a uma nova classe de agentes antidiabéticos. A partir da inibição da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), ocorre aumento da vida média das incretinas (Drucker; Nauck, 2006; Theodorakis *et al.*, 2006; Baggio; Drucker, 2007). O mais importante desse hormônio é o GLP-1 (“*Glucagon-like peptide-1*”), cujas ações incluem a diminuição da secreção de glucagon pelas células alfa concomitante ao aumento da sensibilidade à insulina e biossíntese desta (Baggio; Drucker, 2007; Lamont; Drucker, 2008). Por outro lado, a metformina vem sendo amplamente utilizada em estudos experimentais e sua ação advém da redução da produção hepática de glicose, resultando na melhora da resistência hepática à insulina e no aumento da sua sensibilidade nos tecidos periféricos (Inzucchi *et al.*, 1998; Verma *et al.*, 2000).

Dada a multifatorialidade da SM, o presente trabalho visou a avaliar a associação de diferentes agentes farmacológicos sobre o remodelamento estrutural e ultraestrutural pancreático num modelo experimental de SM.

## Metodologia

**Animais:** Camundongos machos C57BL/6 (3 meses de idade) passaram a receber dieta padrão para camundongos (10% lipídios - 420Kcal/100g) ou dieta *high fat* (60% lipídios - HF - 540 Kcal/100g). Após 10 semanas de dieta, os animais foram redivididos de acordo com medicamento que iriam receber, perfazendo 8 grupos (n=6): i) SC (*standard chow* - dieta padrão ao longo de todo o experimento), ii) HF (dieta *high fat* durante todo o experimento), iii) HF-T (dieta HF + Telmisartana - 0,01%), iv) HF-S (dieta HF + Sitagliptina - 0,9%), HF-M (dieta HF + Metformina - 0,48%), vi) HF-TS (dieta HF + Telmisartana + Sitagliptina) vii) HF-TM (dieta HF + Telmisartana + Metformina) e viii) HF-SM (dieta HF + Sitagliptina + Metformina). Os fármacos foram incorporados à dieta dos animais, a qual foi repostada diariamente. O tratamento medicamentoso e/ou o esquema alimentar após os 5 meses de idade durou 6 semanas, quando os animais foram sacrificados.

**Bioquímica do sangue e radioimunoensaio:** A insulinemia foi dosada por radioimunoensaio e juntamente com a glicemia de jejum foram calculados os seguintes índices: Homa-IR (glicemia de jejum x insulinemia de jejum/22,5) e Homa-B (20 x insulinemia de jejum / glicemia de jejum - 3,5).

**Imunofluorescência:** A imunofluorescência foi realizada para localizar insulina e glucagon nas ilhotas pancreáticas. Os anticorpos anti-insulina (antiguinea pig, A0564 Dako) e antiglucagon (antirabbit, A0565, Dako) foram utilizados na diluição 1:50. A dupla marcação foi realizada com a utilização de dois anticorpos secundários distintos (antiguinea pig e antirabbit) conjugados com o fluoróforo Alexa. Um microscópio confocal a laser (CLSM-510 Meta-Zeiss) foi utilizado para visualização e fotomicrografias foram obtidas usando objetivas de 20x (EC Plan-Neofluar).

**Microscopia eletrônica de transmissão:** Pequenos fragmentos de pâncreas (1mm<sup>2</sup>) foram fixados com 1,5% de glutaraldeído em 0,1 mol de tampão cacodilato, pH 7,4, pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% em 0,1 mol de tampão cacodilato, desi-

tratados em soluções de acetona de concentração crescente e incluídas em resina epóxi. Seções ultrafinas (68nm) foram cortadas em ultramicrotomo (Leica), contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas ao microscópio eletrônico (Zeiss EM 906).

*Análise estatística:* Os dados são mostrados como média  $\pm$  EPM. As comparações entre os grupos foram feitas pelo *One-way* Anova seguido pelo pós-teste de Tukey, por meio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Resultados e Discussão

A dieta HF promoveu ganho ponderal e maior acúmulo de gordura corporal ( $p < 0,0001$ ). A perda de peso foi significativa em todos os grupos tratados (Tabela 1). A telmisartana merece destaque, uma vez que normalizou a massa corporal nos grupos HF-T e HF-TS ao término do experimento. Ela age como um agonista parcial PPAR-gama, resultando no aumento dos níveis de adiponectina, a qual ativa a oxidação de ácidos graxos (Benson et al., 2004; Tuck, 2005). Devido a esses eventos, a gordura é metabolizada para alcançar os requerimentos energéticos ao invés de ser desviada para depósitos ectópicos de gordura (Benson et al., 2004; Araki et al., 2006; Sugimoto et al., 2008).

A resistência à insulina foi verificada no grupo HF por meio do aumento do Homa-IR ( $p < 0,0001$ , Tabela 1). Na vigência de resistência à insulina, as ilhotas hipertrofiam e hipersecretam insulina numa tentativa de compensar a reduzida captação de glicose e normalizar a glicemia até que ocorra a exaustão pancreática (Bonora, 2008). A hipersecreção das ilhotas foi verificada nos animais HF por meio de um aumento do Homa-B ( $p < 0,0001$ , Tabela 1). Ambos os achados foram eficientemente tratados, visto que ilhotas pancreáticas de tamanho normal, níveis normais de insulina e Homa-B normal foram encontrados em todos os grupos tratados.

Diferenças expressivas foram observadas na arquitetura e na composição celular das ilhotas após a imunofluorescência (Figura 1). Nossos resultados

corroboram com relatos prévios (Mu et al., 2006), nos quais uma distribuição anormal de células alfa foi visualizada no grupo HF. A expressão de glucagon foi tão intensa no grupo HF que as células alfa positivas não ficaram restritas à periferia da ilhota, mas se infiltraram na estrutura inteira, incluindo seu cerne, ao passo que no grupo SC as células alfa compreenderam um manto de células positivamente marcadas para glucagon ao redor das ilhotas. A expansão da massa de células alfa faz-se necessária devido à aumentada demanda metabólica imposta pela compensação de células beta nos estados de resistência à insulina (Ellingsgaard et al., 2008).

Em contraste, todos os tratamentos resultaram em normalização do padrão de distribuição de células beta/células alfa nas ilhotas pancreáticas. A hiperglicagonemia correlaciona-se diretamente com a resistência hepática à insulina e função anormal das ilhotas (Winzell et al., 2007) e, conseqüentemente, todos os grupos tratados se beneficiaram da redução da massa de células alfa e da expressão de glucagon.

A microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2) revelou glóbulos de gordura abundantes, caracterizando doença não alcoólica do pâncreas gorduroso no grupo HF (Lee et al., 2010). As gotículas lipídicas promoveram um completo desarranjo da citoarquitura acinar. A presença de células estreladas pancreáticas ativadas (PSCs) nos animais HF sugere uma progressão para a esteatopancreatite não-alcoólica (NASP) (Fraulob; Ogg-Diamantino et al., 2010).

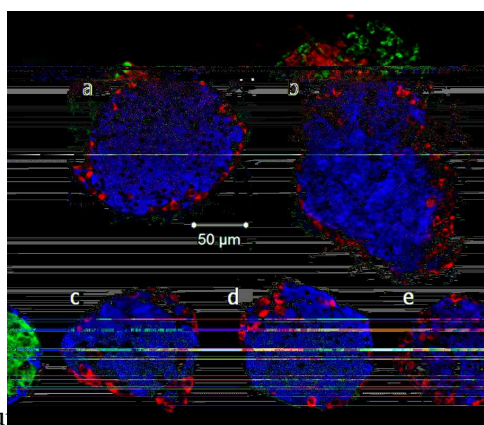


Figura 1. Imunofluorescência (células alfa em vermelho e células beta em verde) das ilhotas pancreáticas dos animais aos 7 meses de idade (pós-tratamento).

Fonte: Dados obtidos pelos autores. Rio de Janeiro, 2010.

## Conclusões

Os resultados sugerem que os diversos tratamentos propostos foram eficazes à medida que cursaram com perda ponderal significativa e redução dos estoques de gordura corporal, além da normalização do padrão de distribuição células alfa/ células beta. A microscopia eletrônica de transmissão revelou menor grau de esteatose pancreática nos grupos tratados, além de uma normalização da citoarquitetura dos ácinos, enquanto o grupo HF apresentou alterações ultraestruturais condizentes com a resistência à insulina e lipotoxicidade.

## Referências

ARAKI, K. et al. Telmisartan Prevents Obesity And Increases The Expression Of Uncoupling Protein 1 In Diet-Induced Obese Mice. *Hypertension*, v. 48, n. 1, p. 51-57, jul. 2006.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology Of Incretins: GLP-1 And GIP. *Gastroenterology*, v. 132, n. 6, p. 2.131-2.157, may 2007.

BENNDORF, R. A. Telmisartan Improves Insulin Sensitivity In Nondiabetic Patients With Essential Hypertension. *Metabolism*, v. 55, n. 9, p. 1.159-1.164, sep. 2006.

BENSON, S. C. et al. Identification Of Telmisartan As A Unique Angiotensin II Receptor Antagonist With Selective Ppargamma-Modulating Activity. *Hypertension*, v. 43, n. 5, p. 993-1.002, may 2004.

BONORA, E. Protection Of Pancreatic Beta-Cells: Is It Feasible? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v. 18, n. 1, p. 74-83, jan. 2008.

BURNIER, M.; BRUNNER, H. R. Angiotensin II Receptor Antagonists. *Lancet*, v. 355, n. 9.204, p. 637-45, 19 feb. 2000.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The Incretin System: Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists And Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors In Type 2 Diabetes. *Lancet*, v. 368, n. 9.548, p. 1.696-1.705, 11 nov. 2006.

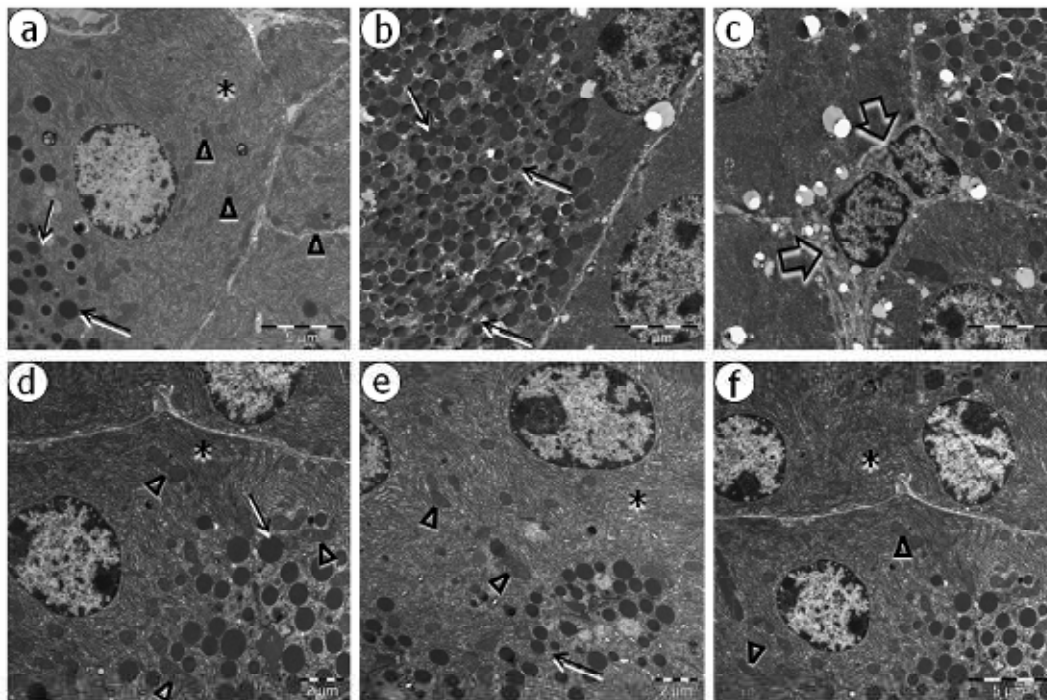


Figura 2: Eletromicrografia dos ácinos pancreáticos dos animais aos 7 meses de idade (pós-tratamento). Legenda: a = standard chow; b = high fat; c= célula estrelada pancreática ativada (grupo HF); d = high fat + telmisartana; e = high fat + sitagliptina; f = high fat + telmisartana + sitagliptina.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores. Rio de Janeiro, 2010.

- ECKEL, R. H. et al. The Metabolic Syndrome. *Lancet*, v. 365, n. 9.468, p. 1.415-1.428, 16-22 apr. 2005.
- ELLINGSGAARD, H. et al. Interleukin-6 Regulates Pancreatic Alpha-Cell Mass Expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 105, n. 35, p. 13.163-13.168, 2 sep. 2008.
- ERBE, D. V. et al. Molecular Activation Of Pargamma By Angiotensin II Type 1-Receptor Antagonists. *Vascul Pharmacol*, v. 45, n. 3, p. 154-162, sep. 2006.
- FRAULOB, J. C. et al. A Mouse Model Of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease In C57BL/6 Mice Fed A High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr*, v.46, p. 212-223, 2010.
- INZUCCHI, S. E. et al. Efficacy And Metabolic Effects Of Metformin And Troglitazone In Type II Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, v. 338, n. 13, p. 867-872, 26 mar. 1998.
- KURTZ, T. W. Treating The Metabolic Syndrome: Telmisartan As A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activator. *Acta Diabetol*, v.42, suppl 1, p. S9-16, apr. 2005.
- LAMONT, B. J.; DRUCKER, D. J. Differential Antidiabetic Efficacy Of Incretin Agonists Versus DPP-4 Inhibition In High Fat Fed Mice. *Diabetes*, v. 57, n. 1, p. 190-198, jan.2008.
- LEE, Y. et al. Pancreatic Steatosis: Harbinger Of Type 2 Diabetes In Obese Rodents. *Int J Obes (Lond)*, v. 34, n. 2, p. 396-400, feb. 2010.
- MCGARRY, J. D.; DOBBINS, R. L. Fatty Acids, Lipotoxicity And Insulin Secretion. *Diabetologia*, v. 42, n. 2, p. 128-38, feb. 1999.
- MU, J. et al. Chronic Inhibition Of Dipeptidyl Peptidase-4 With A Sitagliptin Analog Preserves Pancreatic Beta-Cell Mass And Function In A Rodent Model Of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, v. 55, n. 6, p. 1.695-1.704, jun. 2006.
- SHARMA, A. M.; ENGELI, S. The Role Of Renin-Angiotensin System Blockade In The Management Of Hypertension Associated With The Cardiometabolic Syndrome. *J Cardiometab Syndr*, v. 1, n. 1, p. 29-35, winter 2006.
- SUGIMOTO, K. et al. Telmisartan Increases Fatty Acid Oxidation In Skeletal Muscle Through A Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Dependent Pathway. *J Hypertens*, v. 26, n. 6, p. 1.209-1.215, jun. 2008.
- THEODORAKIS, M. J. et al. Human Duodenal Enteroendocrine Cells: Source Of Both Incretin Peptides, GLP-1 And GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 290, n. 3, p. E550-559. mar. 2006.
- TUCK, M. L. Angiotensin-Receptor Blocking Agents And The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma System. *Curr Hypertens Rep*, v. 7, n. 4, p. 240-243, aug. 2005.
- VERMA, S. et al. Metformin Treatment Corrects Vascular Insulin Resistance In Hypertension. *J Hypertens*, v. 18, n. 10, p. 1.445-1.450, oct. 2000.
- WINZELL, M. S. et al. Glucagon Receptor Antagonism Improves Islet Function In Mice With Insulin Resistance Induced By A High-Fat Diet. *Diabetologia*, v. 50, n. 7, p. 1.453-1.462. jul. 2007.

Tabela 1 - Massa corporal e metabolismo de carboidratos

| Parâmetros          | SC                   | HF                        | HF-T                     | HF-S                      | HF-M                      | HF-TM                     | HF-TS                   | HF-SM                     |
|---------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>Biometria</i>    |                      |                           |                          |                           |                           |                           |                         |                           |
| Massa corporal (g)  | 25,12±0,25<br>(2.23) | 38,05±0,88 <sup>a</sup>   | 27,88±0,20 <sup>b</sup>  | 30,65±0,89 <sup>a b</sup> | 30,62±0,58 <sup>a b</sup> | 29,58±0,65 <sup>a b</sup> | 27,17±0,62 <sup>b</sup> | 30,37±0,40 <sup>a b</sup> |
| <i>Carboidratos</i> |                      |                           |                          |                           |                           |                           |                         |                           |
| Insulina (ng/dL)    | 7,59±0,22            | 23,53±2,28 <sup>a</sup>   | 10,32±1,80 <sup>b</sup>  | 13,06±1,92 <sup>b</sup>   | 12,84±2,00 <sup>b</sup>   | 12,22±0,54 <sup>b</sup>   | 12,51±1,36 <sup>b</sup> | 11,10±0,78 <sup>b</sup>   |
| HOMA-IR             | 41,70±1,93           | 159,10±16,77 <sup>a</sup> | 58,46±11,18 <sup>b</sup> | 73,36±11,73 <sup>b</sup>  | 69,86±12,33 <sup>b</sup>  | 78,31±1,37 <sup>b</sup>   | 81,59±9,14 <sup>b</sup> | 71,07±4,39 <sup>b</sup>   |
| HOMA-B              | 45,29±1,66           | 95,09±11,17 <sup>a</sup>  | 58,10±1,28 <sup>b</sup>  | 74,18±12,91 <sup>b</sup>  | 78,54±13,70 <sup>b</sup>  | 55,43±7,76 <sup>b</sup>   | 53,99±7,63 <sup>b</sup> | 49,56±5,49 <sup>b</sup>   |

Dados mostrados como média ± EPM. Símbolos representam diferença estatística de (a) SC, (b) HF, (c) HF-T, (d) HF-S, (e) HF-M, (f) HF-TM e (g) HF-TS, p<0.05, One-way Anova, post-hoc test de Tukey.

Fonte: Banco de dados dos pesquisadores.