

Departamento de Ciências da Vida
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
para prestação de provas de Mestrado em Bioquímica

Trabalho realizado sob orientação científica da Professora Doutora Sónia Silva Santos e do
Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro, no Laboratório de Farmacologia e
Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Agradecimentos

À Professora Doutora Sónia Santos, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientadora desta tese de dissertação de mestrado, agradeço toda a orientação e todos os conhecimentos científicos transmitidos desde 2007, ano em que realizei o meu projecto de licenciatura. Sinto-me grata pela particularidade de cada um dos momentos em que me acompanhou, desde o laboratório às conversas de gabinete e mesmo às gargalhadas que partilhámos. Quero ainda realçar o facto de sempre ter acreditado em mim, no meu potencial, na minha capacidade e nas minhas qualidades, dando-me a confiança e o apoio necessários para enfrentar todo este percurso que, por vezes, me assustou. Não irei esquecer o tempo, a disponibilidade, a compreensão, o empenho, a preocupação, a consideração, o carinho e a amizade.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes Ribeiro, Director do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, co-Orientador desta tese de dissertação de mestrado, o meu Obrigada pela oportunidade de participar neste projecto de investigação, pela orientação, pela disponibilidade e pela compreensão demonstradas.

Ao Professor Doutor Ângelo Tomé, docente do departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e orientador de ligação desta dissertação de mestrado, agradeço a orientação prestada, a consideração, a prontidão, a ajuda demonstradas e principalmente a amizade durante todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Raquel Seça e ao Doutor Paulo Matafome, investigadores do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela colaboração neste projecto científico, tornando-o mais completo e mais enriquecido.

À professora Doutora Rosa Santos, docente do departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço não só o material gentilmente cedido para este projecto científico, bem como todos os ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Não posso deixar de mencionar os professores que mais me acompanharam durante o meu percurso académico: Professor Doutor Rui de Carvalho e Professor Doutor Manolo, docentes do departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da

Universidade de Coimbra, pelo convívio e transmissão de saberes que me proporcionaram, Obrigada.

À Professora Doutora Margarida Castro, docente do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, por todo o apoio e palavras de apreço, a minha plena gratidão.

Ao pai José e à mãe Alda, por me permitirem o direito à Educação, agradeço o presente e o futuro. Assim, de hoje em diante, quero orgulhá-los e retribuir-lhes com o meu desempenho, o meu esforço, o meu trabalho e a minha força. Obrigada.

Aos meus avós, porque sempre fui a menina dos seus olhos... ao meu avô Heitor e à minha avó Helena, os meus segundos pais. Os seus olhos orgulhosos quando falam de mim, a sua expressão de alegria quando me vêem, o modo como me admiram... é algo tão recompensador que se torna indizível. Nunca vou conseguir demonstrar como agradeço o privilégio de os ter comigo. E porque gostam tanto de mim, eu tenho a honra de ser vossa neta. Obrigada.

Ao meu irmão Dinis, o miúdo que cresceu e eu nem reparei! Sei que contaremos sempre um com o outro e estaremos sempre unidos. Pelo teu apoio, pela tua compreensão, pelo teu carinho, Obrigada.

Aos 100 anos de vida da minha Tia Lavínia, que desde sempre foi um exemplo de trabalho, de honestidade, de dedicação e de coragem. Histórias, ensinamentos e valores que me acompanharão sempre. Lembrarei sempre aquele olhar da pessoa mais genuína que conheço. Pela devoção e pelo amor, Obrigada.

À Tina, que faz parte do meu percurso de vida e que faz da minha casa a sua segunda família. Sempre pronta a ajudar, em qualquer situação, com carinho e dedicação, Obrigada.

Apesar de as saudades serem muitas, não esqueço o amor com que a Zelinda sempre me tratou. Não houve tempo para despedidas, mas recordo-a com muito amor e muita saudade. Sei que olha por mim. Obrigada.

Aos grandes meus amigos: Ana Marta Romão, Bruno Santos, Inês Martins, João Rodrigues, Ludgero Tavares, Marco Castro, Marco Veloso, Raquel Cerejo, Rita Garcia, Sara Amaral, Telmo Santos e Vanessa Martins. Não sei como começar mas sei que nunca vou acabar... Com vocês descobri, sorri, vivi, chorei, caminhei, sonhei, lutei, aprendi, errei e,

sobretudo, eu cresci. Pelo apoio, pelo acreditar em mim, por me deixarem ser como sou, por não me deixarem sozinha, porque me deram coragem e ajudaram a ultrapassar os meus medos, Obrigada. Por isto e pelo amor e amizade, guardo-vos-ei em mim hoje e sempre. O meu obrigada por estes anos tão enriquecedores. O meu obrigada por fazerem parte da minha vida... ela não acaba aqui, mas uma parte dela vai convosco. A vós, que me inspiraram tanto, a vocês que me marcaram tanto, Obrigada.

Aos meus amigos de infância e adolescência, Ana Luísa Castro, António Godinho, Eduardo Costa, Inês Ribeiro, Luís Nunes, Manuel Campos e Vânia Costa, porque o que realmente importa são os que ficam e que me vão acompanhar sempre. Não há tempo ou distância. Sei que vão estar sempre aí. Sei que gostam de mim e se importam comigo. As palavras são redutoras para descrever o quanto me sinto grata pela vossa amizade. Obrigada.

Dedico esta tese aos meus pais, aos meus avós, ao meu irmão, à minha tia e aos meus amigos.

A vós, o meu trabalho, a minha dedicação, o meu amor e a minha vida.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	2
Abstract	5
Capítulo 1 – Introdução	8
1.1. <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2	9
1.1.1. Caracterização geral	9
1.1.2. Mecanismos moleculares associados à <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2	11
1.1.3. Terapêutica farmacológica associada à <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2	13
1.2. Metformina	14
1.2.1. Caracterização geral	14
1.2.2. Mecanismo de acção da metformina	16
1.2.2.1. Mecanismo de acção da metformina a nível hepático	17
1.2.2.2. Mecanismo de acção da metformina no músculo esquelético	18
1.2.2.3. A metformina e a actividade da AMPK	19
1.2.2.4. Impacto da metformina no perfil lipídico diabético	20
1.2.2.5. Cardioprotecção associada à metformina	21
1.3. Efeitos adversos associados à metformina	23
1.3.1. Diarreia diabética e não diabética	24
1.4. O sistema gastrointestinal	28
1.4.1. Estrutura da parede intestinal	28
1.4.2. Contração do músculo liso intestinal	29

1.4.3.	Regulação da motilidade intestinal	32
1.4.3.1.	A serotonina no sistema gastrointestinal	35
Capítulo 2 – Objectivos		40
Capítulo 3 – Material e Métodos		42
3.1.	Animais	43
3.2.	Isolamento do órgão	44
3.3.	Protocolos experimentais – estudos funcionais	45
3.4.	Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais	47
3.5.	Reagentes e fármacos utilizados nos estudos funcionais	47
3.6.	Protocolos experimentais – técnicas de histologia e imunohistoquímica	47
3.6.1.	Micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato	47
3.6.2.	Localização celular dos receptores 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} e 5-HT _{2A} em segmentos de íleo de rato Wistar	48
3.7.	Reagentes e materiais utilizados nos estudos histológicos e imunohistoquímicos	49
Capítulo 4 – Resultados		50
4.1.	Resposta contráctil do íleo de rato à metformina	51
4.2.	Efeito da tetrodotoxina e do hexametónio na resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo: validação do protocolo experimental	53
4.3.	Efeito da metformina na resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo	54
4.4.	Efeito da tetrodotoxina e do hexametónio na resposta contráctil do íleo de rato à metformina	55
4.5.	Efeito da atropina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina	56
4.6.	Efeito da N ^G -nitro-L-arginina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina	57
4.7.	Efeito da mepiramina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina	58

4.8.	Efeitos do SB 224289, cetanserina, ritanserina, metiotepina e MDL 72222 na resposta contráctil do íleo de rato à metformina	59
4.9.	Efeito da cetanserina e/ou da ritanserina na resposta contráctil do íleo de rato Wistar à 5-HT: comparação com um modelo animal de <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2	61
4.10.	Resposta contráctil do íleo de rato <i>Goto-Kakizaki</i> , um modelo animal de <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2, à metformina: comparação com ratos Wistar controlo	63
4.11.	Efeito da reserpina na resposta contráctil do íleo de rato Wistar à metformina	65
4.12.	Efeito da ritanserina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina, num modelo animal de <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2	66
4.13.	Estudos histológicos e imunohistoquímicos dos segmentos de íleo de rato Wistar e <i>Goto-Kakizaki</i>	67
4.13.1.	Micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato	68
4.13.2.	Localização celular dos receptores dos subtipos 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} e 5-HT _{2A} em segmentos de íleo de rato Wistar	70
Capítulo 5 – Discussão		72
Capítulo 6 – Conclusões		85
Capítulo 7 – Referências Bibliográficas		87

Índice de Figuras

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.1.	Mecanismo de acção da metformina.	16
Figura 1.2.	Estrutura e inervação da parede gastrointestinal (adaptado de Noback <i>et al.</i> , 2005).	29
Figura 1.3.	Vias de sinalização celular do mecanismo de contracção do músculo liso (adaptado de Morelli <i>et al.</i> , 2006)	31

Capítulo 3 – Material e Métodos

Figura 3.1.	Segmentos de íleo montados em banhos de órgãos de 15 ml.	44
Figura 3.2.	Registos de uma curva não cumulativa frequência-resposta à estimulação eléctrica de campo (B) e de uma curva não cumulativa concentração-resposta à metformina (B) em íleo de rato. Escala: 10 mm = 3,9 mN.	45

Capítulo 4 – Resultados

Figura 4.1.	Respostas contrácteis do íleo de rato a duas curvas concentração-resposta (CR) sucessivas não cumulativas de metformina (●, 1ª curva CR; ●, 2ª curva CR); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste <i>t</i> de Student. * $p < 0,05$ vs 1ª curva CR.	52
Figura 4.2.	Resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo na ausência (●, controlo) e na presença de 300 μ M de hexametónio e 1 μ M de TTX (▽); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste <i>t</i> de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.	53
Figura 4.3.	Resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo na ausência (●, controlo) e na presença de 36 μ M de metformina (★); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.	54
Figura 4.4.	Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 300 μ M de hexametónio e 1 μ M de TTX (△); os resultados	55

estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

- Figura 4.5.** Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 10 μ M de atropina (■); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M. 56
- Figura 4.6.** Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 250 μ M N^G-nitro-L-arginina (▲, L-NNA); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M. 57
- Figura 4.7.** Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de mepiramina (✕); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 58
- Figura 4.8.** Resposta contráctil do íleo de rato à metformina obtida na ausência (●, controlo) e na presença de: (A) 1 μ M de metiotepina (□); (B) 1 μ M de ritanserina (○); (C) 1 μ M de cetanserina (◆) e 1 μ M de cetanserina em simultâneo com 1 μ M de SB 224289 (◇); (D) 1 μ M de MDL 72222 (◆); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student* (A, B, D) e pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett* (C). * $p < 0,05$ vs controlo. 60
- Figura 4.9.** Resposta contráctil do íleo de rato à 5-HT obtida (A) num grupo controlo de ratos Wistar e (B) num grupo de ratos *Goto-Kakizaki* (GK). As respostas foram obtidas na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de cetanserina (◆) ou de 1 μ M de ritanserina (○); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* (A) e pelo teste *t* de *Student* (B). * $p < 0,05$ vs controlo; # $p < 0,05$ vs cetanserina. 62
- Figura 4.10.** Respostas contrácteis do íleo de ratos *Goto-Kakizaki* a duas curvas concentração-resposta (CR) sucessivas não cumulativas de metformina (●, 1^a curva CR; ◆, 2^a curva CR); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M. 64
- Figura 4.11.** Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 μ M de reserpina (●); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs controlo. 65
- Figura 4.12.** Resposta contráctil do íleo de ratos *Goto-Kakizaki* à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de ritanserina (✱); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam 66

S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student **p* < 0,05 vs controlo.

- Figura 4.13.** Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. H/E X400. Visualização das camadas de músculo liso longitudinal (1) e circular (2) e dos plexos mientérico (3) e submucoso (4). 68
- Figura 4.14.** Íleo de rato Wistar (A, macho, 9 semanas) e GK (B, macho, 9 semanas). H/E X400. Visualização do espessamento da parede do vaso sanguíneo no caso B comparativamente ao caso A (setas). 68
- Figura 4.15.** Íleo de rato Wistar (A, macho, 9 semanas) e GK (B, macho, 9 semanas). Técnica de histoquímica – PAS X400. Visualização do espessamento de um vaso sanguíneo no caso B comparativamente ao caso A (setas a preto), com ausência de marcação de glicogénio em ambos os casos. Controlo interno positivo da coloração PAS: células caliciformes de cor púrpura (seta branca). 69
- Figura 4.16.** Íleo de rato Wistar (A, macho, 9 semanas) e GK (B, macho, 9 semanas). Técnica de imunohistoquímica – NSE X200. Visualização de marcação a castanho nas células musculares lisas da camada circular, indicativo das características neuroendócrinas das mesmas. 69
- Figura 4.17.** Cérebro de rato Wistar (A) e artéria uterina humana (B). Técnica de imunohistoquímica: imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1B} X200 (diluição 1:25) (A) e 5-HT_{2A} X200 (diluição 1:10) (B), em neurónios e células musculares lisas vasculares, respectivamente. 70
- Figura 4.18.** Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. Técnica de imunohistoquímica: ausência de imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1B} X200 e X400, respectivamente (diluição 1:10). 70
- Figura 4.19.** Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. Técnica de imunohistoquímica: ausência de imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1D} X200 e X400, respectivamente (diluição 1:10). 71
- Figura 4.20.** Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{2A} X200 e X400, respectivamente (diluição 1:10) presente nas células ganglionares situadas no plexo mientérico da parede intestinal (setas). 71

Índice de Tabelas

Capítulo 1 – Introdução

Tabela I.	Classificação e caracterização dos receptores de 5-hidroxitriptamina	36
------------------	--	----

Capítulo 4 – Resultados

Tabela II.	Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à metformina.	51
-------------------	--	----

Tabela III.	Respostas contrácteis do íleo de ratos Wistar e de ratos <i>Goto-Kakizaki</i> à 5-HT.	61
--------------------	---	----

Tabela IV.	Respostas contrácteis do íleo de rato <i>Goto-Kakizaki</i> à metformina.	63
-------------------	--	----

Tabela V.	Respostas contrácteis do íleo de ratos Wistar e <i>Goto-Kakizaki</i> à metformina.	64
------------------	--	----

Lista de abreviaturas

5-HT - 5-hidroxitriptamina

ACh - *acetilcholine*

ADP - adenosina difosfato

AGJ - anomalia da glicose em jejum

AGL - ácidos gordos livres

AINEs - anti-inflamatórios não esteróides

AMPK - *adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ANOVA - análise da variância

ATG - anomalia da tolerância à glicose

ATP - adenosina trifosfato

Ca²⁺ - íon cálcio

CHO - *chinese hamster ovary cell line*

CIC - células intersticiais de Cajal

Cl⁻ - íon cloreto

CoA - acetil-co-enzima A

COS-7 - linha celular de fibroblastos renais de macaco

CR - concentração-resposta

DAB - diaminobenzidina

DAG - diacilglicerol

DT1 - *Diabetes Mellitus* tipo 1

DT2 - *Diabetes Mellitus* tipo 2

EC - enterocromafins

EC-like - enterocromafins-like

EEC - estimulação eléctrica de campo

E_{máx} - efeito máximo

eNOS - sintase do monóxido de azoto endotelial

FDA - *Food and Drug Administration*

FR - frequência-resposta

GI - gastrointestinal

GK - *Goto-Kakisaki*

GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*,

GLUT - *glucose transporters*

HCO₃⁻ - ião bicabornato

HE - hematoxilina/eosina

hsp90 - *heat shock protein 90*

i. d. - *in dia*

IECAs - inibidores da enzima de cnversão da angiotensina

iNOS - sintase do monóxido de azoto indutível

IP₃ - inositol trifosfato

IPANs - *intrinsic primary afferent neurons*

IUPHAR - *International Union of Pharmacology*

K⁺ - ião potássio

LDL - *Low Density Lipoprotein*

L-NNA - N^G-nitro-L-arginina

MAO - monoaminoxidase

MDL 72222 - tropanil-3,5-diclorobenzoato

Mg²⁺ - ião magnésio

MLCK - *myosin light chain kinase*

n - número de experiências

Na⁺ – ião sódio

nNOS - sintase do monóxido de azoto neuronal

NO - monóxido de azoto

NOS - sintase do monóxido de azoto

NSE - *Neuronal Specific Enolase*

PAS - *Periodic Acid Schiff*

PBS - *Phosphate Buffer Saline*

pCE₅₀ - logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da resposta máxima)

PIP₂ - *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

pKi - logaritmo negativo da concentração molar de um ligando num ensaio de competição que ocuparia 50% dos receptores na ausência do ligando

PREVADIAB - Estudo da Prevalência de Diabetes em Portugal

RI - resistência à insulina

RNA - *ribonucleic acid*

S.E.M. - *Standard Error of the Mean*

SB 224289 - 1'-metil-5-[[2'-metil-4'-(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)bifenil-4-il]carbonil]-2,3,6,7-tetrahidrospiro[furo[2,3-f]indol-3,4'-piperidina

SGLT-1 - *Na⁺-dependent glucose transporter-1*

SNC - sistema nervoso central

SNE - sistema nervoso entérico

SNP - sistema nervoso periférico

TBS - tampão Tris salino

TTX - tetrodotoxina

VIP - *vasoactive intestinal polipeptide*

VMAT - *vesicular monoamine transporter*

WHO - *World Health Organization*

Resumo - *Abstract*

Resumo

A metformina é um anti-hiperglicémico oral amplamente utilizado na terapêutica farmacológica da *Diabetes Mellitus* tipo 2. Esta biguanida diminui a libertação de glicose hepática e aumenta a sua captação nos tecidos periféricos (tecido adiposo e músculo esquelético). A diarreia é um dos sintomas gastrointestinais associados ao tratamento com metformina. Além disso, a diabetes tipo 2 é também responsável pela ocorrência destes sintomas *per se*. A diarreia diabética é, então, uma das consequências da neuropatia autonómica diabética que perturba o controlo e a função dos órgãos do tracto gastrointestinal, como o intestino. Contudo, a diarreia provocada pela metformina é independente da influência da doença.

Neste sentido, para perceber os mecanismos farmacológicos associados à diarreia desencadeada pela metformina, pretendia-se caracterizar a resposta contráctil de segmentos de íleo de rato à metformina, através de estudos funcionais de contracção isométrica. Para tal, investigou-se a possível interferência do fármaco na componente neuronal, bem como nas componentes colinérgicas, nitrérgicas, histaminérgicas e serotoninérgicas. Para além disso, comparou-se o efeito contráctil da metformina no íleo isolado de ratos Wistar (controlo) com o observado no íleo isolado de ratos *Goto-Kakizaki* (GK), um modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2. As preparações biológicas de íleo foram colocadas em banhos de órgãos de 15 ml, ligadas a transdutores de força e mantidas a 37°C, em solução fisiológica de Krebs-Henseleit arejada com carbogénio e sob a tensão basal de 29,4 mN. Inicialmente, os segmentos intestinais foram submetidos a acetilcolina exógena (100 µM) para obter directamente a contracção máxima do músculo liso do íleo e, desta forma, permitir a comparação dos resultados de experiências diferentes. Posteriormente, foram realizadas duas curvas não cumulativas frequência eléctrica-resposta e concentração-resposta à metformina (6-36 µM). A primeira curva correspondeu à curva controlo onde a resposta contráctil do órgão à estimulação eléctrica de campo e/ou à metformina foi testada na ausência de qualquer composto, enquanto que na segunda curva, 15 minutos antes de cada estimulação/dose, foram adicionados os seguintes compostos: metformina (36 µM); hexametónio (300 µM), um antagonista dos receptores nicotínicos; tetrodotoxina (1 µM), uma neurotoxina bloqueadora dos canais de sódio sensíveis à voltagem; atropina (10 µM), antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos; N^G-nitro-L-arginina (250 µM), um inibidor da sintase do monóxido de azoto; mepiramina (1 µM), um antagonista/agonista inverso dos receptores histamínicos do tipo H₁; metiotepina (1 µM), um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-

HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇; SB 224289 (1 µM), um antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{1B}; ritanserina (1 µM), um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT₂; cetanserina (1 µM), um antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2C}; MDL 72222 (1 µM), um antagonista dos receptores 5-HT₃; e reserpina (100 µM), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas. Em todas as experiências foram utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionaram apenas os solventes apropriados para cada composto. Relativamente às curvas frequência eléctrica-resposta, os segmentos foram sujeitos à estimulação eléctrica de campo a frequências crescentes de 1, 2, 4, 8 e 16 Hz (100 V de intensidade, 5 ms de largura do pulso) com o objectivo de activar intrinsecamente a componente nervosa do íleo. No entanto, nos estudos realizados em animais GK apenas foram efectuadas curvas concentração-resposta à metformina na ausência e na presença de ritanserina (1 µM). Paralelamente, foram executadas curvas concentração-resposta à 5-hidroxitriptamina (0,1-60 µM) nos dois grupos de animais, controlo e diabéticos, na presença e na ausência de cetanserina (1 µM) ou ritanserina (1 µM). Para complementar o presente trabalho, foram realizados estudos histoquímicos e imunohistoquímicos com o intuito de determinar a micro-anatomia dos segmentos de íleo e a localização celular dos receptores serotoninérgicos dos subtipos 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}.

A metformina, testada em concentrações terapêuticas (6-36 µM), induziu contracções dependentes da concentração nos segmentos de íleo isolado de rato ($E_{máx}$ of 12.20 ± 0.80 mN, $n=48$; pEC_{50} of 4.89 ± 0.03 , $n=47$). A metformina (36 µM) não alterou significativamente a resposta contráctil dos segmentos à estimulação eléctrica de campo, o que sugere um mecanismo de acção não neuronal. Estes resultados foram confirmados pela ausência de alterações na curva concentração-resposta da metformina na presença de hexametónio e tetrodotoxina, excluindo o envolvimento da componente nervosa autonómica colinérgica e não colinérgica. Para além disso, as curvas concentração-resposta da metformina não foram alteradas significativamente na presença de atropina ou de N^G-nitro-L-arginina, excluindo o envolvimento de receptores muscarínicos ou a inibição da produção de monóxido de azoto. A mepiramina, um antagonista/agonista inverso dos receptores H₁, alterou significativamente a contracção induzida pela metformina.

Relativamente aos receptores serotoninérgicos, a cetanserina, o SB 224289 e o MDL 72222 não alteraram a contracção induzida pela metformina, o que sugere que os receptores 5-HT_{2A/2C}, 5-HT_{1B} e 5-HT₃ não estão a mediar a resposta contráctil. Tanto a metiotepina como a ritanserina reduziram substancialmente a contracção intestinal induzida pela metformina, o que comprova o envolvimento de receptores serotoninérgicos presentes nas células das camadas de músculo liso, nomeadamente, os receptores 5-HT_{2B}. Os efeitos da cetanserina e

da ritanserina na curva concentração-resposta à metformina também foram observados em curvas concentração-resposta à 5-hidroxitriptamina. A acção pós-sináptica da 5-HT não pareceu alterada sob influência da doença, uma vez que o efeito da ritanserina em ratos GK foi semelhante ao observado em ratos Wistar. Contudo, no modelo animal diabético, a redução da resposta contráctil à metformina pela ritanserina apenas se revelou significativa na última dose da curva concentração-resposta.

A reserpina alterou significativamente a contracção intestinal induzida pela metformina em ratos Wistar, sugerindo que o fármaco induz a libertação de 5-hidroxitriptamina a partir das células enterocromafins presentes na mucosa intestinal. Adicionalmente, os estudos imunohistoquímicos revelaram a presença de receptores 5-HT_{2A} não nas camadas musculares mas nas células ganglionares do plexo mientérico, para além de perturbações morfológicas motivadas pela diabetes tipo 2 nos ratos GK.

Em conclusão, os resultados obtidos permitem reforçar a relação entre a incidência de diarreia e a terapêutica com metformina, graças ao seu perfil farmacológico de contracção intestinal que é mediado principalmente por uma forte componente serotoninérgica.

Abstract

Metformin is an oral antihyperglycemic agent widely used in the treatment of type 2 *Diabetes Mellitus*. This biguanide decreases hepatic glucose output and increases cell glucose *uptake* in peripheral tissues (adipose tissue and skeletal muscle). Diarrhea is one of the gastrointestinal side effects commonly reported with metformin treatment. In addition, type 2 diabetes is also responsible for the occurrence of these symptoms *per se*. Diabetic diarrhea is then a consequence of diabetic autonomic neuropathy which impairs control and functioning of gastrointestinal organs such as the intestine. However, metformin-induced diarrhea is independent of the pathological status.

To understand the pharmacological mechanisms associated with the metformin-induced diarrhea, we intended to characterize the contractile response of rat isolated ileum segments to metformin, through functional studies of isometric contraction. Therefore, we investigated the possible drug effect in the neuronal, cholinergic, nitrenergic, histaminergic and serotonergic ileum components. Thus, we compared the contractile effect of metformin on control Wistar rats with that of *Goto-Kakizaki* (GK) rats, an animal model of type 2 diabetes. The ileum segments were suspended in 15 ml organ baths, attached to force transducers and maintained at 37°C in aerated Krebs-Henseleit solution at a basal tension of 29.4 mN. Initially, preparations were submitted to exogenous 100 µM acetylcholine to directly obtain the ileum smooth muscle maximal contraction in order to compare the results from different experiments. Two non-cumulative electrical frequency-response and concentration-response curves to metformin (6-36 µM) were performed. The first curve corresponds to the control curve, where the contractile response to electrical field stimulation and/or metformin was tested in the absence of any compound, while in the second curve, the following compounds were added 15 min before each dose of metformin or electrical stimulation frequency: metformin (36 µM); hexamethonium (300 µM), a nicotinic receptor antagonist, tetrodotoxin (1 µM), a selective blocker of Na⁺ voltage-sensitive channels which inhibits impulses propagation in neuron excitable membranes; atropine (10 µM), a non-selective muscarinic receptor antagonist; N^G-nitro-L-arginine (250 µM), a nitric oxide synthase inhibitor; mepyramine (1 µM), a histamine H₁ receptor inverse agonist/antagonist; methiothepin (1 µM), a non-selective antagonist of the 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors; SB 224289 (1 µM), a selective 5-HT_{1B} receptor antagonist; ritanserin (1 µM), a non-selective 5-HT₂ receptor antagonist; ketanserin (1 µM), a selective 5-HT_{2A/2C} receptor

antagonist; MDL 72222 (1 μM), a 5-HT₃ receptor antagonist and reserpine (100 μM), a vesicular monoamine transporter inhibitor. In each assay, control segments were used with the appropriate solvent of each drug. Frequency-response curves were obtained through electrical field stimulation (1, 2, 4, 8 and 16 Hz, 100 V, 5 msec pulse width) in order to activate intrinsic ileum nerves. However, only concentration-response curves to metformin in the presence and in the absence of ritanserin (1 μM) were performed in GK rat functional studies. Concentration-response curves to 5-hydroxytryptamine (0.1-60 μM) in the presence and in the absence of ketanserin (1 μM) or ritanserin (1 μM) were also performed in both groups of diabetic and control animals. Histochemical and immunohistochemical studies were carried out in order to determine the micro-anatomy and the cellular localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and 5-HT_{2A} receptors.

Metformin, used in therapeutic concentrations (6-36 μM), caused concentration-dependent contractions of rat isolated ileum segments (E_{max} of 12.20 ± 0.80 mN, $n=48$; pEC_{50} of 4.89 ± 0.03 , $n=47$). Metformin (36 μM) did not significantly change the rat ileum frequency-dependent contractile response to electrical field stimulation suggesting a non-neuronal mechanism of action. This was confirmed by the unchanged concentration-response curve to metformin in the presence of hexamethonium and tetrodotoxin, excluding the involvement of autonomic cholinergic and non-cholinergic nerves. Moreover, the metformin concentration-response curves were not significantly altered by atropine nor by N^G-nitro-L-arginine, excluding the involvement of muscarinic receptors or the inhibition of nitric oxide production alone. Mepyramine, a H₁ histaminic receptor antagonist/inverse agonist, did significantly change the metformin-induced contraction.

Concerning the serotonergic receptors, ketanserin, SB 224289 and MDL 72222 did not change the metformin-induced contraction, which means that 5-HT_{2A/2C}, 5-HT_{1B} and 5-HT₃ receptors do not mediate the contractile response. Methiothepin and ritanserin almost abolished the metformin-induced intestinal contraction, which proves the involvement of serotonergic receptors present on the smooth muscle cells layers, namely 5-HT_{2B} receptors. The effects of ketanserin and ritanserin on the metformin concentration-response curve were also observed on the 5-hydroxytryptamine concentration-response curve. The 5-HT post-synaptic action did not seem impaired under the influence of the disease, since the effect of ritanserin in GK rats was similar to that of Wistar rats. However, in the diabetic animal model, the ritanserin reduction of the metformin-induced intestinal contraction only became significant at the last metformin dose of the concentration-response curve.

Reserpine significantly changed the metformin-induced contraction in Wistar rats, indicating that metformin triggers 5-hydroxytryptamine release from enterochromaffin cells of the rat intestinal mucosa. Furthermore the immunohistochemical studies did not reveal the presence of 5-HT_{2A} receptors in the smooth muscle layers but in the myenteric plexus ganglionic cells, in addition to morphological disturbances driven by type 2 diabetes in GK rats.

In conclusion, our experiments allowed us to reinforce the gastrointestinal side effects associated with metformin treatment since it induces intestinal contraction mainly by serotonergic ways.

Capítulo 1
Introdução

1.1. *Diabetes Mellitus* tipo 2

1.1.1. Caracterização geral

A *Diabetes Mellitus* é uma doença crónica, que atinge ambos os sexos e raças, sendo mais frequente em idades mais avançadas. A diabetes é um distúrbio metabólico caracterizado pela diminuição/supressão da secreção pancreática da insulina e/ou resistência à acção da mesma. Dado que a insulina é uma hormona que regula os níveis de glicose, estas alterações provocam não só um aumento de glicose no sangue (hiperglicemia), mas também perturbações no metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas. Esta disfunção tem consequências agudas e crónicas ao longo da evolução da diabetes, incluindo a perda de funcionalidade de órgãos e problemas vasculares.

De acordo com a classificação de 1999 da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO, 1999), existem vários tipos de diabetes, sendo os mais frequentes a *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DT1) e a *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DT2). Os indivíduos com DT1 são incapazes de produzir insulina, tendo a hormona que ser reposta via exógena no organismo, consoante os níveis de glicose sanguíneos. Na maioria dos casos, a supressão da síntese de insulina é motivada por uma reacção auto-imune de ataque às células β pancreáticas, resultando na sua destruição. Consequentemente, é fulcral uma terapia com insulina para a sobrevivência do indivíduo.

A DT2 representa 90-95% dos casos diabéticos (Goldstein, 2007). Segundo dados disponibilizados pela WHO (2003), estimam-se que cerca de 350 milhões de pessoas terão DT2 em 2030. Em Portugal, a prevalência da diabetes tem vindo a aumentar. O Estudo da Prevalência de Diabetes em Portugal – PREVADIAB (2009) – foi desenvolvido pela Sociedade Portuguesa de Diabetologia, através do seu Observatório Nacional de Diabetes e em conjunto com diversas entidades. Este estudo permitiu concluir que a prevalência actual da DT2 em Portugal é de 11,7%, e que 5,1% dos diabéticos não se encontram diagnosticados (395.134 dos portugueses entre os 20 e os 79 anos), ocorrendo também um aumento da prevalência em idades pediátricas. A predisposição ao desenvolvimento da doença resulta de uma combinação de factores genético-sociais (Zimmet *et al.*, 2001). O aumento da idade da população, uma dieta inadequada altamente calórica e uma menor actividade física, devido a um estilo de vida mais sedentário, acarretam complicações como a obesidade e doenças cardiovasculares que estão associadas à resistência à acção da insulina em tecidos periféricos e posteriormente ao desenvolvimento da DT2 (Wyatt *et al.*, 2006; Cefalu, 2008). No entanto, vários estudos demonstram a modificação do estilo de vida, nomeadamente a perda de peso e

o exercício físico, como um mecanismo preventivo da DT2, uma vez que melhora tanto a sensibilidade à insulina, como a função das células β pancreáticas (Earnest, 2008; Kunihiro *et al.*, 2009; Ramachandran *et al.*, 2006)

Nos indivíduos com DT2, a acção e secreção deficientes da insulina devem-se essencialmente à resistência à insulina (RI), isto é, à diminuição da sensibilidade à insulina dos tecidos alvo. Num estado insulino-resistente, os níveis de glicose e insulina plasmáticos são elevados uma vez que a acção da insulina produzida não é eficaz ao ponto de normalizar os níveis de glicose no sangue (hiperglicemia). A RI deve-se, em grande parte, a anomalias nas vias de transdução de sinal da hormona nos tecidos alvo – músculo, fígado e tecido adiposo. A diminuição da secreção de insulina resulta de um processo de glicotoxicidade prolongada em que as células β , face à glicémia elevada e constante, deixam de responder à hiperglicemia após uma refeição (estado pós-prandial). Por isso, a secreção da hormona pelas células β pancreáticas continua numa tentativa de reposição dos níveis basais de glicose, atingindo-se um estado de hiperinsulinemia. Ao fim de um certo tempo, as células β atingem a exaustão e perdem a sua funcionalidade. Consequentemente, numa fase mais avançada da doença, o pâncreas deixa de ser capaz de sintetizar insulina, sendo que o doente diabético depende de insulina exógena para regular os níveis de glicose. A DT2 é pois uma doença progressiva caracterizada pelo declínio gradual da funcionalidade das células β até à sua exaustão, culminando com a necessidade terapêutica de insulina (Lin e Sun, 2010; Prasanth *et al.*, 2009).

Actualmente o diagnóstico da patologia é feito segundo a WHO (1999), através do teste de tolerância à glicose oral que quantifica a concentração de glicose plasmática em jejum e/ou 2 horas após ingestão de 75 g de glicose. Uma vez determinados os níveis de glicose, há que compará-los relativamente a valores estipulados segundo os quais é possível diagnosticar a doença. Note-se que para além do estado dito normal e diabético, são referidos valores que reflectem perturbações na homeostasia da glicose, isto é, os termos anomalia da tolerância à glicose (ATG) e anomalia da glicose em jejum (AGJ). Estes dizem respeito a um estado metabólico intermédio entre o início e o estabelecimento propriamente dito da DT2 e implicam, respectivamente, anomalias na regulação da glicose após uma refeição (estado pós-prandial) e em jejum. É de realçar que a ATG e a AGJ estão associadas ao risco não só do desenvolvimento da *Diabetes Mellitus*, mas também de doenças cardiovasculares. Por estes motivos, é importante uma atenção especial aos doentes cujos resultados se encontrem dentro destes limites.

1.1.2. Mecanismos moleculares associados à *Diabetes Mellitus* tipo 2

A insulina é uma hormona sintetizada pelo pâncreas, mais concretamente pelas células β dos ilhéus de Langerhans, na forma de pré-pró-insulina que migra para o complexo de Golgi onde é clivada a insulina e péptido C. A principal função da insulina é o controlo do metabolismo da glicose, regulando a sua entrada nos tecidos alvo (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo) após a mobilização de transportadores de glicose (GLUT – *glucose transporters*) para a membrana celular. Para além disso, a insulina inibe a glicogenólise, promovendo o armazenamento de glicogénio no fígado e no músculo. A nível lipídico, a insulina promove a síntese hepática de ácidos gordos e a síntese de triglicéridos nos adipócitos. A insulina é então libertada na corrente sanguínea, ligando-se a receptores proteicos específicos localizados em membranas celulares dos tecidos alvo. Na sua constituição, o receptor de insulina é do tipo tirosina-cinase e tem duas subunidades α e duas subunidades β ligadas por pontes dissulfito. Ao ligar-se ao receptor, o domínio com actividade tirosina-cinase é activado ocorrendo a fosforilação do substrato do receptor de insulina que, por sua vez, irá desencadear cascatas de sinalização com diferentes respostas celulares. A resposta de maior relevância na acção da insulina é a mobilização de transportadores de glicose para a membrana celular. Estes encontram-se em vesículas citoplasmáticas que se fundem com a membrana, expondo o transportador e facilitando o transporte passivo de glicose para a célula. Nos hepatócitos, o transporte de glicose é feito através do GLUT-2, enquanto os GLUT-4 e GLUT-1 desempenham essa função no músculo esquelético e no tecido adiposo. Uma vez no meio intracelular, a glicose tem vários destinos, consoante a especialização e as necessidades celulares, podendo ser armazenada sob a forma de glicogénio (glicogénese), sendo oxidada a piruvato (glicólise) com posterior entrada no ciclo do ácido cítrico, ou dando origem a pentoses fosfatadas (via das pentoses fosfato) (Nelson e Cox, 2008).

Os níveis de glicose plasmática são controlados pela insulina pelo que, quando estes são elevados, por exemplo, após uma refeição, a secreção da hormona é estimulada. Sendo assim, num indivíduo saudável, a concentração de glicose decrescerá uma vez que o seu *uptake* celular é promovido pela acção insulinémica, o que proporciona homeostasia glicémica. No caso da DT2, a RI altera o processo metabólico da glicose. Sabe-se que esta é uma anomalia que se desenvolve durante um longo período de tempo que antecipa o diagnóstico da doença propriamente dita. A RI é um estado patológico no qual os tecidos de actuação da mesma (tecido adiposo, músculo e fígado) não respondem normalmente aos níveis de insulina circulante, estando também associada a uma ampla variedade de estados

patológicos, nomeadamente, obesidade, hipertensão, infecção crónica e doenças cardiovasculares. A nível molecular, a RI é consequência de anomalias nas vias de transdução de sinal da hormona e por isso a sua acção não é eficaz pois, apesar de se ligar ao receptor, a resposta biológica não é a que seria esperada. Como tal, o decréscimo da acção da insulina é acompanhado pelo aumento dos níveis de glicose, ou seja, pela hiperglicemia. Neste ponto, poder-se-á dizer que se desenrola um ciclo vicioso, uma vez que ao detectar concentrações glicémicas anormais, o organismo tenta normalizar esses valores estimulando a capacidade secretora das células β , instalando-se uma hiperinsulinemia como mecanismo compensatório. Como a acção da insulina não é capaz de garantir o equilíbrio glicémico, a secreção da mesma é contínua e, com a evolução temporal, o exagero poderá conduzir à dessensibilização dos receptores insulínicos e à exaustão das células β (Lin e Sun, 2010; Prasanth *et al.*, 2009)

Como foi referido anteriormente, a RI também afecta o tecido adiposo uma vez que este é resistente ao efeito anti-lipolítico da insulina, o que tem como consequência a libertação de níveis excessivos de ácidos gordos livres (AGL) para a corrente sanguínea. Para além de AGL, os adipócitos libertam também hormonas como a leptina e a adiponectina e citoquinas como o factor de necrose tumoral alfa e a resistina (adipocitoquinas) que agravam o estado insulino-resistente do indivíduo (Mlinar *et al.*, 2007; Kershaw *et al.*, 2004). Os níveis elevados de AGL estimulam a gliconeogénese hepática, induzem a RI (pois inibem o sistema de transdução de sinal da insulina) e diminuem a *clearance* de glicose periférica, graças à sua interferência no metabolismo da glicose e na acção da insulina. Assim se percebe de que modo se pode descrever a RI como um estado patológico, no qual o tecido adiposo tem um papel essencial no desenvolvimento de inflamação graças às biomoléculas por ele libertadas. Ao entrarem na circulação sanguínea, estas substâncias podem contribuir para a inflamação hepática e para a RI em tecidos periféricos como o músculo esquelético (Prasanth *et al.*, 2009). No fígado, os AGL actuam como substrato para a síntese de triglicéridos e LDL (*Low Density Lipoprotein*) o que contribui para a dislipidemia que, por sua vez, está na base de complicações como a aterosclerose, a obesidade e doenças cardiovasculares (Grundy *et al.*, 2004).

A toxicidade desencadeada pelos níveis elevados de glicose e de AGL afecta negativamente a função das células β pancreáticas através de vários mecanismos como: alterações nas vias metabólicas, aumento do cálcio intracelular, efeitos na bomba de K^+ -ATP e geração de espécies reactivas de oxigénio (Porte *et al.*, 2001; Tushuizen *et al.*, 2007). Para além disso, os AGL circulantes e os defeitos no metabolismo lipídico, motivados pela doença, culminam na deposição lipídica pancreática (McGarry *et al.*, 1999). Com a progressão da

doença, o contínuo estímulo para a produção de insulina culmina na exaustão das células β , isto é, na perda de massa celular por apoptose, sendo que o decréscimo de células β leva à perda de funcionalidade das restantes. Deste modo, o pâncreas não é capaz de produzir insulina suficiente, sendo necessária uma terapia de insulina diária.

1.1.3. Terapêutica farmacológica associada à *Diabetes Mellitus* tipo 2

O *design* da estratégia terapêutica deve ter em conta a melhoria do controlo glicémico e das complicações diabéticas já referidas. Um bom controlo glicémico oferece ao doente maior protecção contra a maioria dos danos que a doença pode provocar no organismo, sendo que este deve ser monitorizado para evitar episódios de hipoglicemia (Reimann *et al.*, 2009). A selecção dos medicamentos deve ser feita tendo em conta o perfil clínico do indivíduo, não devendo ser posto de parte os cuidados alimentares e o exercício físico recomendados a doentes diabéticos. É importante referir que este controlo glicémico tem de ser adequado ao estilo de vida e circunstâncias diárias de forma a evitar crises de hipoglicemia, sobretudo com antidiabéticos orais insulinosecretores (Gillies *et al.*, 2007). Por outro lado, os fármacos de terapia antidiabética têm também de ser capazes de preservar o funcionamento das células β pancreáticas pois, a longo prazo, o insucesso terapêutico, que se traduz no não controlo glicémico, pode ter como consequência a perda significativa da função destas células do pâncreas (Valdez, 2008). Além disso, alguns dos fármacos utilizados na prática clínica têm a capacidade de influenciar o peso corporal, diminuindo-o e de alterar os níveis de lípidos presentes no plasma sanguíneo, sendo por isso uma mais valia para indivíduos com risco de doenças cardiovasculares (Asche e Nelson, 2008). As biguanidas (metformina), as sulfonilureias, as tiazolidinedionas e os inibidores de α -glucosidase são exemplos de algumas classes de fármacos antidiabéticos (DeFronzo, 1999). Actualmente os tradicionalmente denominados antidiabéticos orais mais utilizados subdividem-se em sensibilizadores da insulina e insulinosecretores. Do primeiro grupo temos a classe das biguanidas (metformina) e as glitazonas (pioglitazona). Do segundo grupo temos as sulfonilureias de segunda geração (glibenclamida, glipizida, gliclazida), as meglitinidas (nateglinida) e as incretinas (GLP-1 – *glucagon-like peptide-1* e *glucose-dependent insulintropic peptide*), nomeadamente os inibidores da dipeptidil-peptidase-4 (sitagliptina), enzima metabolizadora das incretinas e os agonistas do GLP-1 (exenatida) (Katzung, 2006). Estes fármacos podem ser utilizados em monoterapia, em terapia de combinação entre eles ou com a insulina. Embora seja uma terapêutica não farmacológica, o exercício físico apresenta benefícios no perfil do doente

diabético, uma vez que previne e melhora muitos dos mecanismos descompensados na DT2 graças às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Teixeira-Lemos *et al.*, 2011).

1.2. Metformina

1.2.1. Caracterização geral

A metformina é um fármaco antidiabético oral da classe das biguanidas, com efeito anti-hiperglicémico. Na década de 1970, a fenformina, precursor da metformina, foi retirada do mercado devido à sua associação com a acidose láctica (Misbin, 1977). A metformina foi aprovada em 1995 pela FDA (*Food and Drug Administration*), tornando-se o segundo fármaco hipoglicemiante oral mais prescrito na Europa, onde é usado isoladamente em cerca de 40% dos doentes a quem é prescrito e em combinação com uma sulfonilureia em cerca de 60%. No mercado, os nomes comerciais actualmente disponíveis são: Risidon® 850 mg e 1000 mg, Stagid® 700 mg e o Glucophage® 500 mg, para além dos inúmeros genéricos de diferentes dosagens e de formas farmacêuticas em que se associa com sulfonilureias e glitazonas. (Bailey e Turner, 1996; Prontuário Terapêutico, 2009 a e b).

As biguanidas têm a capacidade de reduzir o *output* de glicose hepática, aumentar o *uptake* de glicose nas células do músculo esquelético e diminuir a absorção de glicose no intestino (Johnson *et al.*, 1993; Hundal *et al.*, 2000). A metformina altera o perfil lipídico do doente diabético, tendo um efeito favorável no seu metabolismo, já que reduz os níveis de colesterol total, colesterol LDL e triglicéridos. De facto, verifica-se inclusive uma redução/manutenção de peso em doentes sujeitos ao tratamento com metformina (Golay, 2008; Despres, 2003). A eficácia da metformina é evidenciada pela redução do risco de qualquer complicação associada à DT2, nomeadamente da ocorrência de enfarte do miocárdio, diminuição da mortalidade associada à doença ou da mortalidade global (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*, 1998). Assim, a metformina está indicada em diabéticos obesos como fármaco de primeira linha. Este fármaco utiliza ainda os níveis de insulina endógena para o controlo dos níveis plasmáticos de glicose, isto é, não estimula a secreção da hormona, evitando assim episódios de hipoglicémia (Wright *et al.*, 2006).

A metformina pode ser prescrita em monoterapia (DeFronzo, 1999) ou em combinação com outros antidiabéticos orais ou insulina. A dose inicial é de 500 mg ou 850 mg, 2 a 3 vezes por dia, durante ou após as refeições, devendo ser aumentada gradualmente até um máximo de 3 g *i.d.* (Brunton *et al.*, 2007). Após 10 a 15 dias, a dose deverá ser

ajustada com base nos valores da glicémia, sendo que o aumento gradual da dose pode melhorar a tolerabilidade gastrointestinal (GI) (Prontuário Terapêutico, 2009 a e b). Garber e seus colaboradores (1997) avaliaram a eficácia e segurança de várias dosagens de metformina (500 mg, 1000 mg, 1500 mg, 2000 mg e 2500 mg), tendo concluído que a actividade anti-hiperglicémica deste fármaco é dependente da dose diária, sendo que são necessárias doses mais elevadas num estado mais avançado da doença, de modo a se alcançar a eficácia máxima da metformina. Porém, quando comparados com um grupo placebo, os doentes demonstraram boa tolerância ao medicamento, sem diferenças significativas na incidência de efeitos adversos, excepto para distúrbios digestivos e em doses superiores a 500 mg (Garber *et al.*, 1997). A absorção da metformina é levada a cabo de forma gradual no tracto GI, acumulando-se no intestino delgado onde o processo de absorção decorre lentamente, através de um mecanismo activo, saturável e dependente da dose (Bailey *et al.*, 2008; Proctor *et al.*, 2008). No lúmen intestinal, a metformina encontra-se no estado protonado, isto é, com carga positiva. Deste modo, o transporte do fármaco é levado a cabo por intermédio de transportadores membranares. Apesar do seu mecanismo de transporte não estar ainda esclarecido, são vários os estudos que demonstram que esta utiliza os transportadores orgânicos catiónicos no fígado, nos rins e no intestino (Kimura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007). Após absorção, a concentração plasmática máxima é atingida num período de tempo de aproximadamente 2,5 horas, a biodisponibilidade absoluta de um comprimido de 500 mg ou 850 mg varia entre 50-60%, sendo que a fracção não absorvida é recuperada inalterada (não metabolizada) nas fezes em cerca de 20-30% e aproximadamente 90% da metformina absorvida é excretada na urina e eliminada pelos rins via secreção tubular, sem ser metabolizada (Tucker *et al.*, 1981; Scheen, 1996; Vidon *et al.*, 1988). Assim, a função renal deve ser rigorosamente avaliada antes e durante o tratamento com metformina. As complicações renais poderão levar à retenção da biguanida nos tecidos, aumentando o risco de desenvolvimento de acidose láctica que pode ser fatal. O álcool, meios de contraste iodados e outros fármacos como glucocorticóides, agonistas beta-2 adrenérgicos, diuréticos e inibidores da enzima de conversão da angiotensina não devem ser associados ao tratamento, uma vez que interferem com a actividade farmacológica, agravando os efeitos adversos a que a metformina está associada (Houwerzijl *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2008; Tewari *et al.*, 2007; Thomsen e Morcos, 1999; Gudmundsdottir *et al.*, 2006).

1.2.2. Mecanismo de acção da metformina

As acções metabólicas da metformina a nível do fígado, do intestino, do tecido muscular esquelético e do tecido adiposo traduzem-se no efeito anti-hiperglicémico associado a este fármaco. No músculo esquelético, a metformina aumenta o *uptake* celular de glicose e promove a formação de glicogénio. No fígado, a inibição de processos metabólicos como a gliconeogénese e a glicogenólise possibilitam a redução do *output* de glicose hepática. No tecido adiposo, para além de promover o transporte de glicose para os adipócitos, a metformina estimula a oxidação de ácidos gordos o que permite a melhoria do perfil lipídico global do doente diabético (figura 1.1.). Deste modo, a metformina amplifica e reforça a acção da insulina nos tecidos periféricos. Contudo, a informação disponível na literatura consultada não esclarece totalmente os processos bioquímicas associados ao mecanismo de acção da metformina. Deste modo, serão descritos alguns desses processos que nos pareceram mais relevantes para compreender a acção do fármaco em estudo.

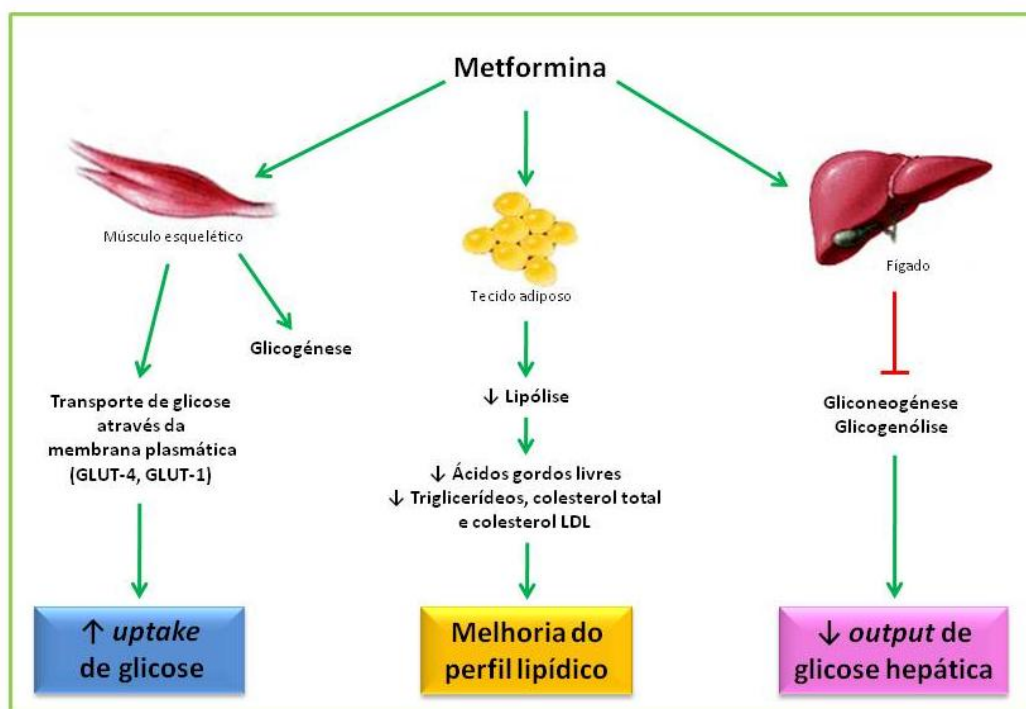


Figura 1.1. Mecanismo de acção da metformina.

1.2.2.1. Mecanismo de acção da metformina a nível hepático

A metformina diminui o *output* de glicose hepática, reduzindo a taxa de gliconeogénese e inibindo a glicogenólise. A gliconeogénese é inibida através da diminuição da disponibilidade dos vários precursores e enzimas que participam neste processo metabólico. Radziuk e seus colaboradores (1997), num estudo efectuado com fígado de rato perfundido, concluíram que a taxa de gliconeogénese hepática é reduzida pela metformina através da inibição do *uptake* hepático de lactato, um precursor desta via metabólica. Outros investigadores relacionaram a inibição da gliconeogénese com a inibição da actividade das enzimas piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxilase (que participam nas vias da gliconeogénese), através da conversão do piruvato a alanina (Large *et al.*, 1999). Alguns estudos revelaram ainda que, a nível hepático, a metformina interfere com a cadeia respiratória da mitocôndria, nomeadamente através da inibição do transporte de electrões pelo complexo 1, por oxidação de substratos respiratórios como o glutamato. O modo como o fármaco actua na respiração celular não é claro, mas é sugerido o aumento da permeabilidade mitocondrial ao cálcio, que, por sua vez, interfere na regulação da abertura do poro transitório de permeabilidade provocando um desequilíbrio no estado redox da mitocôndria. Estas perturbações induzem alterações na conformação proteica dos complexos respiratórios, afectando todo o processo da respiração celular (Carvalho *et al.*, 2008; Davidoff *et al.*, 1978; Owen *et al.*, 2000). Deste modo, a perturbação nas vias metabólicas referidas pode inibir a gliconeogénese e induzir a utilização de glicose nos tecidos periféricos. Por outro lado, a metformina melhora o perfil lipídico diabético, diminuindo os níveis de AGL circulantes, contrariando assim o efeito estimulante que estes exercem na produção hepática de glicose (Despres, 2003; Bailey e Turner, 1996). A inibição da degradação do glicogénio em monómeros de glicose também está associada ao mecanismo hepático da metformina. A hormona que regula a glicogenólise é o *glucagon*, pelo que a metformina tem um efeito inibitório na acção da mesma. Contudo, o fármaco não actua directamente nos níveis plasmáticos de *glucagon* e não interfere com a ligação do mesmo a receptores presentes nas membranas celulares dos hepatócitos (Alengrin *et al.*, 1987). No entanto, estes estudos não demonstram o alvo efectivo da metformina, sendo que o efeito anti-gliconeogénico que esta exerce resulta de perturbações indirectas na coordenação das vias metabólicas. Em suma, apesar da literatura disponível não esclarecer de forma consistente os mecanismos bioquímicos subjacentes à acção da metformina a nível hepático, esta favorece e reforça a acção da insulina em detrimento da acção do *glucagon*, promovendo assim a redução da produção de glicose hepática.

1.2.2.2. Mecanismo de acção da metformina no músculo esquelético

No músculo esquelético, a metformina induz aumento da captação de glicose e a sua acumulação sob a forma de glicogénio. O *uptake* celular de glicose é um processo organizado em duas fases: inicialmente ocorre o recrutamento das vesículas de transportadores de glicose para a membrana e posteriormente a estimulação da sua actividade intrínseca (Baly e Horuk, 1987; Czech *et al.*, 1992). O fármaco estimula a actividade tirosina-cinase dos próprios receptores de insulina, permitindo a translocação das vesículas de transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-4 para a membrana plasmática, isto é, promove o transporte de glicose para o interior da célula do músculo esquelético (Kozka e Holman, 1993; Fischer *et al.*, 1995). Sarabia e colaboradores (1992) observaram o aumento do *uptake* de glicose aquando da adição de metformina a culturas de miotubos humanos (células do processo de diferenciação do músculo esquelético) que expressavam GLUT-1 e GLUT-4. No entanto, pensa-se que o alvo da metformina será o transporte e não propriamente a fosforilação dos receptores de insulina (Rapin *et al.*, 1991; Yoa *et al.*, 1993). Yoa e seus colaboradores (1993) testaram a influência da metformina no transporte de glicose em eritrócitos – células que contêm transportadores GLUT-1 e são incapazes de sintetizar proteínas, uma vez que não possuem núcleo – evidenciando assim a interferência da metformina apenas em relação ao aumento da capacidade de transporte em meio hiperglicémico. A acção da metformina não está directamente relacionada com o aumento da expressão dos transportadores, já que não se observam alterações nos níveis de RNA (*ribonucleic acid*), mensageiro por influência do fármaco (Rouru *et al.*, 1995, Handberg *et al.*, 1993). Porém, o aumento do processo de translocação dos transportadores para a membrana plasmática, também pode explicar o aumento do *uptake* de glicose associado à metformina. Contudo, a literatura não é consistente. Estudos *in vitro* demonstram o aumento da translocação de transportadores GLUT-1 e/ou GLUT-4 (Matthaei *et al.*, 1991; Sarabia *et al.*, 1992; Hundal *et al.*, 1992), enquanto que outros investigadores não observam qualquer alteração na quantidade dos mesmos expressos à superfície membranar, após tratamento de animais/células com o fármaco em estudo (Rouru *et al.*, 1995; Handberg *et al.*, 1993). Propõe-se ainda uma outra explicação para o efeito sensibilizador à insulina por parte da metformina: a interferência com a actividade dos transportadores GLUT-1 e GLUT-4, aumentando assim a sua capacidade de transporte. Detaille e seus colaboradores (1998 e 1999) concluíram que, sob determinadas condições, o fármaco modula a actividade intrínseca de transportadores de glicose, um efeito que pode ocorrer a baixas concentrações de insulina. Por outro lado, as biguanidas comportam-se como compostos catiónicos a pH fisiológico, pelo que não atravessam as membranas de forma

passiva, acumulando-se preferencialmente à superfície celular. Em concentrações terapêuticas, a metformina actua ao nível da membrana plasmática, modificando o seu estado físico e afectando a função dos receptores de insulina e dos transportadores de glicose. A metformina tem assim a capacidade de alterar a conformação de proteínas membranares, favorecendo as suas funções, nomeadamente: a autofosforilação e a actividade tirosina cinase dos receptores de insulina e a actividade intrínseca dos transportadores de glicose (Wiernsperger, 1999). Para além do transporte, foram realizados vários estudos (*in vivo* e *in vitro*) que relacionam o envolvimento da metformina na acumulação de glicose no músculo sob a forma de glicogénio, isto é, na glicogénese (Komori *et al.*, 1998; Reddi e Jyothirmayi, 1992). Alguns autores defendem que este processo pode ser regulado pela activação da sintase do glicogénio, tendo verificado o aumento da forma activa da enzima (Detaillé, 1998; Reddi e Jyothirmayi, 1992; Damsbo *et al.*, 1990). No entanto, em alguns desses estudos, esse aumento não é significativo. Além disso, a controvérsia persiste uma vez que a activação da AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) no músculo inibe a sintase do glicogénio, como será descrito posteriormente (Carling e Hardie, 1989). O aumento da quantidade de glicogénio no músculo esquelético pode estar associado ao que acontece fisiologicamente neste tecido, ou seja, a glicose captada é acumulada sob a forma de glicogénio, e não directamente ao efeito da metformina. O mecanismo anti-hiperglicémico da metformina deve-se não só ao estímulo da captação celular de glicose em tecidos periféricos, mas também à diminuição da absorção intestinal de glicose.

1.2.2.3. A metformina e a actividade da AMPK

A AMPK pertence a um grupo de enzimas sensíveis ao ambiente energético intracelular, isto é, ao rácio ATP/ADP. As situações de *stress* metabólico, induzem a activação desta enzima, que irá actuar no sentido de repor os níveis de ATP celulares, inibindo os processos anabólicos e acelerando o catabolismo. A AMPK é reconhecida como uma das enzimas com maior impacto na regulação de vias metabólicas, uma vez que inibe a síntese de glicogénio, a gliconeogénese e a síntese de lípidos, activando outros processos como o *uptake* de glicose, a glicólise e a oxidação de ácidos gordos (Hardie *et al.*, 2006; Misra e Chakrabarti, 2007). A actividade da AMPK também está associada à inibição da síntese proteica e da expressão genética em alguns dos tecidos em que está presente (Horman *et al.*, 2002; Lochhead *et al.*, 2000).

A interferência da metformina em diferentes vias metabólicas perturba o ambiente energético das células dos vários tecidos em que actua, o que tem por consequência a

activação da AMPK. Actualmente, são vários os estudos que o comprovam, não só em hepatócitos como no músculo esquelético (Winder, 2001; Zang *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001). No músculo, a metformina aumenta a actividade da AMPK, estimulando o *uptake* celular de glicose através da translocação de transportadores GLUT-4 para a membrana plasmática e podendo, a longo prazo, aumentar a sua expressão (Musi *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 1999; Jessen *et al.*, 2003). Contudo, não são conhecidas as vias de sinalização que se sucedem entre a activação da AMPK e a inserção dos transportadores de glicose na membrana, pelo que a literatura sugere que esta activa cascatas de sinalização semelhantes às dos receptores de insulina (Sarabia *et al.*, 1992; Jessen *et al.*, 2003). No fígado, a AMPK participa, essencialmente, na regulação da síntese de lípidos, fosforilando e inibindo a acetil-CoA carboxilase que catalisa a transferência de um grupo carboxílico para a acetil-CoA dando origem à malonil-CoA. Assim, a AMPK diminui a concentração de malonil-CoA – um substrato precursor da síntese de ácidos gordos e um forte inibidor da β -oxidação mitocondrial. Consequentemente, a metformina diminui a lipogénese hepática, aumentando a oxidação de ácidos gordos (Viollet *et al.*, 2006; Henin *et al.*, 1995).

1.2.2.4. Impacto da metformina no perfil lipídico diabético

Conforme já foi referido previamente, a metformina tem um papel benéfico na dislipidemia associada à DT2. Neste contexto, são vários os estudos que evidenciam a redução dos níveis de AGL, colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos associados à toma de metformina, essencialmente por diminuição da lipogénese hepática (Golay, 2008; Despres, 2003; Nagi *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1990; DeFronzo e Goodman, 1995; Rains, 1989). No entanto, pensa-se que o efeito anti-dislipidémico da metformina se traduz também na inibição da lipólise no tecido adiposo e redução da libertação de AGL a partir dos adipócitos (Del Prato *et al.*, 1995; Abbasi *et al.*, 1998 e 1997). Contudo, a redução de AGL pode não ser um resultado directo da acção da metformina, mas sim uma consequência da melhoria do controlo glicémico associado ao fármaco (Shulman *et al.*, 1980; Abbasi *et al.*, 1998). O fígado e o músculo esquelético são tecidos sensíveis aos níveis de AGL e, como tal, a redução dos mesmos contribui para a inibição da gliconeogénese e para a melhoria do *uptake* de glicose muscular (Clare *et al.*, 1991; Sindelar *et al.*, 1997; Cleasby *et al.*, 2004). Por outro lado, apesar de não ter um efeito directo na função das células β pancreáticas, a metformina pode melhorar a secreção de insulina, uma vez que limita a exposição prolongada das mesmas a AGL e à hiperglicemia. (Patanè *et al.*, 2000, Boden *et al.*, 2002). O impacto do fármaco no

metabolismo lipídico está directamente relacionado com a manutenção/redução de peso e à redução do risco cardiovascular (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*, 1998; Golay, 2008). Em conclusão, no tecido adiposo, a metformina inibe a lipólise, enquanto que no fígado suprime a lipogénese e estimula a β -oxidação, afectando favoravelmente o perfil lipídico.

1.2.2.5. Cardioprotecção associada à metformina

Pelo efeito benéfico da metformina no controlo glicémico, na resistência dos tecidos periféricos à insulina e no metabolismo lipídico, este fármaco diminui a predisposição do doente diabético para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares como a aterosclerose, hipertensão e a disfunção endotelial, reduzindo inclusive em 36% a ocorrência de enfarte do miocárdio (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*, 1998). Neste sentido, estudos efectuados em animais hipertensos revelaram que a acção da metformina se traduz no abrandamento do ritmo cardíaco, através de um efeito parassimpático inibitório (Muntzel *et al.*, 1999), e na redução da pressão arterial (Bhalla *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1992). Por outro lado, o tratamento de ratos diabéticos com metformina corrige as anomalias associadas à cardiomiopatia diabética uma vez que promove a remoção de cálcio intracelular dos cardiomiócitos, permitindo o seu relaxamento (Ren *et al.*, 1999). Outros estudos demonstraram ainda que a metformina participa em mecanismos de coagulação, pois reduz os níveis do inibidor-1 do activador do plasminogénio, aumentando a actividade da enzima plasmina e portanto a degradação da rede de fibrina que agrega o coágulo (Grant *et al.*, 1991). Também se observaram melhorias ao nível da disfunção endotelial (Matsumoto *et al.*, 2008; Sena *et al.*, 2011) e da ocorrência e recuperação do enfarte do miocárdio em animais controlo e animais diabéticos (Legtenberg *et al.*, 2002; Charlon *et al.*, 1988). Deste modo, tendo em conta a influência vantajosa da metformina nas complicações anteriormente referidas, o fármaco parece revelar mecanismos de protecção a nível cardiovascular.

O efeito cardioprotector da metformina está associado ao aumento da produção de monóxido de azoto (NO) e naturalmente à sintase do NO (NOS) (Kawabata e Ishikawa, 2003; Sartoretto *et al.*, 2005; Calvert *et al.*, 2008). A nível cardiovascular, o NO produzido pelo endotélio regula processos como a pressão arterial e o tónus vascular (devido à sua acção vasorelaxante), a inibição da agregação plaquetária e da adesão de leucócitos, a prevenção da proliferação do músculo liso e a inflamação (Naseem, 2005; Moncada *et al.*, 1991). A enzima NOS catalisa a conversão da arginina em NO e apresenta três isoformas – a NOS endotelial (eNOS), expressa no endotélio vascular; a NOS neuronal (nNOS), expressa em neurónios; e a

NOS indutível (iNOS), encontrada numa grande variedade de tecidos (Alderton *et al.*, 2001). O NO é um gás altamente reactivo que penetra com facilidade as células dos tecidos circundantes, atravessando as membranas celulares de forma passiva e actuando em tecidos alvo como o músculo liso vascular (Cersosimo e DeFronzo, 2006, Moncada *et al.*, 1991).

A literatura consultada demonstra que a fosforilação reversível catalisada pela AMPK activa cascatas de sinalização cujo efeito final se reflecte na regulação da actividade da eNOS (Morrow *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 1999). Assim, uma vez que a metformina também activa a AMPK noutros tecidos, como o músculo esquelético e o fígado, presume-se que este mecanismo se repita a nível cardiovascular. Neste sentido, Calvert e seus colaboradores (2008) estudaram os efeitos cardioprotectores da terapêutica com metformina num modelo animal de isquémia do miocárdio e observaram a redução do dano isquémico tanto em animais diabéticos, como em animais controlo. Verificaram ainda que o fármaco aumentou a actividade da AMPK e a fosforilação da eNOS. Davis e seus colaboradores (2006), analisaram a exposição de culturas de células endoteliais da artéria aorta à metformina, tendo demonstrado a diminuição da sobreexpressão de moléculas de adesão e da apoptose endotelial. Para além de corroborarem os resultados do estudo anterior, estudaram também possíveis cascatas de sinalização que envolvem a activação da eNOS, tendo concluído que a AMPK activa a eNOS ao promover a fosforilação e a consequente associação da proteína hsp90 (*heat shock protein 90*) com eNOS, formando um complexo de três enzimas que facilita a fosforilação da eNOS. Relativamente à expressão da eNOS, poder-se-ia considerar a influência do fármaco nos níveis de RNA mensageiro da enzima. No entanto, a nível cardiovascular, não são detectadas alterações nos níveis de expressão das três isoformas da NOS pelo que se depreende que o fármaco estimula, preferencialmente, a sua actividade enzimática (Sartoretto *et al.*, 2005). Em conclusão, a nível cardiovascular, a metformina tem a capacidade de activar a AMPK, desencadeando vias de sinalização que culminam na activação da eNOS. Desta forma, a metformina aumenta a biodisponibilidade do NO que exerce um efeito protector a nível cardiovascular.

1.3. Efeitos adversos associados à metformina

Como qualquer fármaco, a metformina está associada a efeitos secundários e reacções adversas sendo contra-indicada em doentes com insuficiência renal, hepática, cardíaca ou respiratória, ceto-acidose ou pré-coma diabéticos ou com hipersensibilidade ao fármaco ou qualquer um dos excipientes. Os efeitos adversos mais comuns são sintomas gastrointestinais, nomeadamente paladar metálico, anorexia, náuseas, desconforto abdominal e diarreia (Garber *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1996; Raju *et al.*, 2000). Geralmente, estes são moderados, dependentes da dose e reversíveis com a diminuição da mesma ou com a suspensão do tratamento. A toma do medicamento após as refeições ou formulações de libertação prolongada diminuem a gravidade e a ocorrência destes sintomas (Nathan *et al.*, 2006; Feher *et al.*, 2007; Blonde *et al.*, 2004; Howlett *et al.*, 2004; Blonde *et al.*, 2004). A metformina também está associada a efeitos adversos metabólicos, tais como a redução da absorção da vitamina B₁₂ e a acidose láctica que merece especial atenção já que pode ser fatal.

Na maioria dos doentes que tomam metformina, verifica-se que cerca de 10-30% apresentam redução da absorção intestinal de vitamina B₁₂ (Tomkin *et al.*, 1971 e 1973). Pensa-se que este facto pode ser devido ao aumento da flora intestinal em doentes diabéticos ou à interferência da metformina com o metabolismo intestinal do cálcio, já que a absorção da vitamina B₁₂ é um processo dependente desse metal (Caspary *et al.*, 1977; Schafer, 1976). Bauman e seus colaboradores, concluíram que a redução da absorção da vitamina se deve ao efeito inibitório do fármaco no metabolismo do cálcio e que suplementos de cálcio podem ajudar a reverter este efeito (Bauman *et al.*, 2000).

A acidose láctica é um processo que se deve à acumulação de lactato, resultante da desidrogenação do piruvato pela enzima lactato desidrogenase no fígado e no músculo. Vários *case-reports* documentaram a ocorrência de acidose láctica associada à metformina. (Houwerzijl *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2007; McGuinness e Talbert, 1993). No entanto, Salpeter e colaboradores (2003), analisaram estudos relativos à terapêutica com metformina, entre 1966 e 2005, não tendo verificado casos fatais associados à acidose láctica, nem diferenças entre os níveis de lactato de grupos placebo e grupos tratados com o fármaco. Assim, concluíram que não existem evidências significativas que comprovem a associação da metformina com o risco de desenvolvimento de acidose láctica. A incidência deste processo é maior no caso da fenformina (precursor da metformina) e, como tal, a sua comercialização foi interrompida (McGuinness e Talbert, 1993). A excreção da fenformina é prolongada uma vez que exige conjugação e desactivação no fígado enquanto que a metformina é rapidamente excretada pelos rins na forma inalterada pelo que a probabilidade da acumulação tecidual da

metformina é menor (Lalau *et al.*, 1995). O mecanismo pelo qual as biguanidas desencadeiam acidose láctica não está totalmente esclarecido. A metformina interfere indirectamente com a actividade de enzimas que participam nas vias metabólicas e com a respiração celular, podendo assim predispor a célula ao metabolismo anaeróbio. Assim, o piruvato é convertido a lactato por fermentação, sendo que, quando a razão lactato/piruvato aumenta, o excesso celular de lactato é escoado para o sangue, observando-se níveis exagerados de lactato no mesmo e a consequente redução o seu pH (Nelson e Cox, 2008). A acidose láctica associada à metformina resulta de uma conjugação de factores que proporcionam a produção anaeróbia de lactato, a sua eliminação hepática ineficaz e a acumulação de metformina nos rins (Lalau *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, este processo metabólico ocorre em indivíduos com factores de pré-disposição clínicos que facilitam a acumulação de lactato, como é o caso de hipoxia, complicações renais e hepáticas, complicações cardiovasculares e respiratórias, a idade avançada e a utilização concomitante com outros medicamentos (ex.: IECAs, AINEs, diuréticos tiazídicos) (Pongwecharak *et al.*, 2009; Silvestre *et al.*, 2007). Em suma, a acidose láctica é uma das complicações mais graves associada às biguanidas mas não está significativamente relacionada com a metformina, excepto quando o perfil clínico do doente diabético o predispõe.

1.3.1. Diarreia diabética e não diabetica

A DT2 está associada a sintomas gastrointestinais como náuseas, vómitos, dor abdominal, gastroparésia, obstipação, incontinência fecal, dando-se maior relevância à diarreia por ser um dos sintomas mais comuns e de maior prevalência (Shakil *et al.*, 2008; Bytzer *et al.*, 2001b; Quan *et al.*, 2008; Lysy *et al.*, 1999; Miller, 1983). Bytzer e seus colaboradores (2001a) avaliaram a prevalência de sintomas GI associados à diabetes num grupo controlo (n=8185) e num grupo de doentes diabéticos (n=423), dos quais 94,8% com DT2, e verificaram que os 21 sintomas GI considerados foram significativamente mais frequentes no grupo diabético. Um outro estudo prospectivo, realizado pelo mesmo grupo de investigadores, teve como objectivo estudar a associação entre a prevalência de sintomas GI e os fármacos utilizados na terapêutica da DT2. Assim, concluíram que a maioria dos sintomas não seria motivada pela acção de fármacos, mas sim pela própria doença. Contudo, verificaram excepções relativas à terapêutica com metformina e com sulfonilureias, sendo que a metformina estava significativamente associada à diarreia crónica e à incontinência fecal e as sulfonilureias apenas à dor abdominal (Bytzer *et al.*, 2001 b). Desta forma, há que fazer a distinção entre dois termos: “diarreia diabética” que é motivada pela doença *per se*; e

“diarreia não diabética” que tem origem na terapêutica com antidiabéticos orais. Lysy e seus colaboradores (1999), concluíram que a frequência da diarreia diabética é maior em doentes com DT1, enquanto que a maior causa de diarreia não diabética é a terapêutica com metformina.

A definição exacta de diarreia é difícil, devido às consideráveis variações nos hábitos intestinais normais. Um aumento da massa fecal, da frequência das evacuações e/ou da fluidez das fezes é percebido como diarreia pela maioria dos doentes. A diarreia é sempre acompanhada de dor, sensação de urgência, desconforto perianal e incontinência. Geralmente considera-se um episódio diarreico quando ocorre pelo menos uma evacuação de fezes líquidas ou pelo menos quatro evacuações com fezes de consistência mole, por dia. A diarreia pode ser motivada por factores diferentes, classificando-se em vários tipos, de acordo com o mecanismo que a desencadeia. A diarreia secretora caracteriza-se a pelo aumento da secreção e diminuição da absorção intestinais, culminando no transporte de iões cloreto para o lúmen intestinal. Para manter a electronegatividade, iões de sódio atravessam a parede GI, fazendo-se acompanhar por moléculas de água para manter a isotonicidade. A diarreia osmótica ocorre quando os solutos intraluminais (como os açúcares) não são absorvidos, aumentando as forças osmóticas e provocando o movimento de água por osmose, seguido do movimento de iões para o lúmen do intestino. A diarreia também pode ocorrer devido à inflamação da mucosa intestinal, condição esta que estimula a secreção intestinal, culminando na eliminação de fezes purulentas e sanguinolentas. A ocorrência de diarreia também está associada ao aumento da motilidade intestinal resultante de perturbações do controlo neuronal das substâncias que medeiam a contracção da parede GI, como, por exemplo, a serotonina. Contudo, o aumento da motilidade intestinal pode desencadear diarreia secretora, uma vez que a diminuição do tempo de contacto entre o conteúdo intestinal e a mucosa reduz o processo de absorção, estimulando a secreção de água e iões. Já a diminuição da motilidade está associada à diarreia osmótica devido ao prolongamento do contacto entre o conteúdo e a parede intestinais. (Kumar *et al.*, 2005; Guandalini e Vaziri 2011).

A diarreia diabética deve-se essencialmente a alterações na motilidade GI como consequência da neuropatia diabética. A neuropatia diabética está associada tanto à DT1 como à DT2, caracterizando-se por um distúrbio do sistema nervoso autónomo que afecta a função motora, sensorial e reflexa dos sistemas cardiovascular, urogenital e GI. Esta é acompanhada por alterações morfológicas como a desmielinização e a degeneração nervosas, afectando a função de órgãos inervados pelo sistema nervoso autónomo, como é o caso do sistema GI, em que a neuropatia diabética se manifesta através de anomalias na secreção e

motilidade intestinais (Clarke *et al.*, 1979; Edwards *et al.*, 2008). Desta forma, a diarreia está relacionada com a hiperactividade de neurónios secretores/motores excitatórios que inervam a parede GI e estimulam a secreção de água e electrólitos, dando origem às fezes líquidas e aquosas (Wood, 2007). A incidência da diarreia em doentes diabéticos pode assim resultar de uma conjugação de factores neuronais que favorecem a actividade parassimpática em detrimento da actividade simpática, da insuficiência pancreática e da diminuição da absorção de sais biliares (Shakil *et al.*, 2008). A diarreia diabética tanto pode ser de natureza osmótica ou secretora, geralmente severa, com cerca de 10 ou mais episódios por dia que podem ocorrer a qualquer momento, sendo mais frequentes durante a noite ou em outro estado de repouso, o que está associado com a incontinência anal. Este tipo de diarreia episódica aparece intermitentemente intercalada por períodos que podem variar entre dias a meses em que a motilidade intestinal permanece normal, podendo mesmo ocorrer prisão de ventre (Lysy *et al.*, 1999; Schiller *et al.*, 1982; Edwards *et al.*, 2008).

A explicação farmacológica e bioquímica relativamente aos mecanismos subjacentes à diarreia não diabética, isto é, à diarreia desencadeada exclusivamente pela metformina, não é ainda conhecida. Seguidamente, apresentar-se-ão algumas propostas que pensámos serem relevantes para tentar perceber quais os mecanismos que fazem da diarreia, a principal manifestação GI da metformina.

A diarreia pode resultar de uma conjugação de factores que culminam no reforço da actividade parassimpática intestinal. A inervação simpática dos órgãos abdominais, incluindo o intestino, é feita a partir das fibras nervosas que partem do gânglio celíaco. O bloqueio do plexo celíaco é uma técnica cirúrgica utilizada para o alívio da dor abdominal com origem nas vísceras (Raj, 2001, Erdine *et al.*, 2005). O bloqueio simpático está associado ao aumento do peristaltismo intestinal e, por isso, muitos dos doentes desenvolvem diarreia crónica (Chan, 1996). Como referido anteriormente, os doentes diabéticos exibem um perfil muito variado de sintomas gastrointestinais provocados tanto pela doença *per se*, como pela metformina. A DT2 está também associada à degeneração das fibras nervosas que alteram o funcionamento nervoso autónomico, favorecendo a motilidade e secreção intestinais. Assim, tendo em conta o exemplo do bloqueio celíaco, a diarreia provocada pela metformina pode ser o resultado do reforço da actividade parassimpática por parte do fármaco ou do reforço da acção estimulante de neurotransmissores que participem na motilidade e secreção intestinais. Esta hipótese é sustentada pelo facto de alguns estudos demonstrarem a inibição simpática da metformina em outros sistemas biológicos que não o GI. Petersen e seus colaboradores (1996), concluíram que a metformina, actuando por intermédio do sistema nervoso central (SNC), exerce um

efeito inibitório simpático que se revelou no decréscimo da pressão arterial, do ritmo cardíaco e da actividade nervosa simpática eferente renal. Por outro lado, numa colaboração com outros autores, Petersen e colaboradores, (1997), propuseram que doses elevadas de metformina interrompem a neurotransmissão ganglionar em nervos renais, sendo que estes dados contribuem para o reforço da hipótese por nós colocada.

Por outro lado, um dos mecanismos hipoglicemiantes da metformina é o atraso na absorção intestinal de glicose (Bailey, 1995). Os estudos realizados neste âmbito comprovam que a acumulação de metformina no intestino tem um efeito inibitório na absorção de glicose (Ikeda *et al.*, 2000) e que o mesmo é dependente da dose, sendo que o fármaco interfere com os transportadores de glicose intestinais (Wilcock e Bailey, 1991). Sakar e colaboradores (2010) demonstraram que a metformina reduz rapidamente o número de dois transportadores de glicose: SGLT-1 (*Na⁺-dependent glucose transporter-1*) e GLUT-2 nas membranas plasmáticas dos enterócitos, via activação da AMPK. Assim, a redução da absorção de glicose permite que esta se acumule no lúmen intestinal. Ora, a glicose é açúcar que induz o deslocamento de água por osmose através das células epiteliais da mucosa intestinal e, desse modo, a metformina pode desencadear diarreia osmótica.

O objectivo deste estudo pretende esclarecer a acção do fármaco a nível intestinal. Para o tentar compreender, convém perceber o controlo do sistema GI, nomeadamente a influência que o sistema nervoso entérico exerce sobre o funcionamento do mesmo. Podem então colocar-se as seguintes questões: qual a influência que a metformina tem a nível GI? Terá um efeito directo na motilidade e secreção intestinais? Poderá induzir a libertação de substâncias activas no intestino que potenciem os mecanismos subjacentes à diarreia? Poderá favorecer a inervação parassimpática através de um bloqueio das vias neuronais simpáticas?

1.4. O sistema gastrointestinal

1.4.1. Estrutura da parede intestinal

A parede intestinal contém estruturas especializadas que aumentam a superfície de contacto do intestino, nomeadamente, as vilosidades (dobras que se estendem para o lúmen) e as microvilosidades (projeções apicais da membrana celular das células epiteliais). É ainda organizada em quatro camadas – a mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa – como demonstra a figura 1.2. A mucosa é constituída pelo epitélio, uma camada simples de células epiteliais alternadas com células exócrinas e endócrinas que secretam muco para o lúmen e libertam hormonas para a corrente sanguínea, respectivamente. No intestino delgado, a secreção intestinal é um processo que se deve ao movimento de iões e água das células epiteliais para o lúmen: células epiteliais secretam iões como o sódio, o cloreto e o bicarbonato ocorrendo o movimento de água por osmose. No epitélio surgem ainda invaginações formando glândulas exócrinas que secretam enzimas, água, iões e muco para o lúmen. Sob o epitélio encontra-se a lâmina própria, por onde passam pequenos vasos sanguíneos, fibras nervosas e vasos linfáticos. A mucosa é ainda constituída pela *muscularis mucosa* que consiste numa fina camada de músculo liso separando a mucosa da camada seguinte. A submucosa contém uma rede de células nervosas, o plexo submucoso (ou plexo de Miessner), juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos de maior envergadura que se projectam para as camadas adjacentes. A actividade contráctil do tracto GI é desempenhada pela camada muscular que, por sua vez, contém dois tipos de camadas compostas por células musculares lisas: a camada circular, cuja contracção permite o estreitamento do lúmen e a camada longitudinal, cuja contracção leva ao encurtamento do tubo GI. Entre as duas camadas musculares encontra-se outra rede nervosa, o plexo mientérico (ou plexo de Auerbach). A serosa rodeia a superfície exterior do tracto GI e está anexada ao mesentério que suporta o tracto GI na cavidade abdominal (Vander *et al.*, 2003; Noback *et al.*, 2005).

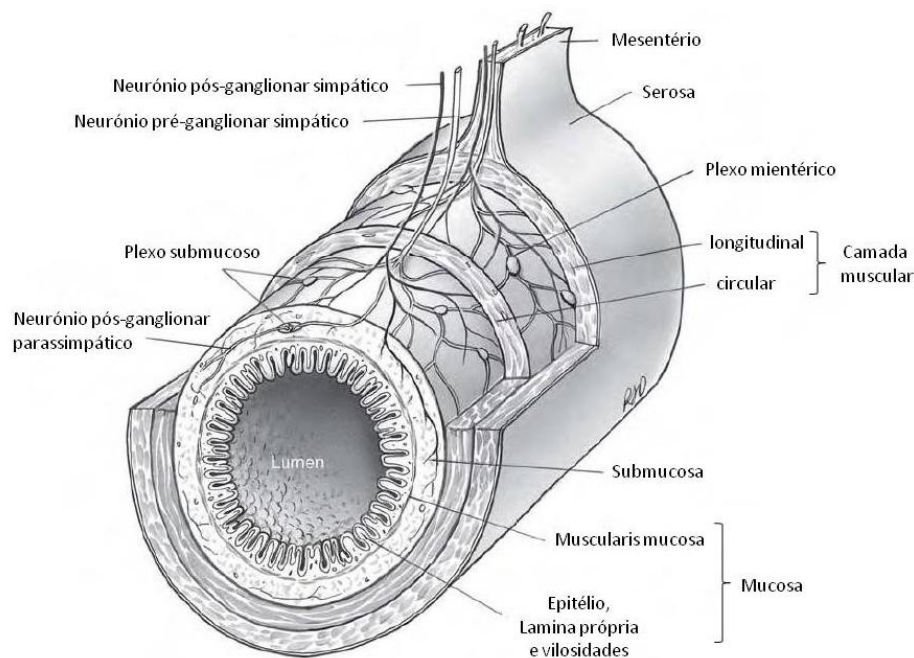


Figura 1.2. Estrutura e inervação da parede gastrointestinal (adaptado de Noback *et al.*, 2005).

1.4.2. Contração do músculo liso intestinal

As células do músculo liso das camadas da parede intestinal apresentam morfologia fusiforme, são mononucleadas e comportam-se de forma unitária. Cada célula apresenta três tipos de filamentos: os filamentos espessos de miosina, os filamentos finos de actina e os filamentos intermédios que não participam directamente na contracção, mas fazem parte do citosqueleto, permitindo a transmissão da força contráctil a toda a célula. Contrariamente ao músculo esquelético, os miofilamentos não estão agrupados em sarcómeros e não se organizam em miofibrilhas, sendo essa a razão pela qual o músculo liso não apresenta aspecto estriado. Assim, os filamentos de actina estão ligados aos corpos densos que se encontram distribuídos no sarcoplasma e no sarcolema e cuja coesão é mantida pelos filamentos intermédios de desmina. Além de áreas densas, o sarcolema apresenta ainda cavéolas, invaginações membranares que contém estruturas especializadas para as demais funções celulares como proteínas, lípidos e depósitos de cálcio. As células do músculo liso estão unidas por *gap junctions* e por desmossomas: as *gap junctions* asseguram a passagem de moléculas e de correntes iónicas envolvidas na geração dos potenciais de acção, facilitando a condução eléctrica directa entre várias células; os desmossomas, para além de contribuírem para a adesão intercelular, permitem a transmissão da força de contracção desenvolvida por uma célula para a célula seguinte. Assim, as células de músculo liso intestinal comportam-se

como um grupo que está interligado e, por isso, funciona eléctrica e mecanicamente como uma unidade, constituindo um sincício funcional (Sherwood, 2008).

A motilidade intestinal refere-se a contracções musculares que propulsionam o conteúdo luminal, sendo gerada pelo músculo liso da parede do tracto GI. Na origem do processo de contracção do músculo liso, podem estar um dos seguintes mecanismos: activação mecânica dos miofilamentos; activação de receptores por acção de hormonas ou neurotransmissores como a acetilcolina (ACh – *acetylcholine*); alteração do potencial de membrana por influência da activação de canais iónicos ou por propagação de potenciais de acção; acção das células intersticiais de Cajal (CIC). A actividade contráctil do músculo liso é iniciada pela elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular. A maioria do Ca^{2+} sarcoplasmático provém do influxo do ião do espaço extracelular para a célula, através de canais iónicos de cálcio (associados a receptores ou sensíveis à voltagem) presentes na membrana celular. No entanto, a célula também utiliza recursos intracelulares de cálcio, através da libertação do mesmo a partir do retículo sarcoplasmático (Sherwood, 2008). Este último mecanismo envolve vias de transdução de sinal em resposta a um estímulo neurohumoral externo (figura 1.3.). Após a ligação da hormona ou do neurotransmissor, a fosfolipase C é activada, catalisando a conversão do lípido membranar PIP_2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) em dois segundos mensageiros: IP_3 (*inositol trisphosphate*) e o diacilglicerol (DAG). A interacção do IP_3 com receptores específicos presentes no retículo sarcoplasmático desencadeia a libertação de cálcio do seu interior para o citoplasma. O DAG, juntamente com o cálcio, activa a proteína cinase C cuja função é fosforilar outras proteínas que também intervêm na regulação do processo de contracção. Contudo, a contracção depende do estado de fosforilação da cadeia leve de miosina. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} permite a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina que, por sua vez, activa a MLCK (*myosin light chain kinase*). A MLCK catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para a miosina, estabelecendo-se assim pontes cruzadas entre a actina e a miosina. A acção da MLCK também estimula a actividade Mg^{2+} -ATPase das cabeças de miosina ocorrendo hidrólise de ATP. A energia libertada durante esta reacção é necessária para que os filamentos deslizem um sobre o outro, levando ao encurtamento das células musculares lisas, isto é, à contracção.

O relaxamento das células de músculo liso ocorre graças à terminação do estímulo ou pela acção directa de substâncias que inibem o mecanismo contráctil. Este processo requer diminuição da concentração de Ca^{2+} do meio intracelular, quer pelo sequestro do mesmo para o interior do retículo sarcoplasmático, quer pelo efluxo do ião para o meio extracelular. Em

ambas as membranas sarcoplásmica e celular existem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPases, sendo que, na membrana plasmática, os trocadores antiporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também contribuem para a remoção do Ca^{2+} do citoplasma. Como consequência, o Ca^{2+} desliga-se da calmodulina e a MLCK permanece inactiva. Por sua vez, a miosina fosfatase é activada catalizando a desfosforilação das cadeias leves de miosina, o que promove o relaxamento das células de músculo liso (Webb, 2003).

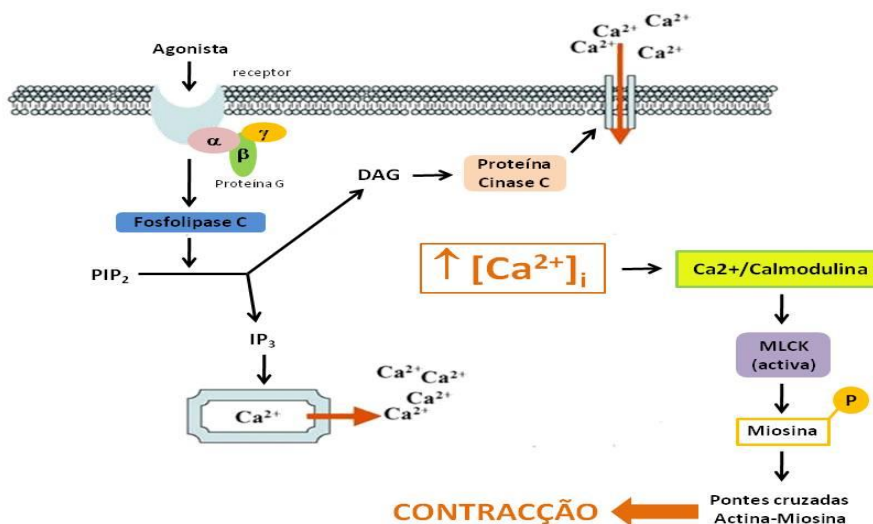


Figura 1.3. Vias de sinalização celular do mecanismo de contração do músculo liso (adaptado de Morelli *et al.*, 2006).

O músculo liso do intestino apresenta dois tipos de contrações – tónicas e fásicas. O relaxamento resulta da remoção do estímulo contráctil ou da acção de substâncias relaxantes. O tónus é a capacidade de manutenção de um estado de contração prolongado. O tónus existe devido ao potencial de repouso das células musculares lisas que varia entre -40 a -80 mV. Alguns dos canais iónicos sensíveis à voltagem, presentes no sarcolema, estão abertos a este potencial, permitindo a entrada passiva de iões como o Ca^{2+} e, portanto, a contração moderada e contínua do músculo. Por outro lado, a tonicidade também pode ser regulada pela estimulação nervosa contínua de baixa intensidade ou por factores hormonais. As contrações fásicas rítmicas originam os movimentos propulsivos do conteúdo luminal e são reguladas por ondas lentas. As ondas lentas são originadas pela função *pacemaker* das CIC e representam os ritmos eléctricos basais do intestino (Čamborová *et al.*, 2003). Uma onda lenta consiste na seguinte sequência: despolarização rápida, repolarização parcial, *plateau* prolongado e repolarização completa. Em alguns casos, quando se atinge o limiar, são impostos potenciais *spike* no *plateau* da onda lenta. Estes são potenciais muito curtos que intensificam a amplitude do *plateau*, podendo vir a dar origem a contrações fásicas intestinais, mediante influência

neurohumoral (Hansen, 2003). Na origem da ritmicidade das contracções intestinais estão as CIC que formam uma rede tri-dimensional de células dispostas de forma adjacente e por entre as camadas circular e longitudinal de músculo liso e pelos plexos mientérico e submucoso (Hirst e Edwards, 2004). As CIC são espontaneamente activas a valores de potencial mais baixos (mais positivos) do que as células musculares lisas. A esse potencial, os canais de cálcio sensíveis à voltagem criam pequenas correntes de influxo. No entanto, tem de ocorrer despolarização das CIC para a activação das correntes *pacemaker*. O facto de as CIC estarem electricamente acopladas entre si e às células musculares, facilita a potenciação da corrente e, portanto, a origem da onda lenta. Os dois tipos de células estão associadas por *gap junctions*, formando canais intercelulares que possibilitam a transferência de corrente eléctrica e, desta forma, é gerada a contracção do músculo liso (Li *et al.*, 1993; Čamborová *et al.*, 2003). Assim, a ritmicidade da contracção da parede GI é levada a cabo pela progressão da onda lenta originada nas zonas onde se concentram as CIC. Esta propaga-se em todas as direcções, estendendo-se às células vizinhas das camadas de músculo liso, provocando contracção e consequentemente o peristaltismo que permite o movimento do conteúdo intestinal (Huizinga e Lammers, 2009).

1.4.3. Regulação da motilidade intestinal

A regulação da motilidade e secreção intestinais é levada a cabo pela acção de neurotransmissores e de hormonas. A regulação hormonal é feita por substâncias como a insulina, a neurotensina, a colecistoquinina, a secretina, a gastrina, as incretinas, a motilina e a serotonina. Algumas são libertadas a partir das células endócrinas da mucosa GI após uma refeição ou em resposta a um estímulo mecânico/químico do conteúdo GI, interagindo, por exemplo, com receptores presentes em células neuronais e células musculares lisas, regulando assim a motilidade intestinal (Ahlman e Nilsson, 2001).

A regulação neuronal depende da inervação extrínseca, simpática e parassimpática, e da inervação intrínseca que constitui o sistema nervoso entérico (SNE). A inervação autonómica extrínseca estabelece o vínculo entre o SNC e o tracto GI: as vias parassimpáticas favorecem a actividade do órgão por acção da ACh, enquanto que as vias simpáticas contribuem para a redução da mesma por acção da noradrenalina. O SNE controla a actividade GI através de reflexos locais que são desencadeados por factores como a distensão local da parede intestinal, a distensão da mucosa e a composição química do conteúdo intestinal. Este é considerado quase como um “*minibrain*”, uma vez que exerce a sua função de um modo quase independente da influência do SNC. A musculatura (camadas circular e

longitudinal), o epitélio da mucosa intestinal (células epiteliais e células cromafins) as CIC e a vasculatura são sistemas efectores do SNE. Assim, o comportamento global do órgão reflecte a actividade neuronal integrada destes sistemas. A sinalização química do SNE é exercida pela acção de neurotransmissores e neuropeptídeos de acção excitatória (ACh, serotonina e substância P) e inibitória (noradrenalina, polipeptídeo intestinal vasoactivo (VIP – *vasoactive intestinal polipeptide*), neuropeptídeo Y e o NO). O ATP pode actuar tanto como transmissor de acção inibitória como excitatória, consoante o tipo e a localização dos receptores em que actua. Estes mediadores podem actuar tanto em neurónios, como nas restantes células que fazem parte da constituição da parede GI, modulando a sua actividade. A inervação intrínseca do intestino é composta por neurónios aferentes primários intrínsecos (IPANs – *intrinsic primary afferent neurons*), interneurónios e neurónios motores. Estes estão agrupados em dois plexos nervosos: o plexo mientérico, que coordena a actividade do músculo liso, e o plexo submucoso, que regula a secreção da mucosa e o fluxo sanguíneo. Os IPANs são referenciados como os neurónios de maior relevância para o início da resposta fisiológica à digestão estabelecendo sinapses com neurónios motores através de interneurónios. A sua activação constitui o início de um circuito neuronal cujo efeito final se traduz na coordenação da motilidade e secreção intestinais. Os IPANs estabelecem sinapses com interneurónios, maioritariamente colinérgicos, ascendentes e descendentes. Por sua vez, estes interneurónios interagem com neurónios motores que inervam as células de músculo liso, mediando a sua contracção/relaxamento. Na junção de difusão neuromuscular, os neurónios motores libertam ACh e substância P como neurotransmissores de acção excitatória e NO, ATP e VIP de acção inibitória. O sistema nervoso entérico também dispõe de mecanismos neuronais que controlam a actividade das CIC, assim como das células secretoras (neurónios secretomotores) presentes na mucosa regulando a ritmicidade e a secreção intestinal de fluidos e electrólitos (Costa *et al.*, 2000; Benarroch, 2007; Wood *et al.*, 1999; Bertrand, 2003; Hirst e Edwards, 2004). Contudo, o conhecimento geral do funcionamento intestinal não é ainda percebido de forma consistente devido à complexidade dos mecanismos de acção das substâncias que medeiam a componente hormonal, neuronal, muscular e secretora.

A acetilcolina é um neurotransmissor de grande importância a nível gastrointestinal: i) é o principal mediador parassimpático; ii) as vias neuronais entéricas são maioritariamente colinérgicas; iii) é o principal transmissor excitatório da contracção das células musculares lisas. As fibras nervosas parassimpáticas que inervam o sistema GI partem de ramificações do SNC, nomeadamente do nervo vago e dos nervos pélvicos. Estas fibras nervosas, que não são mais que neurónios pré-ganglionares parassimpáticos, estendem-se a

gânglios terminais onde estabelecem sinapse com neurónios pós-ganglionares na parede dos órgãos efectores (Olsson e Holmgren, 2001). A ACh é armazenada em vesículas sinápticas e, após o potencial de acção, é libertada a partir dos terminais nervosos, sendo posteriormente degradada pela acetilcolinesterase, uma enzima abundante na fenda sináptica que permite a terminação rápida da acção da mesma. A nível intestinal, a ACh desempenha funções como a regulação do transporte iónico em células epiteliais e o controlo directo da motilidade intestinal (Hirota e McKay, 2006). Na junção de difusão, as moléculas de ACh activam receptores muscarínicos M_2 e M_3 nas células musculares lisas que medeiam a contracção (Tobin *et al.*, 2009). Os receptores nicotínicos, para além de terem uma localização ganglionar, estão descritos em neurónios colinérgicos e não colinérgicos, interneurónios e em neurónios motores dos plexos mientérico e submucoso. Assim, estão envolvidos na modelação das vias neuronais que controlam a actividade GI cujo efeito net se traduz na libertação de ACh dos neurónios motores e deste modo na motilidade intestinal (Mandl e Kiss, 2007; Olsson e Holmgren, 2001).

No sistema GI, também é de considerar a histamina pelas funções distintas que desempenha: secreção gástrica de ácido clorídrico, imunomodulação, contracção do músculo liso, vasodilatação e controlo epitelial e endotelial. A maioria da histamina provém de grânulos existentes nos mastócitos (células do sistema imunitário) e nas células enterocromafins-*like* (EC-*like*) presentes no estômago. No entanto, uma pequena componente histaminérgica tem origem neuronal, nomeadamente, no SNC e SNE. Nos neurónios, a histamina é transportada através do transportador VMAT (*vesicular monoamine transporter*) para o interior de vesículas, enquanto que nos mastócitos e nas células EC-*like* é armazenada em grânulos. Após a sua libertação, a terminação da resposta à histamina é feita pela histamina metiltransferase no SNC e pela MAO (monoaminoxidase) e pela diamina oxidase nos tecidos periféricos (Haas *et al.*, 2008). Apesar da principal função da histamina, no tracto GI, ser a regulação da secreção gástrica, a acção da mesma também tem vindo a ser associada a sintomas gastrointestinais como a diarreia (Wood 2006). Giovanni e seus colaboradores (2004) observaram que a libertação de histamina a partir dos mastócitos de doentes com Síndrome do Intestino Irritável é maior quando comparada com indivíduos normais. A histamina não é sintetizada por neurónios entéricos e, por isso, não é considerada como um neurotransmissor no intestino, tendo origem essencialmente dos mastócitos (Nemeth *et al.*, 1984). A histamina contribui de um modo directo para a motilidade intestinal através de receptores H_1 localizados nas células de músculo liso da parede intestinal, provocando a sua contracção (Bertaccini *et al.*, 1992, Sander *et al.*, 2006). Por outro lado, esta actua em

receptores localizados em neurónios entéricos do plexo mientérico e submucoso estimulando a libertação de neurotransmissores como a ACh e, simultaneamente, em receptores pré-sinápticos inibitórios que bloqueiam a inervação simpática do intestino, favorecendo a actividade nervosa parassimpática e assim contribuindo para a ocorrência de diarreia (Liu *et al.*, 2000; Frieling *et al.*, 1993; Tamura *et al.*, 1988; Wood, 2007).

1.4.3.1. A serotonina no sistema gastrointestinal

A actividade gastrointestinal tem uma importante componente serotoninérgica. A serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT) é um neurotransmissor utilizado por vários sistemas neuronais do cérebro e do intestino. Contudo, dos neurónios constituintes do SNE, apenas uma pequena quantidade contém 5-HT. A maioria são colinérgicos, sendo que a 5-HT actua essencialmente como modulador da actividade neuronal, influenciando a contracção do músculo liso de um modo indirecto, apesar de estarem descritos receptores de 5-HT no músculo liso (Gershon e Tack, 2007; Hansen, 2003). A libertação de 5-HT a partir das células enterocromafins (EC) parece ser o estímulo de maior relevância para o processo da motilidade e secreção intestinais. As EC constituem a maior população de células endócrinas no tracto GI, localizando-se no epitélio da mucosa intestinal e projectando as suas porções apicais para o lúmen. O citoplasma das células EC está repleto de grânulos que armazenam produtos de secreção destas células, sendo que cerca de 90% da 5-HT intestinal tem origem nestas células (Nilsson *et al.*, 1987). A síntese de 5-HT ocorre no citoplasma e é posteriormente transportada para o interior de grânulos através do VMAT. A estimulação das células EC permite a translocação dos grânulos para a membrana celular, ocorrendo a libertação do seu conteúdo por exocitose. A 5-HT secretada é projectada para o lúmen intestinal, tendo como alvo primário os IPANs que activarão outros circuitos neuronais que iniciam reflexos peristálticos e a actividade secretora do intestino. A terminação da acção da 5-HT é feita pelo *reuptake* da mesma para o interior das células EC e dos neurónios ou por degradação enzimática levada a cabo pela acção da MAO (Gershon 1999; Gershon e Tack, 2007). A acção da 5-HT é mediada por receptores serotoninérgicos. Actualmente estão descritos 7 tipos de receptores com diferentes subtipos e localização celular que variam consoante a espécie. São receptores metabotrópicos com 7 domínios transmembranares acoplados à proteína G, à excepção dos receptores 5-HT₃, que formam um canal iónico pentamérico. A tabela I sumariza e descreve a classificação dos receptores da 5-HT expressos em rato, ratinho e humano. Estes estão classificados de acordo com características genéticas, estruturais, mecanismos de transdução e perfil farmacológico, tendo como referência os dados disponibilizados pela IUPHAR

(*International Union of Pharmacology*). Uma vez que este estudo incide sobre o efeito da metformina a nível intestinal, dar-se-á relevância aos receptores da 5-HT descritos no tracto GI, nomeadamente aos receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ e 5-HT₇, presentes nas células de músculo liso, e aos receptores neuronais 5-HT_{1A}, 5-HT₃ e 5-HT₄ que regulam a actividade GI uma vez que modulam a neurotransmissão (Hoyer *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2011; Lummis *et al.*, 2010).

Tabela I. Classificação e caracterização dos receptores de 5-hidroxitriptamina.

Tipo de receptor	Subtipo de receptor	Via de transdução, distribuição e função
5-HT ₁	5-HT _{1A}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gi/Go, inibindo a adenil ciclase; Distribuição tecidular: SNC; plexo mientérico; músculo liso vascular; macrófagos; rins; Função: hiperpolarização neuronal; autorreceptor a nível central; heteroreceptor no plexo mientérico; inibição da libertação de neurotransmissores; contracção do músculo liso vascular; antinocicepção; comportamento e aprendizagem; actividade locomotora; estimulação da capacidade fagocítica.
	5-HT _{1B}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gi/Go, inibindo a adenil ciclase; Distribuição tecidular: SNC; neurónios autonómicos; músculo liso vascular; endotélio vascular; timo, linfócitos; baço; Função: autorreceptor/heteroreceptor; inibição da libertação de neurotransmissores; contracção do músculo liso vascular.
	5-HT _{1D}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gi/Go, inibindo a adenil ciclase; Distribuição tecidular: SNC; neurónios autonómicos; músculo liso vascular; Função: autorreceptor/heteroreceptor; inibição da libertação de neurotransmissores; contracção do músculo liso vascular.
	5-HT _{1E}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gi/Go, inibindo a adenil ciclase; Distribuição tecidular: SNC; Função: desconhecida.
	5-HT _{1F}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gi/Go, inibindo a adenil ciclase; Distribuição tecidular: SNC; útero; mesentério; coração; timo; linfócitos; baço; Função: desconhecida.
5-HT ₂	5-HT _{2A}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gq/G ₁₁ , estimulando a fosfolipase C; Distribuição tecidular: SNC e sistema nervoso periférico (SNP); endotélio vascular; músculo liso vascular; músculo liso dos brônquios, bexiga e intestino delgado; plaquetas; Função: contracção do músculo liso; agregação plaquetária; potenciação da dor inflamatória periférica.
	5-HT _{2B}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gq/G ₁₁ , estimulando a fosfolipase C; Distribuição tecidular: SNC; endotélio vascular; músculo liso vascular; músculo liso do útero, <i>fundus</i> do estômago, intestino delgado, intestino grosso, pulmões; traqueia, coração, rins, fígado, ovários; músculo esquelético; testículos; placenta; próstata; pâncreas; Função: contracção do músculo liso vascular; regulação da diferenciação e proliferação do coração adulto e em desenvolvimento.

	5-HT _{2C}	Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gq/G ₁₁ , estimulando a fosfolipase C; Distribuição tecidual: SNC; Função: analgesia; ansiedade; hiperlocomoção; redução do consumo de comida; regulação do sono; regulação da resposta ao <i>stress</i> .
5-HT ₃		Via de transdução: Receptor ionotrópico, com permeabilidade a iões monovalentes (Na ⁺ e K ⁺) e Ca ²⁺ , contribuindo para o aumento da [Ca ²⁺] _i e consequentemente para a despolarização do neurónio; Distribuição tecidual: SNC e SNP; neurónios entéricos; Função: modulação da actividade e transmissão neuronal; excitação simpática e parassimpática; controlo de reflexos a nível cardiovascular, respiratório, urinário e gastrointestinal.
5-HT ₄		Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gs, estimulando a adenil ciclase; Distribuição tecidual: SNC; músculo liso do esófago, do intestino delgado e do intestino grosso; músculo cardíaco; neurónios entéricos; neurónios respiratórios; Função: relaxamento/contração do músculo liso; aumento do ritmo cardíaco; modulação da transmissão neuronal; plasticidade sináptica; aprendizagem e memória; estímulo do consumo de comida.
5-HT ₅		Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gq/G ₁₁ , estimulando a fosfolipase C; Distribuição tecidual: SNC; Função: ainda não totalmente definida; modulação do comportamento e possível controlo do ritmo cardíaco.
5-HT ₆		Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gs, estimulando a adenil ciclase; Distribuição tecidual: SNC; timo, linfócitos, baço; Função: aprendizagem e memória; modulação da transmissão colinérgica e dopaminérgica.
5-HT ₇		Via de transdução: Receptor metabotrópico acoplado a proteína Gs, estimulando a adenil ciclase; Distribuição tecidual: SNC; coração; músculo liso vascular; músculo liso do intestino delgado e intestino grosso; timo; linfócitos; baço; Função: relaxamento do músculo liso; nocicepção; antinocicepção; regulação do ritmo cardíaco; hipotermia; hipotensão; aprendizagem e memória.

Apesar de ainda não oficialmente aceite pela IUPHAR, tem vindo a ser sugerida a existência de um outro subtipo de receptor, o 5-HT_{1P}. Este é encontrado exclusivamente a nível periférico, no sistema nervoso entérico, participando no controlo da actividade intestinal já que a sua activação permite a despolarização lenta de neurónios do plexo mientérico e submucoso (Barnes *et al.*, 2011). Pan e Gershon (2000) identificaram a presença de receptores 5-HT_{1P} em IPANs do intestino delgado de cobaias, enquanto que outros autores os identificaram em intestino delgado (Branchek *et al.*, 1988) e cólon de rato (Grider *et al.*, 1996). Contudo, alguns autores sugerem que o receptor 5-HT_{1P} pode, na verdade, ser o receptor 5-HT₇. Apesar de estar maioritariamente expresso no SNC, o RNA mensageiro do receptor 5-HT₇ também é encontrado no íleo e cólon de humanos, mediando o relaxamento do músculo liso (Bard, *et al.*, 1993; Jasper *et al.*, 1997).

Os receptores 5-HT_{1A} dos terminais colinérgicos do plexo mientérico comportam-se como heterorreceptores somatodendríticos. Assim, o seu efeito traduz-se na diminuição da libertação de ACh e na redução da actividade intestinal, conforme observado em intestino de cobaias e de rato (Dietrich e Kilbinger, 1996; Kirchgessner *et al.*, 1996 e 1993; Foong *et al.*, 2009).

A actividade dos receptores 5-HT_{2A/2B} reflecte-se na contracção gástrica e intestinal, uma vez que estão descritos nas células de músculo liso da parede do tracto GI (Andrade *et al.*, 2011). Baxter e colaboradores (1994) identificaram os receptores 5-HT_{2B} como os mediadores da contracção do músculo liso longitudinal da região do *fundus* de estômago de rato em resposta à 5-HT. Por outro lado, Komada e Yano (2007) observaram a intervenção dos receptores 5-HT_{2A/2B} na resposta contráctil do músculo liso circular de estômago de rato à 5-HT, pelo que acrescentam ainda a presença de ambos nas várias regiões gástricas. A nível intestinal, experiências em ratinhos *knockout* para o receptor 5-HT_{2A} revelaram a ausência de contracção do músculo liso do cólon em resposta à 5-HT (Fiorica-Howells *et al.*, 2002). Mais ainda, estudos funcionais de contracção de músculo liso longitudinal demonstraram o envolvimento de receptores 5-HT_{2A}, em íleo de rato e 5-HT_{2B}, em intestino delgado e cólon humanos, na resposta contráctil à 5-HT (Briejer *et al.*, 1997; Borman e Burleig, 1995, Borman *et al.*, 2002).

Os receptores 5-HT₃ estão descritos apenas a nível neuronal, tanto no SNC como em neurónios sensoriais, neurónios pré e pós-ganglionares autonómicos e em neurónios do SNE. Ao contrário dos restantes tipos de receptores, estes são um canal iónico pentamérico nos quais a ligação da 5-HT permite o influxo de Na⁺ e Ca²⁺ e o efluxo de K⁺, com consequente despolarização do neurónio. Assim, a sua principal função é a modulação da libertação de vários neurotransmissores a partir dos terminais nervosos (Lummis *et al.*, 2011). Bertrand e colaboradores (2000), através de estudos em preparações de íleo de cobaia, revelaram que os terminais dos IPANs do plexo mientérico são activados via receptores 5-HT₃. Para além disso, os receptores 5-HT₃ estão presentes em várias regiões do intestino delgado e do intestino grosso de rato e humano e estão localizados em neurónios dos plexos mientérico e submucoso, em neurónios que inervam as CIC e as células epiteliais das criptas intestinais (Niesler *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 2005; Glatzle *et al.*, 2002). Deste modo, estes receptores medeiam a libertação de ACh dos terminais do plexo mientérico, provocando a contracção de segmentos de íleo de cobaias, ratinho e rato (Bertrand *et al.*, 2000; Fox and Morton 1990; Tuladhar *et al.*, 2000; Kiso *et al.*, 2001).

Os receptores 5-HT₄ estão descritos em neurónios entéricos (plexo mientérico e submucoso), aumentando a transmissão sináptica de neurónios colinérgicos o que, por sua vez, aumenta a actividade de neurónios motores que inervam o músculo liso intestinal (Hoyer *et al.*, 1994). Deste modo, modulando a neurotransmissão, influenciam o comportamento da parede GI e das células secretoras e estimulam o esvaziamento gástrico em estômago de rato, ratinho e humano (Hegde *et al.*, 1995; Degen *et al.*, 2001; Crowell *et al.*, 2005), o reflexo

peristáltico (contração ascendente e relaxamento descendente) em rato, ratinho, e humano (Kadowaki *et al.*, 2002; Foxx-Orenstein *et al.*, 1996; Grider, 2003), e a secreção intestinal de Cl^- , HCO_3^- e Na^+ em rato (Budhoo e Kellum, 1994; Ning *et al.*, 2004) e de HCO_3^- em ratinho (Tuo *et al.*, 2004). No músculo liso, a activação dos receptores 5-HT₄ traduz-se no relaxamento ou contração, consoante a espécie e a região do tracto GI: relaxamento do esófago e do íleo de rato (Tuladhar *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 1991), mas contração do íleo de cobaia; relaxamento do cólon em humano (McLean, *et al.*, 1996 a e b), mas contração da camada circular do cólon de rato (Ono *et al.*, 2005; Mitsui, *et al.*, 2005).

A modulação da libertação de 5-HT endógena a partir das células enterocromafins tem vindo a ser relacionada com a acção conjunta dos receptores 5-HT₃ e 5-HT₄. Em íleo de cobaias, estes receptores parecem estimular e inibir, respectivamente, a libertação de 5-HT (Gebauer *et al.*, 1993). Estes resultados foram confirmados em preparações de íleo humano e suíno (Schwörer *et al.*, 1998). Contudo, são resultados de estudos funcionais, sendo ainda necessários estudos moleculares que comprovem efectivamente a localização destes receptores neste tipo de células endócrinas.

Capítulo 2

Objetivos

Objectivos

Como já foi descrito no capítulo anterior, a toma de metformina está associada a efeitos adversos, nomeadamente a sintomas gastrointestinais. Assim, tendo em vista o estudo dos mecanismos farmacológicos subjacentes a esses mesmos efeitos, foram definidos os seguintes objectivos:

1. Através de estudos funcionais de contracção de músculo liso, caracterizar farmacologicamente a resposta contráctil do íleo de rato à metformina, utilizando antagonistas selectivos de diferentes tipos de receptores;
2. Determinar se o mecanismo subjacente à contracção intestinal induzida pela metformina é ou não neuronal;
3. Verificar qual o papel do monóxido de azoto na resposta contráctil à metformina, através da utilização de um inibidor enzimático das três isoformas da sintase do NO;
4. Estudar comparativamente a contracção intestinal induzida pela metformina e pela 5-HT num modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2;
5. Avaliar a possível contribuição das células enterocromafins para o mecanismo de contracção intestinal induzido pela metformina;
6. Complementar os estudos funcionais através de estudos histoquímicos/imunohistoquímicos de modo a caracterizar a micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato e a determinar a localização celular de receptores dos subtipos 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}.

Capítulo 3
Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com cerca de 8-9 semanas (200-300 g), fornecidos pela Charles River (Barcelona, Espanha). Estes foram mantidos em armários biotério ventilados, com ciclos de luz/obscuridade de 12 horas, temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e humidade controladas (50-60%). Durante o período de alojamento, os animais tiveram livre acesso a água e a dieta *standard* para roedores (4 RF 21/1, Mucedola, Itália).

Foi ainda utilizado um modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2, isto é, ratos *Goto-Kakisaki*, numa colaboração com o Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os ratos GK são uma subestirpe de ratos Wistar não obesos, insulino-resistentes, com hiperglicémia intermédia e hiperinsulinémia. Para a sua obtenção, partiu-se de uma população normal de ratos Wistar, de onde foram ser seleccionados para cruzamento os animais cujos níveis de glicose sanguíneos se apresentavam mais elevados. Os cruzamentos selectivos foram repetidos por várias e numerosas gerações, culminando com animais em estado diabético propriamente dito (Goto *et al.*, 1976). Todos os ratos GK usados, possuíam as mesmas características e foram mantidos sob as mesmas condições descritas anteriormente.

3.2. Isolamento do órgão

Os animais foram sacrificados por decapitação e foi isolada a porção intestinal correspondente ao íleo. Esta foi colocada imediatamente numa solução fisiológica de Krebs-Henseleit¹ gelada e oxigenada com carbogénio (mistura de 95% de O₂ - 5% de CO₂). Posteriormente, foi removido o mesentério adjacente e a porção de íleo foi cortada em segmentos de 1,5 cm, cujo conteúdo intestinal foi eliminado mediante lavagem com a mesma solução. Os segmentos intestinais foram suspensos em hastes, colocados em banhos de órgãos de 15 ml e mantidos em solução fisiológica a 37°C, sob a tensão basal de 29,4 mN, de acordo com a metodologia descrita por Santos (2005) (figura 3.1.). A tensão óptima basal foi determinada em experiências preliminares, nas quais se estudou a resposta contráctil do órgão a 100 µM de acetilcolina sob diferentes tensões. A tensão basal em cada experiência foi aquela que ocorreu espontaneamente no tecido submetido à tensão óptima, após o período de equilíbrio que se segue à montagem do órgão.

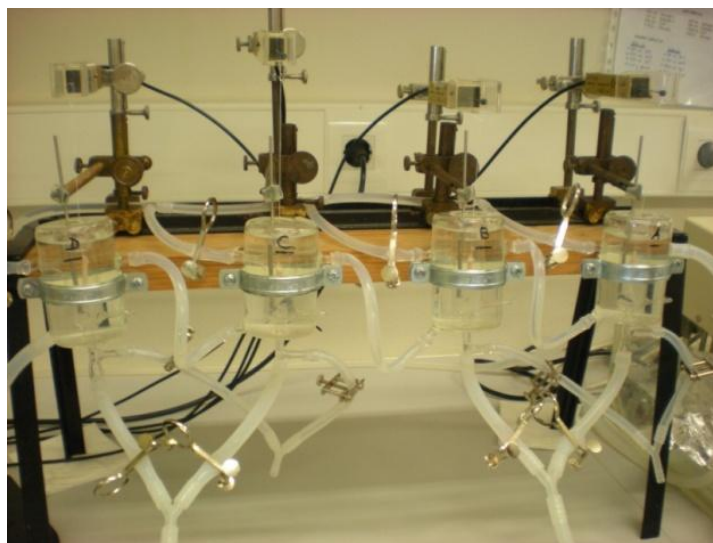


Figura 3.1. Segmentos de íleo montados em banhos de órgãos de 15 ml.

¹ Solução de Krebs-Henseleit (composição em mmoles/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.

3.3. Protocolos experimentais – estudos funcionais

Após um período de equilíbrio de duas horas com lavagens periódicas registaram-se, com transdutores de força (*Letica Scientific Instruments*) ligados a um polígrafo de quatro canais (*Polygraph 4006, Letica Scientific Instruments*), as contracções isométricas de curvas não cumulativas concentração-resposta (CR) à metformina e frequência-resposta (FR) na ausência e na presença de metformina. Inicialmente todos os segmentos intestinais foram sujeitos a 100 μM de acetilcolina exógena para induzir directamente a contracção máxima do músculo liso do íleo e, desta forma, ser possível a comparação dos resultados de experiências diferentes. Em todas as experiências foram efectuadas duas curvas não cumulativas CR/FR (figura 3.2.), sendo a primeira curva efectuada na ausência de qualquer fármaco antagonista. Entre cada uma das adições, fizeram-se lavagens repetidas com solução fisiológica de Krebs-Henseleit.

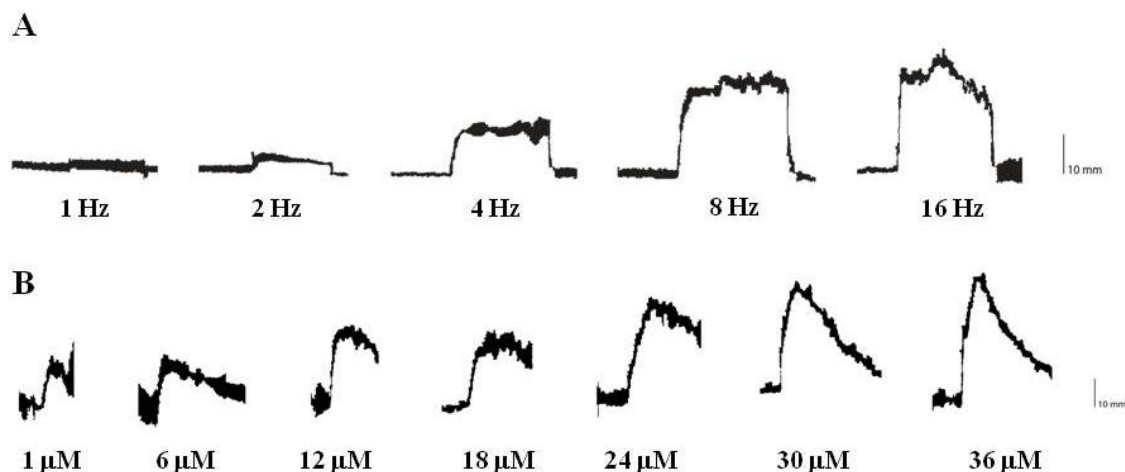


Figura 3.2: Registos de uma curva não cumulativa frequência-resposta à estimulação eléctrica de campo (B) e de uma curva não cumulativa concentração-resposta à metformina (B) em íleo de rato. Escala: 10 mm = 3,9 mN.

No protocolo efectuado com estimulação eléctrica de campo, com o objectivo de activar intrinsecamente a componente neuronal do íleo, os segmentos foram suspensos entre eléctrodos de platina (*Panlab*) ligados a um estimulador eléctrico (*Grass SD9 Stimulator*). As curvas não cumulativas FR foram obtidas submetendo-se os segmentos a frequências crescentes de estimulação eléctrica de campo (EEC) de 1, 2, 4, 8 e 16 Hz (100 V de intensidade e 5 ms de duração do pulso). Na segunda curva, 15 minutos antes de cada frequência de estimulação, foram adicionados 36 μM de metformina, 300 μM de hexametónio

(antagonista dos receptores nicotínicos) e 1 μM de tetrodotoxina (TTX; uma neurotoxina bloqueadora dos canais de sódio sensíveis à voltagem).

Relativamente ao protocolo de estimulação química, 15 minutos antes de cada dose da segunda curva CR à metformina (1-36 μM), foram adicionados os seguintes compostos: 300 μM de hexametónio, 1 μM de TTX, 250 μM de N^G-nitro-L-arginina (L-NNA; um inibidor não selectivo da sintase do NO), 10 μM de atropina (antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos), 1 μM de mepiramina (antagonista/agonista inverso dos receptores H₁), 1 μM de metiotepina (antagonista dos receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇), 1 μM de SB 224289 (antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{1B}), 1 μM de ritanserina (antagonista não selectivo dos receptores 5-HT₂), 1 μM de cetanserina (antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2C}), 1 μM de MDL72222 (antagonista selectivo dos receptores 5-HT₃) ou 100 μM de reserpina (inibidor do transportador vesicular de monoaminas). Paralelamente, foram executadas curvas CR à 5-hidroxitriptamina (0,1-60 μM), na presença de 1 μM de cetanserina e 1 μM de ritanserina. De forma a estudar a contracção intestinal induzida pela metformina num modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2, foram executadas curvas CR à metformina e à 5-HT em segmentos de íleo de ratos GK machos, somente na ausência e na presença de 1 μM ritanserina. Após cada contracção, cada segmento foi lavado repetidas vezes até a preparação atingir a linha de base.

Em todas as experiências foram utilizados segmentos controlo, aos quais se adicionaram apenas os solventes apropriados para cada fármaco. Cada segmento serviu de controlo de si próprio: as respostas contrácteis da segunda curva CR/FR foram expressas em percentagem da contracção máxima obtida na primeira curva CR/FR do respectivo segmento (nem sempre com a última dose de metformina/frequência de estimulação), executada sempre na ausência de qualquer antagonista/inibidor/neurotoxina. Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta obtida nos segmentos controlo.

Os resultados foram igualmente analisados em mN de tensão, como forma de traduzir em valores absolutos a eficácia/actividade intrínseca ($E_{\text{máx}}$, efeito máximo) da metformina ou da 5-hidroxitriptamina em induzir contracção. A potência foi traduzida em termos de pEC₅₀ (logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pEC₅₀ foram obtidos por interpolação de cada curva não cumulativa concentração-resposta em escala semilogarítmica (% da contracção máxima versus logaritmo da concentração em mol/L), usando um programa de computador (Curve Expert, versão 1.4 para Windows).

3.4. Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais

Foram avaliadas as diferenças entre os valores de pEC₅₀ da primeira e segunda curvas concentração-resposta à metformina/5-HT, assim como as diferenças entre as respostas contrácteis induzidas por cada dose de metformina/5-HT na ausência (controlo) e na presença dos diferentes fármacos mencionados no ponto anterior. Para tal, foi utilizado o teste de *t* de *Student* para dados não emparelhados na determinação das diferenças estatísticas entre dois grupos de valores, enquanto que, para avaliar a significância das diferenças entre três ou mais grupos, foi utilizada a análise de variância (*Analysis of variance*, ANOVA), seguida do teste de *Dunnett* de comparações múltiplas (SPSS, versão 17.0 para Windows). Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de experiências (*n*) indicado.

3.5. 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: cloridrato de metformina, cloridrato de acetilcolina, maleato de mepiramina, cloreto de hexametónio, sulfato de atropina, cloridrato de 5-hidroxitriptamina, reserpina (Sigma-Aldrich, St Louis, E.U.A.), N^G-nitro-L-arginina, citrato de tetrodotoxina, tartarato de cetanserina, SB 224289, ritanserina, MDL 72222 (Tocris, Bristol, Reino Unido), mesilato de metiotepina (RBI, Natick, E.U.A.). As soluções foram preparadas com os solventes indicados pelos fabricantes.

3.6. Protocolos experimentais – técnicas de histologia e imunohistoquímica

3.6.1. Micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato

Com o objectivo de verificar a micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato Wistar e *Goto-Kakizaki*, foram realizados estudos histoquímicos (coloração com hematoxilina/eosina (HE) e PAS – *Periodic Acid Schiff*) e imunohistoquímicos, recorrendo a marcadores para células neuroendócrinas (enolase específica neuronal, *Neuronal Specific Enolase*, NSE).

Os segmentos de íleo foram isolados e fixados em formol neutro, tamponizado a pH 7,0 e processados de forma convencional, com posterior inclusão em parafina. Realizaram-se cortes histológicos de 3 µm de espessura que foram sujeitos inicialmente a coloração com HE.

Para a técnica PAS, os cortes foram lavados em água e oxidados em ácido periódico a 10%, durante 10 minutos. Seguidamente, foram lavados em água corrente durante 5 minutos e incubados com Reagente de Schiff durante 30 minutos. Após nova lavagem em água corrente (10 minutos), os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer durante 3 minutos e posteriormente azulados em água corrente. Finalmente, estes foram desidratados, clarificados e montados em Entellan.

Para os estudos imunohistoquímicos, após a aplicação do anticorpo primário anti-NSE, os cortes foram desparafinados, rehidratados (xilol, álcool absoluto, álcool a 95%) e lavados em água corrente. Procedeu-se à recuperação antigénica através de calor em tampão citrato (10 mM), pH 9,0 durante 25 minutos, a 97°C. Após lavagem com tampão Tris salino² (TBS), a peroxidase endógena foi inibida por incubação dos cortes em Envision Flex Peroxidase-Blocking (Dako, Denmark), durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente, estes foram lavados com TBS e incubados com o soro primário anti-NSE na diluição de 1:400 (DAKO, Denmark), durante 30 minutos, à temperatura ambiente e em câmara húmida. De seguida, os cortes foram lavados com TBS e incubados com soro secundário Envision Flex/HRP (Dako, Denmark), durante 30 minutos. Após a lavagem dos cortes com TBS 0,5 M, estes foram revelados através da solução de diaminobenzidina (DAB), durante 5 minutos. Para reforçar a revelação, este passo foi repetido. Depois de lavagem com água corrente, procedeu-se à coloração de contraste com hematoxilina de Gill, durante 3 minutos e azulou-se em água corrente durante 5 minutos. Por fim, efectuou-se a desidratação e montagem em meio sintético.

3.6.2. Localização celular dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A} em segmentos de íleo de rato Wistar

Para determinar a localização celular dos receptores dos subtipos 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}, depois dos cortes terem sido desparafinados, rehidratados e lavados em água corrente a peroxidase endógena foi inibida por incubação em H₂O₂ a 3%, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, efectuou-se a recuperação antigénica através de microondas, em tampão citrato de sódio (10mM) e a pH 6, durante 30

² TBS: Tris 200 mM, NaCl 1,37 M, pH 7,6

minutos, a 760 Watts. Depois do arrefecimento do tampão e de lavagem com tampão salino fosfato (*Phosphate Buffer Saline, PBS*)³, procedeu-se à incubação com os soros primários de anticorpos de cabra anti-receptor 5-HT_{1B}, anti-receptor 5-HT_{1D} e anti-receptor 5-HT_{2A} (Santa Cruz Biotechnology, California, E.U.A.), todos na diluição 1:10, durante 90 minutos, à temperatura ambiente e em câmara húmida. Seguidamente, os cortes foram lavados com PBS e, em vez de um anticorpo secundário, foi utilizado um polímero sintético anti-cabra ligado à peroxidase (Zymed, San Francisco, E.U.A.), o qual foi incubado durante 10 minutos, mediante as recomendações do fabricante. Lavou-se novamente com PBS e a revelação também foi levada a cabo com DAB, durante 5 minutos. Por fim, efectuou-se o contraste com hematoxilina de Mayer, azularam-se, desidrataram-se e montaram-se as lâminas em meio sintético.

3.7. Reagentes e materiais utilizados nos estudos histológicos e imunohistoquímicos

Anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{1B} de rato/humano, SC-1460, anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{1D} de rato/humano, SC-5393, anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{2A} de rato/humano, SC-32537 (Santa-Cruz Biotechnology Inc., California, E.U.A.); SuperPicture™ polymer detection system (Zymed, San Francisco, E.U.A.); diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, St Louis, E.U.A.); reagente de Schiff (Merck, Frankfurter, Alemanha); anticorpo monoclonal de ratinho anti-NSE humano/rato, DAKO-M0873, Envision Flex Peroxidase-Blocking, soro secundário Envision Flex/HRP (Dako, Dinamarca). Os restantes reagentes usados foram produtos *pro analysi* (Merck, Frankfurter, Alemanha).

³ PBS: Na₂HPO₄ 9,1mM, NaH₂PO₄ 1,7mM, NaCl 150mM, pH 7,4.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina

A metformina, testada em concentrações terapêuticas (1-36 μ M) (Brunton *et al.*, 2007), induziu contracções dependentes da concentração no íleo isolado de rato (gráfico da figura 4.1.). Tendo sido efectuadas duas curvas sucessivas não cumulativas CR à metformina, cujos parâmetros farmacológicos se encontram descritos na tabela I, não se observaram diferenças na potência da metformina (pEC_{50}) entre a primeira e a segunda curvas CR, observando-se, no entanto, um aumento significativo ($p=0,01$, teste t de *Student*) da eficácia da mesma, como o traduzem os valores de $E_{máx}$ da primeira curva ($E_{máx}$ 8,52 \pm 0,53 mN, n=56) e da segunda curva CR ($E_{máx}$ 12,20 \pm 0,80 mN, n=48).

Tabela II: Respostas contrácteis de segmentos de íleo de rato à metformina.

	$E_{máx}$ (mN)	n	pEC_{50}	n
1ª curva CR	8,52 \pm 0,53	56	4,93 \pm 0,06	40
2ª curva CR	12,20 \pm 0,80*	48	4,89 \pm 0,03	47

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

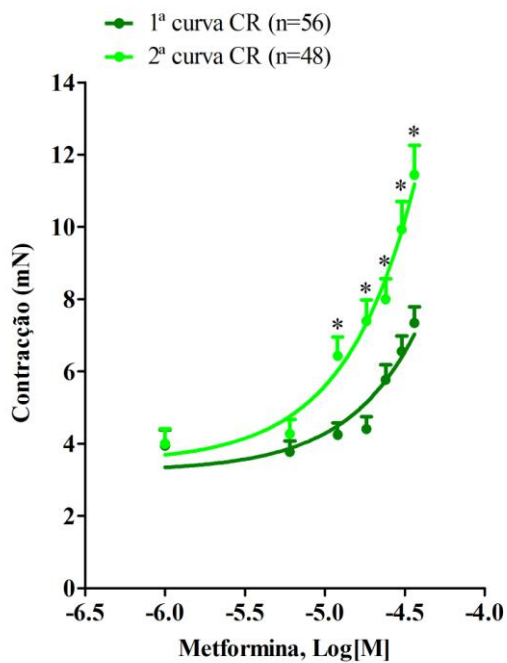


Figura 4.1. Respostas contrácteis do íleo de rato a duas curvas concentração-resposta (CR) sucessivas não cumulativas de metformina (●, 1ª curva CR; ●, 2ª curva CR); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs 1ª curva CR.

4.2. Efeito da tetrodotoxina e do hexametónio na resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo: validação do protocolo experimental

Com o intuito de validar o protocolo experimental no qual se induz a contracção do intestino com estimulação eléctrica de campo, começou-se por realizar curvas FR na ausência (controlo, n=10) e na presença de 300 μ M de hexametónio, um antagonista dos receptores nicotínicos dos gânglios autonómicos, em simultâneo com 1 μ M de TTX, uma neurotoxina que bloqueia os canais de sódio sensíveis à voltagem presentes nos neurónios entéricos (n=4). A incubação destes fármacos em simultâneo permite avaliar a contractilidade do músculo liso na ausência da influência neuronal. Na presença de hexametónio e de TTX, verificou-se uma redução estatisticamente significativa da curva FR controlo, com uma redução da resposta máxima de cerca de 81%, o que permitiu concluir que a contracção intestinal induzida por EEC resulta praticamente da activação da componente neuronal intrínseca do órgão.

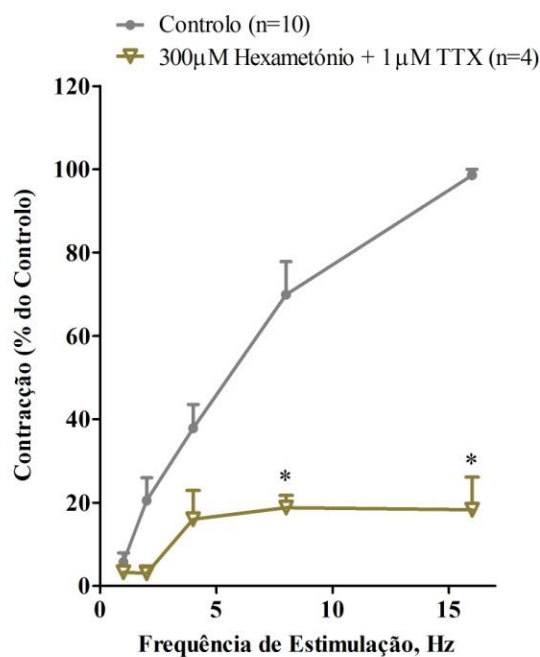


Figura 4.2. Resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo na ausência (●, controlo) e na presença de 300 μ M de hexametónio e 1 μ M de TTX (▽); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

4.3. Efeito da metformina na resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo

Com o intuito de avaliar se o mecanismo subjacente à contracção intestinal induzida pela metformina envolve ou não a componente neuronal do órgão, testou-se o efeito do fármaco na resposta contráctil intestinal à EEC. A metformina, utilizada na concentração de 36 μM ($n=10$), não alterou significativamente a curva FR controlo, o que sugere que o efeito contráctil da metformina não envolve a componente neuronal do órgão.

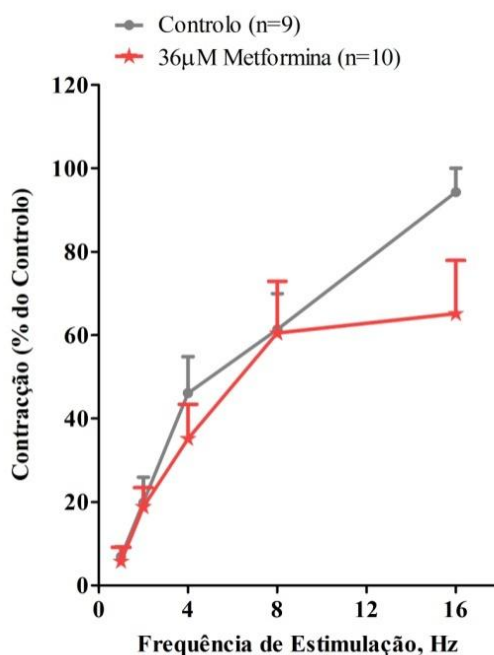


Figura 4.3. Resposta contráctil do íleo de rato à estimulação eléctrica de campo na ausência (●, controlo) e na presença de 36 μM de metformina (★); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

4.4. Efeito da tetrodotoxina e do hexametónio na resposta contráctil do íleo de rato à metformina

Para confirmar os resultados obtidos no ponto anterior, foram efectuadas curvas concentração-resposta à metformina na ausência (controlo, n=10) e na presença de 300 μ M de hexametónio em simultâneo com 1 μ M de TTX (n=10), com os quais não se observam alterações estatisticamente significativas na curva CR à metformina. Assim, e em concordância com os resultados anteriores, pode-se excluir o envolvimento de neurónios autonómicos, colinérgicos e não colinérgicos, no mecanismo de acção contráctil da metformina a nível intestinal.

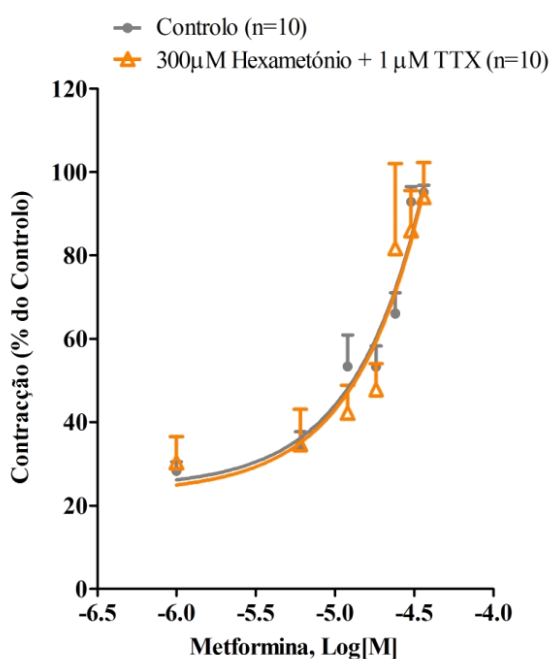


Figura 4.4. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 300 μ M de hexametónio e 1 μ M de TTX (△); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

4.5. Efeito da atropina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina

Os mecanismos colinérgicos desempenham um papel fundamental na regulação da motilidade intestinal, uma vez que a acetilcolina é um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso entérico. Assim, foram realizadas curvas CR à metformina na ausência (controlo, n=11) e na presença de 10 μ M de atropina (n=9), um antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos, com o qual não se verificaram alterações estatisticamente significativas da curva CR controlo. Deste modo, conclui-se que a resposta contráctil à metformina não é mediada por receptores muscarínicos, não havendo o envolvimento de mecanismos colinérgicos.

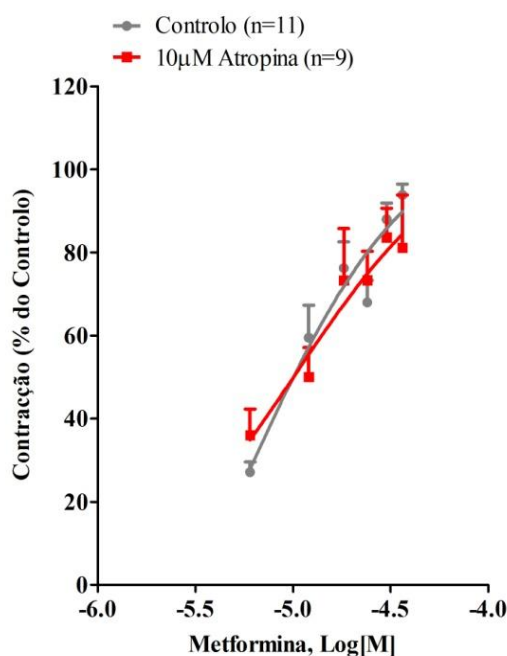


Figura 4.5. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 10 μ M de atropina (■); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

4.6. Efeito da N^G-nitro-L-arginina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina

Em concentrações terapêuticas, a metformina tem um efeito cardioprotector, pois promove a produção de NO por activação da sintase endotelial do NO (Calvert *et al.*, 2008). Tendo em conta este facto e devido ao efeito relaxante deste neurotransmissor na musculatura lisa, pretendeu-se avaliar se, no mecanismo de contracção intestinal induzido pela metformina, estaria envolvida a inibição da síntese do NO. Para tal, utilizou-se a N^G-nitro-L-arginina, um inibidor das três isoformas (endotelial, neuronal e indutível) da NOS, na concentração de 250 μ M (n=15), não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre as curvas efectuadas na presença e na ausência do inibidor enzimático. Deste modo, exclui-se a inibição da produção do NO como um mecanismo explicativo da acção da metformina a nível intestinal.

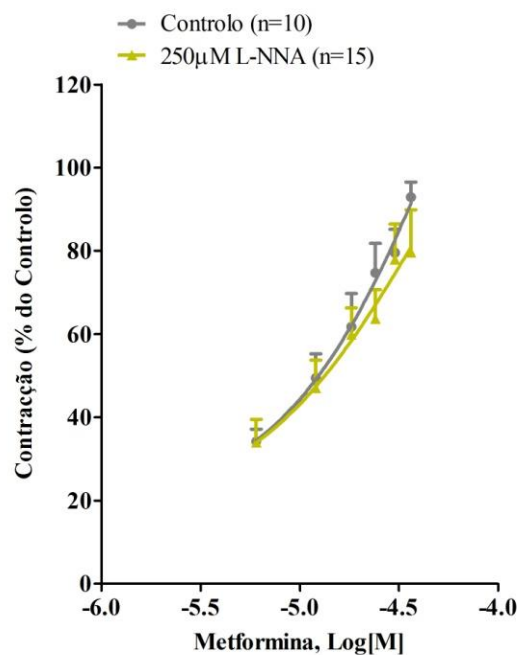


Figura 4.6. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 250 μ M N^G-nitro-L-arginina (▲, L-NNA); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

4.7. Efeito da mepiramina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina

Tendo em conta a função da histamina a nível intestinal, procedeu-se ao estudo do papel dos receptores histaminérgicos do tipo H_1 na actividade contráctil da metformina. Utilizou-se a mepiramina, antagonista/agonista inverso dos receptores H_1 , na concentração $1 \mu\text{M}$ ($n=8$), tendo-se verificado um antagonismo do tipo não competitivo com redução da resposta máxima em cerca de 41%, comprovando-se o envolvimento ou da histamina ou do mecanismo de tradução do sinal associado ao receptor H_1 , na resposta contráctil intestinal à metformina.

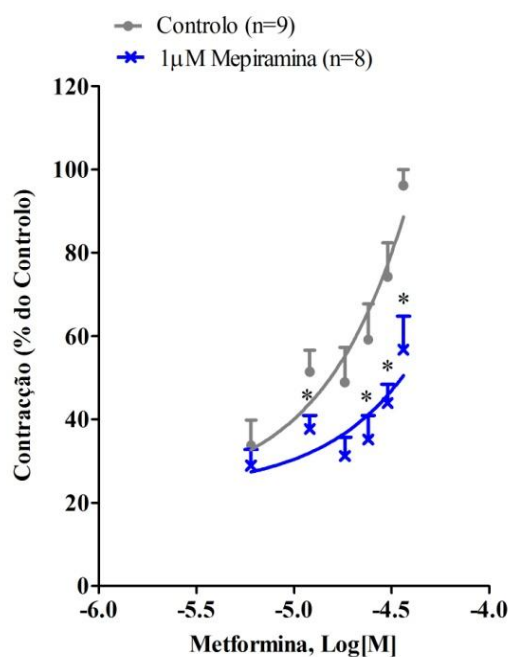


Figura 4.7. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de $1 \mu\text{M}$ de mepiramina (×); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

4.8. Efeitos do SB 224289, cetanserina, ritanserina, metiotepina e MDL 72222 na resposta contráctil do íleo de rato à metformina

A 5-HT tem um papel fundamental na regulação da actividade gastrointestinal. Como tal, com o fim de avaliar o possível envolvimento de receptores da 5-HT na resposta contráctil à metformina, foi inicialmente utilizada a metiotepina, um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT_{1/2/5/6/7} que, na concentração de 1 µM (n=13), bloqueou quase totalmente a contractilidade intestinal induzida pela metformina. Contudo, não foram observadas alterações significativas à curva CR à metformina na presença cetanserina (1 µM, n=6), um antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2C}, quer quando incubada isoladamente, quer quando incubada simultaneamente com SB 224289, um antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{1B}, (ambos na concentração de 1 µM, n=8); o MDL 72222 (1 µM, n=8), um antagonista selectivo dos receptores 5-HT₃, também não alterou significativamente a curva CR à metformina. A acção da ritanserina (1 µM, n=14), um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, na resposta contráctil intestinal à metformina, assemelha-se ao perfil de resposta observado com a metiotepina. Tanto a metiotepina como a ritanserina atenuaram significativamente a contracção máxima obtida com a metformina em cerca de 64,8%, e 67,8%, respectivamente, indicando um antagonismo do tipo não competitivo.

Em conclusão, os resultados obtidos neste grupo de experiências demonstram o envolvimento ou da 5-HT ou dos seus receptores no mecanismo de contracção intestinal induzido pela metformina, nomeadamente os receptores do subtipo 5-HT_{2B}.

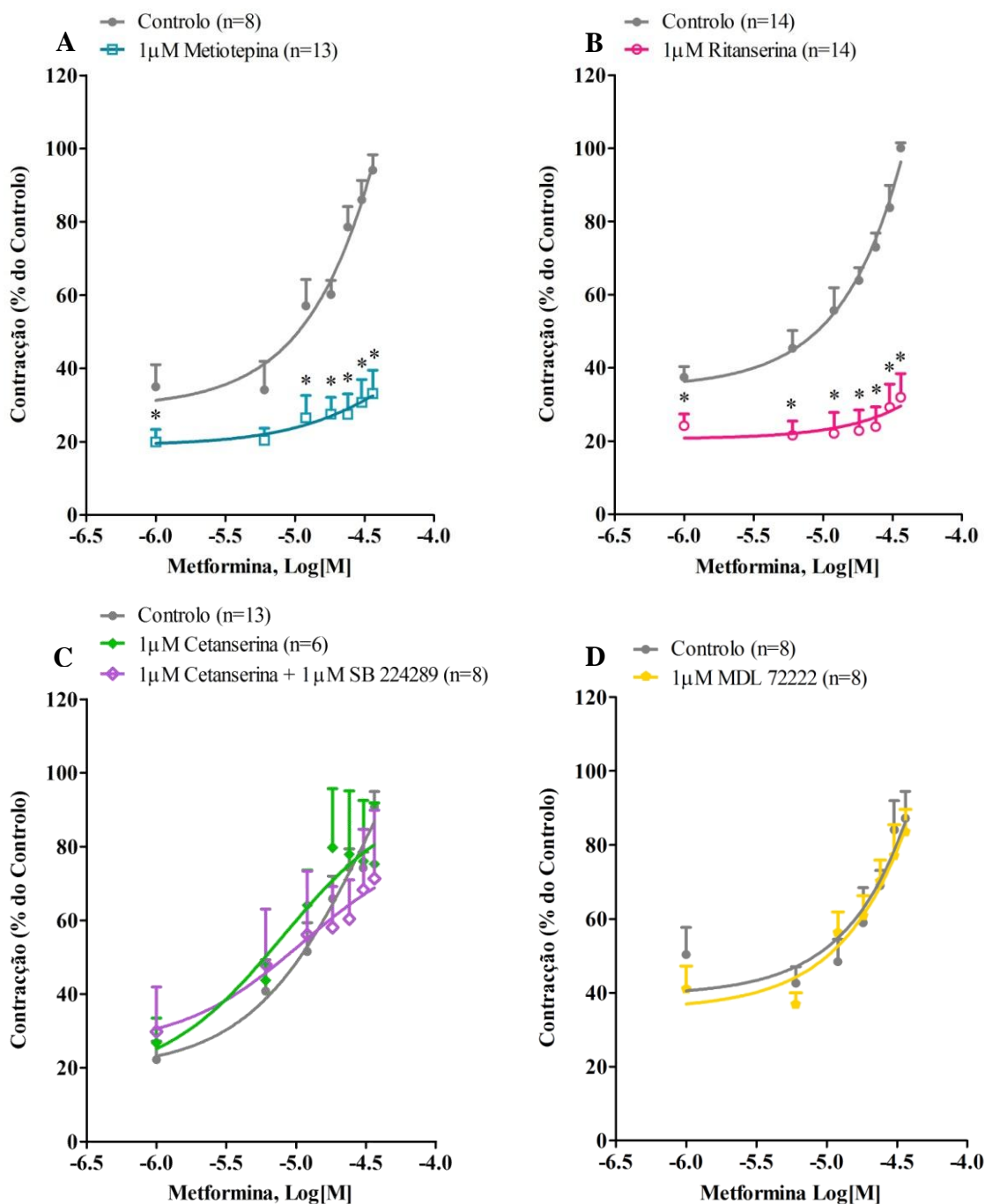


Figura 4.8. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina obtida na ausência (●, controlo) e na presença de: (A) 1 µM de metiotepina (□); (B) 1 µM de ritanserina (○); (C) 1 µM de cetanserina (◆) e 1 µM de cetanserina em simultâneo com 1 µM de SB 224289 (◇); (D) 1 µM de MDL 72222 (◆); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student (A, B, D) e pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnett* (C). * *p* < 0,05 vs controlo.

4.9. Efeito da cetanserina e/ou da ritanserina na resposta contráctil do íleo de rato Wistar à 5-HT: comparação com um modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2

Tendo em atenção o grupo de resultados que confirma o envolvimento da 5-HT na resposta contráctil de segmentos intestinais à metformina, pretendeu-se estudar a resposta contráctil dos mesmos à 5-HT exógena tanto na ausência como na presença da DT2. A 5-HT (0,1-60 μ M) induziu contracções dependentes da dose, tanto na ausência, como na presença da doença. Conforme demonstra a tabela II, entre animais controlo e animais diabéticos não se observaram diferenças significativas relativamente à eficácia e à potência da 5-HT.

Tabela III: Respostas contrácteis do íleo de ratos Wistar e de ratos *Goto-Kakizaki* à 5-HT.

	$E_{m\acute{a}x}$ (mN)	n	pEC_{50}	n
Ratos Wistar	15,91 \pm 2,13	14	5,57 \pm 0,21	12
Ratos GK	18,11 \pm 2,45	4	6,20 \pm 0,31	3

$E_{m\acute{a}x}$ = contracção máxima em mN de tensão; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contracção máxima; n= número de experiências; GK – *Goto-Kakizaki*; Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

Em ratos Wistar (grupo controlo, gráfico A da figura 4.9), testou-se o efeito da cetanserina (1 μ M; n=6) e da ritanserina (1 μ M, n=8), enquanto que em ratos GK (gráfico B da figura 4.9) testou-se apenas a acção da ritanserina (1 μ M, n=4). Como se constata no gráfico A da figura 4.9, a cetanserina não alterou a curva CR à 5-HT, excepto na última dose, enquanto a ritanserina antagonizou de forma não competitiva a resposta contráctil à 5-HT, com redução do efeito máximo em cerca de 62,4%. Na presença da patologia (gráfico B da figura 4.9), a acção da ritanserina foi semelhante à observada nos animais controlo, verificando-se uma redução da resposta máxima de cerca de 57,8%.

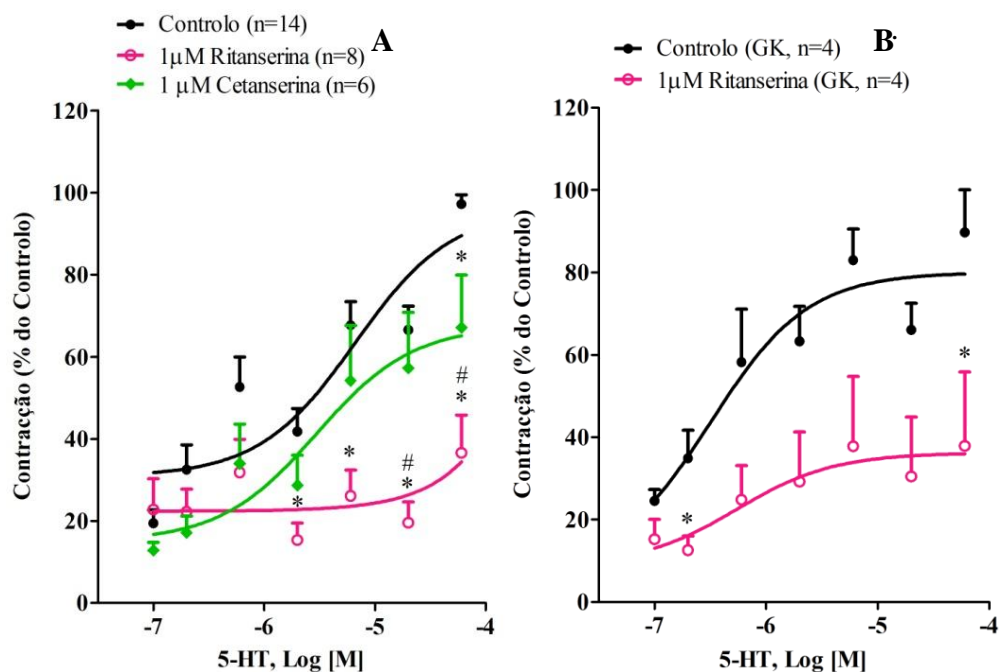


Figura 4.9. Resposta contráctil do íleo de rato à 5-HT obtida (A) num grupo controlo de ratos Wistar e (B) num grupo de ratos *Goto-Kakizaki* (GK). As respostas foram obtidas na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μM de cetanserina (◆) ou de 1 μM de ritanserina (○); os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* (A) e pelo teste *t* de *Student* (B). * $p < 0,05$ vs controlo; # $p < 0,05$ vs cetanserina.

Em conclusão, na sequência deste estudo comparativo entre ratos Wistar e ratos GK, com o qual se pretendeu estudar a resposta contráctil do intestino à 5-HT exógena, tanto na ausência como na presença da DT2, tendo em conta, por um lado, as diferenças estatisticamente significativas das acções da cetanserina e ritanserina e, por outro, as suas diferentes selectividades para os diversos subtipos de receptores 5-HT₂, concluiu-se serem os receptores 5-HT_{2B} os envolvidos na resposta contráctil à 5-HT, como já se tinha observado com a metformina. Além disso, a acção pós-sináptica da 5-HT parece não se alterar sob influência da doença, já que o efeito da ritanserina, em ambas as condições, é idêntico.

4.10. Resposta contráctil do íleo de rato *Goto-Kakizaki*, um modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2, à metformina: comparação com ratos Wistar controlo

A metformina, testada em concentrações terapêuticas (1-36 μ M), induziu contracções dependentes da concentração no íleo isolado de rato *Goto-Kakizaki* (gráfico da figura 4.10). Tendo sido efectuadas duas curvas sucessivas não cumulativas CR à metformina, cujos parâmetros farmacológicos se encontram descritos na tabela III, não se observaram diferenças na eficácia ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pEC_{50}) da metformina entre a primeira e a segunda curva CR.

Tabela IV: Respostas contrácteis do íleo de rato *Goto-Kakizaki* à metformina.

	$E_{m\acute{a}x}$ (mN)	n	pEC_{50}	n
1ª curva CR	7,21 \pm 1,20	8	4,95 \pm 0,71	4
2ª curva CR	7,34 \pm 0,91	8	4,91 \pm 0,09	6

$E_{m\acute{a}x}$ = contracção máxima em mN de tensão; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de metformina capaz de induzir metade da contracção máxima; n= número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.

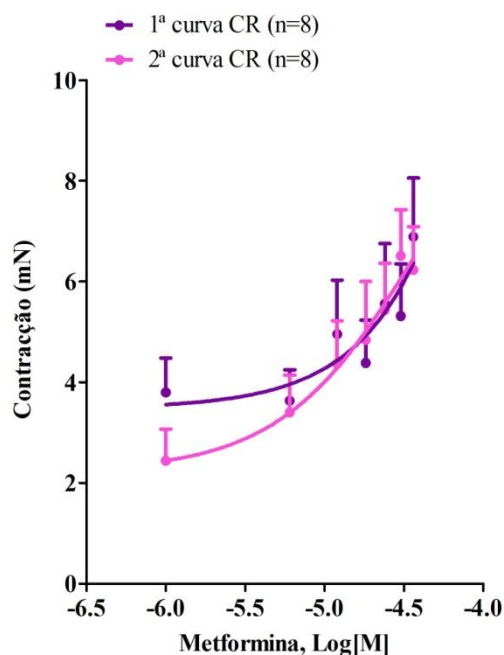


Figura 4.10. Respostas contrácteis do fêeo de ratos *Goto-Kakizaki* a duas curvas concentração-resposta (CR) sucessivas não cumulativas de metformina (●, 1ª curva CR; ●, 2ª curva CR); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.

Conforme demonstra a tabela IV, entre animais controlo e animais diabéticos, observaram-se diferenças significativas relativamente à eficácia da metformina, tendo esta sido mais eficaz em induzir contração em ratos Wistar do que em ratos GK, quando comparadas as segundas curvas CR.

Tabela V: Respostas contrácteis do fêeo de ratos Wistar e *Goto-Kakizaki* à metformina.

	$E_{m\acute{a}x}$ (mN)	n	pEC_{50}	n
Ratos Wistar	12,20 \pm 0,80	48	4,89 \pm 0,03	47
Ratos GK	7,34 \pm 0,91*	8	4,91 \pm 0,09	6

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

* $p < 0,05$ vs ratos Wistar.

4.11. Efeito da reserpina na resposta contráctil do íleo de rato Wistar à metformina

Cerca de 90% da serotonina é sintetizada, armazenada e libertada pelas células enterocromafins localizadas na parede intestinal (Barter e Pearse, 1953). Deste modo, pareceu relevante avaliar a influência das mesmas, nomeadamente, do seu conteúdo em 5-HT, na contractilidade intestinal induzida pela metformina. Assim, foram efectuadas curvas CR à metformina na ausência (controlo, n=8) e na presença de 100 μ M de reserpina (n=8), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, cujo efeito se traduz na depleção do *pool* vesicular das células EC. A acção da reserpina bloqueou a resposta contráctil à metformina em cerca de 73,4%, observando-se diferenças estatisticamente significativas em todas as doses da curva CR, excepto na primeira. Desta forma, conclui-se que o fármaco em estudo provoca contracção intestinal indirectamente através da actuação da 5-HT em receptores 5-HT_{2B} presentes nas células musculares lisas, após induzir a libertação do neurotransmissor a partir das células enterocromafins.

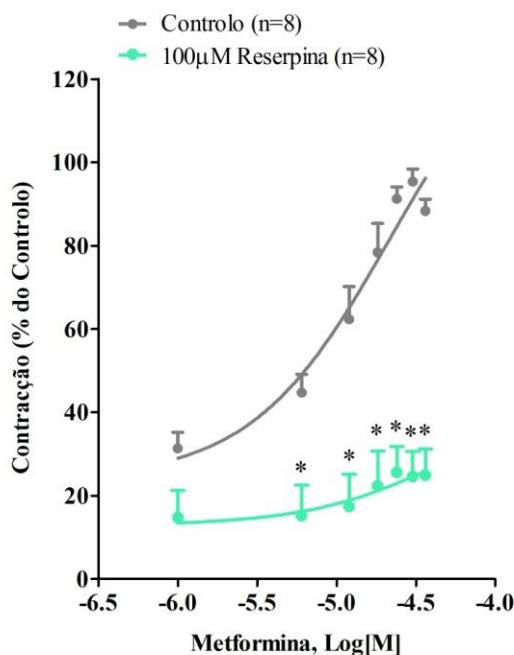


Figura 4.11. Resposta contráctil do íleo de rato à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 100 μ M de reserpina (●); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

4.12. Efeito da ritanserina na resposta contráctil do íleo de rato à metformina, num modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2

Tendo em conta os resultados dos estudos funcionais referidos no ponto anterior, pretendeu-se estudar a acção da ritanserina na resposta contráctil à metformina do íleo de ratos *Goto-Kakizaki*, um modelo animal de DT2. Assim, foram efectuadas curvas CR à metformina na ausência (controlo, n=8) e na presença de 1 μ M de ritanserina (n=8), em que se verificaram diferenças estatisticamente significativas apenas na última dose, tendo o $E_{m\acute{a}x}$ sido observado na penúltima dose. Por comparação com a situação controlo representada no gráfico B da figura 4.8., conclui-se que, na presença da doença, há um comprometimento da acção da 5-HT libertada pelas células EC que medeia a resposta contráctil intestinal induzida pela metformina. Isto é reforçado ao comparar a diminuição da eficácia da metformina nos ratos GK relativamente aos ratos Wistar controlo.

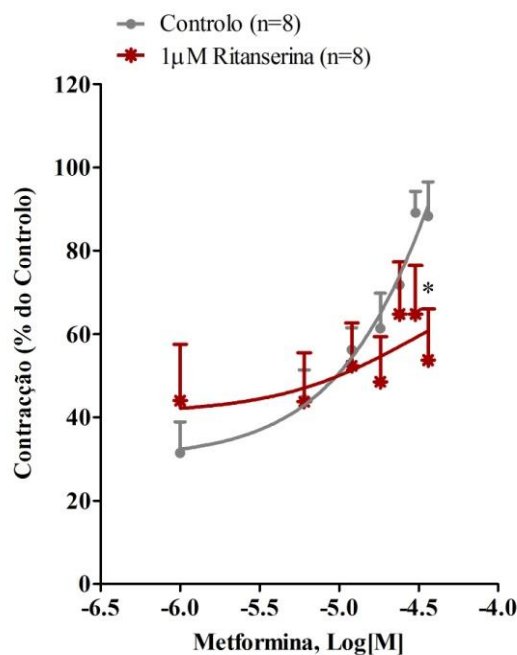


Figura 4.12. Resposta contráctil do íleo de ratos *Goto-Kakizaki* à metformina na ausência (●, controlo) e na presença de 1 μ M de ritanserina (*); os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student* * $p < 0,05$ vs controlo.

4.13. Estudos histológicos e imunohistoquímicos dos segmentos de íleo de rato Wistar e *Goto-Kakizaki*

Nas figuras 4.13.-4.20., são apresentadas secções representativas de segmentos de íleo de ratos Wistar e *Goto-Kakizaki*, que foram submetidas a técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas. A imunoreactividade foi detectada usando a diaminobenzidina que confere a coloração laranja/castanha enquanto que a hematoxilina foi utilizada como coloração de contraste para detectar os núcleos celulares que coram de púrpura. O padrão de imunoreactividade foi consistente em todas as secções obtidas do número de amostras colhidas para estudo (4 ratos Wistar e 4 ratos GK).

A morfologia demonstrada pela HE caracterizou as camadas musculares lisas circulares e longitudinais, bem como as células ganglionares poliédricas dos plexos mientérico e submucoso localizados entre as camadas musculares que fazem parte da constituição da parede intestinal. Nos segmentos de íleo de animais diabéticos (GK) comparativamente aos animais controlo (Wistar), a coloração HE demonstrou um espessamento nítido da parede de vasos sanguíneos, revelador de microangiopatia diabética. No entanto, a coloração PAS (cujo controlo positivo são as células caliciformes da mucosa) não demonstrou a presença de depósitos de glicogénio na membrana basal dos rolos vasculonervosos, tanto nos ratos Wistar, como nos ratos GK, continuando a ser observável o referido espessamento. As células musculares lisas da camada circular apresentaram ainda imunoreactividade à NSE, denunciando por isso actividade neuroendócrina, que é mais pronunciada na presença da patologia.

Como controlos positivos das restantes marcações por imunohistoquímica, nomeadamente dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}, foram utilizadas preparações sugeridas pelo fabricante, nomeadamente cérebro de rato para o anticorpo contra os receptores 5-HT_{1B} e células musculares lisas vasculares para o anticorpo contra o receptor 5-HT_{2A} e cujos resultados estão patentes na figura 4.17.

Relativamente à localização celular dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}, apenas se verificou imunoreactividade ao receptor 5-HT_{2A} em células ganglionares do plexo mientérico da parede intestinal de íleo isolado de rato Wistar.

4.13.1. Micro-anatomia dos segmentos de íleo de rato

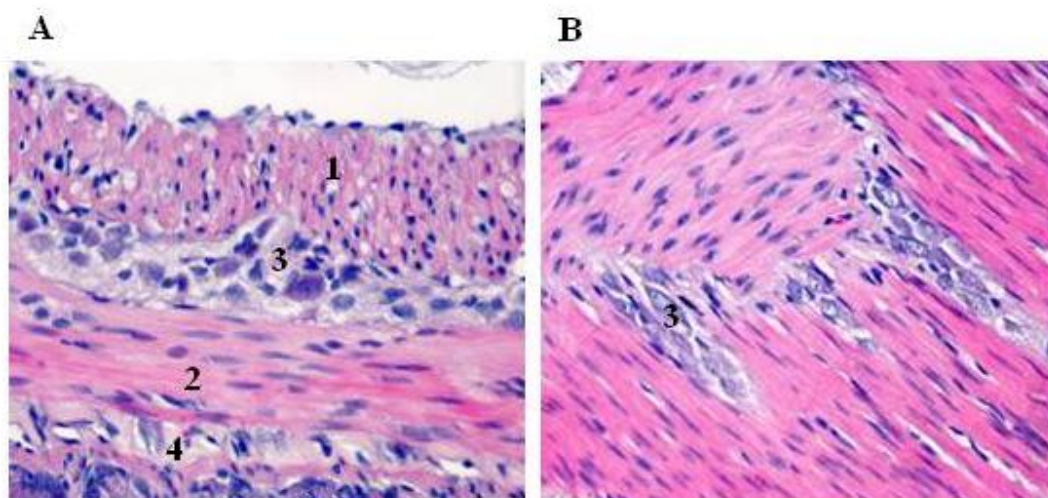


Figura 4.13. Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. H/E X400. Visualização das camadas de músculo liso longitudinal (1) e circular (2) e dos plexos mientérico (3) e submucoso (4).

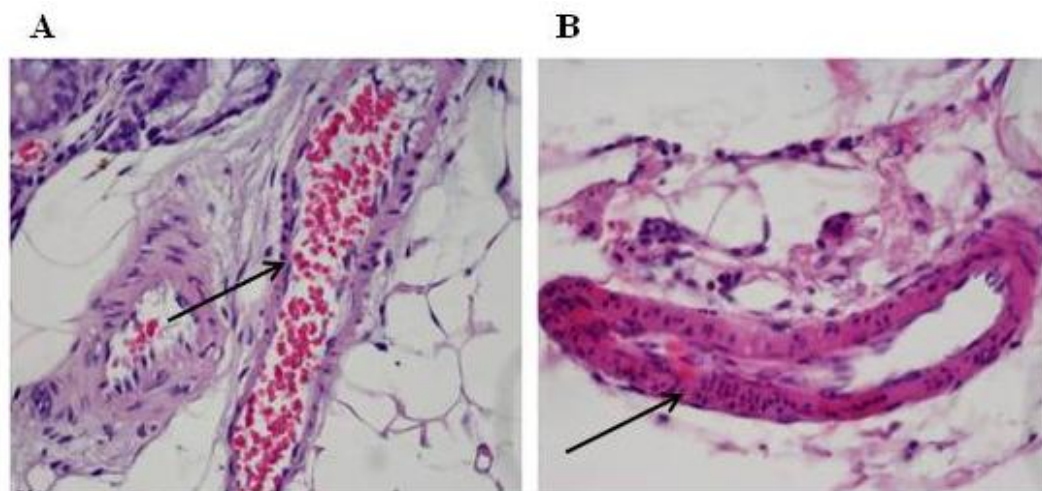


Figura 4.14. Íleo de rato Wistar (A, macho, 9 semanas) e GK (B, macho, 9 semanas). H/E X400. Visualização do espessamento da parede do vaso sanguíneo no caso B comparativamente ao caso A (setas).

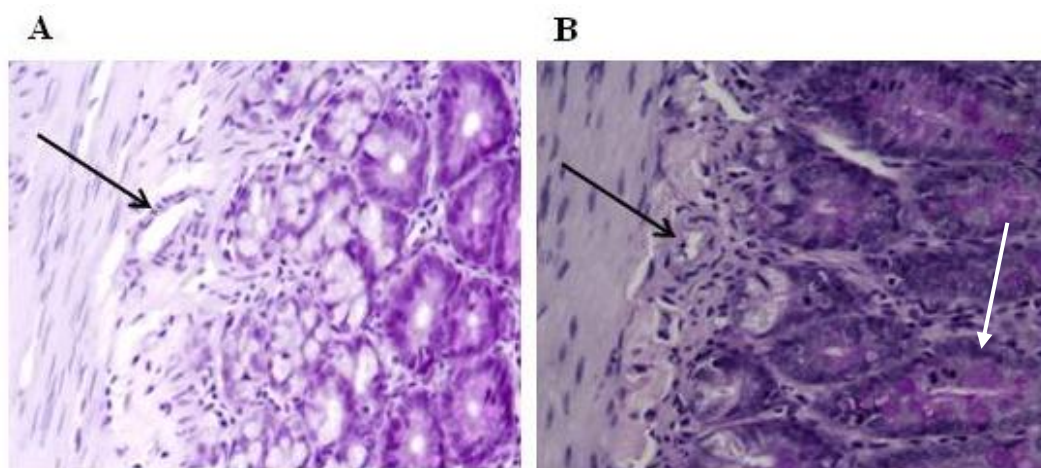


Figura 4.15. Íleo de rato Wistar (**A**, macho, 9 semanas) e GK (**B**, macho, 9 semanas). Técnica de histoquímica – PAS X400. Visualização do espessamento de um vaso sanguíneo no caso B comparativamente ao caso A (setas a preto), com ausência de marcação de glicogénio em ambos os casos. Controlo interno positivo da coloração PAS: células caliciformes de cor púrpura (seta branca).

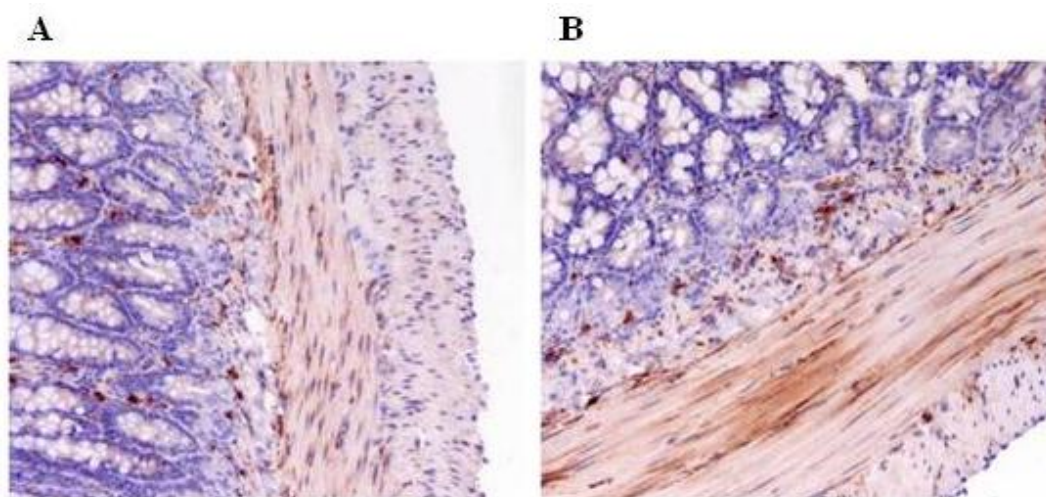


Figura 4.16. Íleo de rato Wistar (**A**, macho, 9 semanas) e GK (**B**, macho, 9 semanas). Técnica de imunohistoquímica – NSE X200. Visualização de marcação a castanho nas células musculares lisas da camada circular, indicativo das características neuroendócrinas das mesmas.

4.13.2. Localização celular dos receptores dos subtipos 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A} em segmentos de íleo de rato Wistar

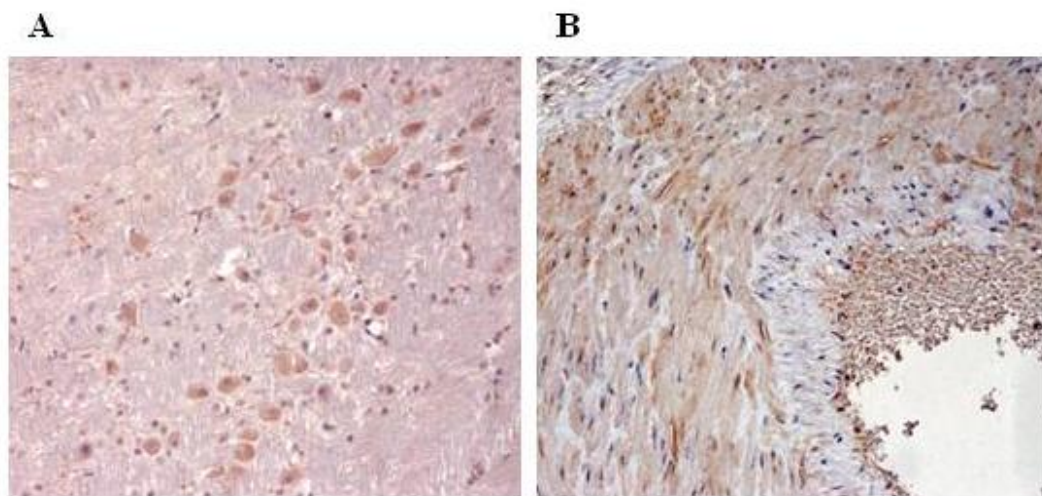


Figura 4.17. Cérebro de rato Wistar (A) e artéria uterina humana (B). Técnica de imunohistoquímica: imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1B} X200 (diluição 1:25) (A) e 5-HT_{2A} X200 (diluição 1:10) (B), em neurónios e células musculares lisas vasculares, respectivamente.

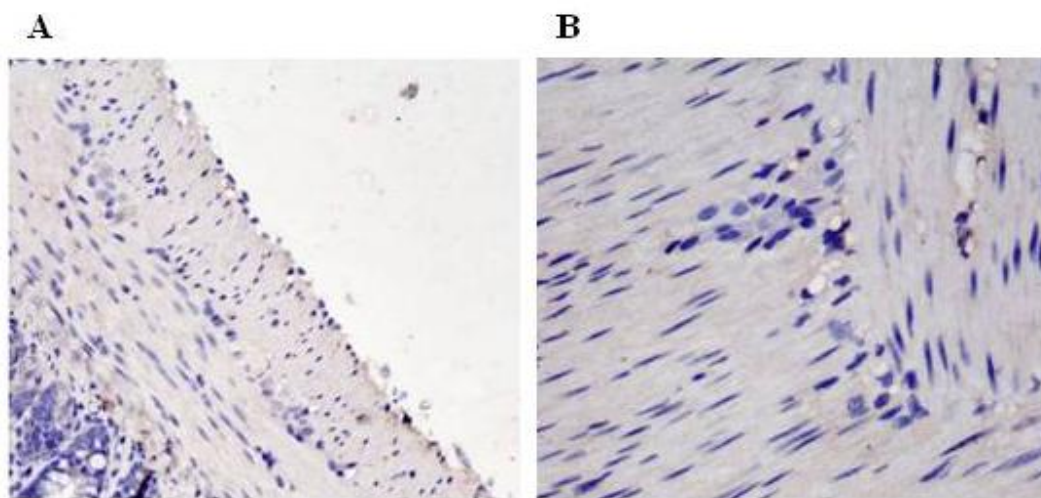


Figura 4.18. Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. Técnica de imunohistoquímica: ausência de imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1B} X200 e X400, respectivamente (diluição 1:10).

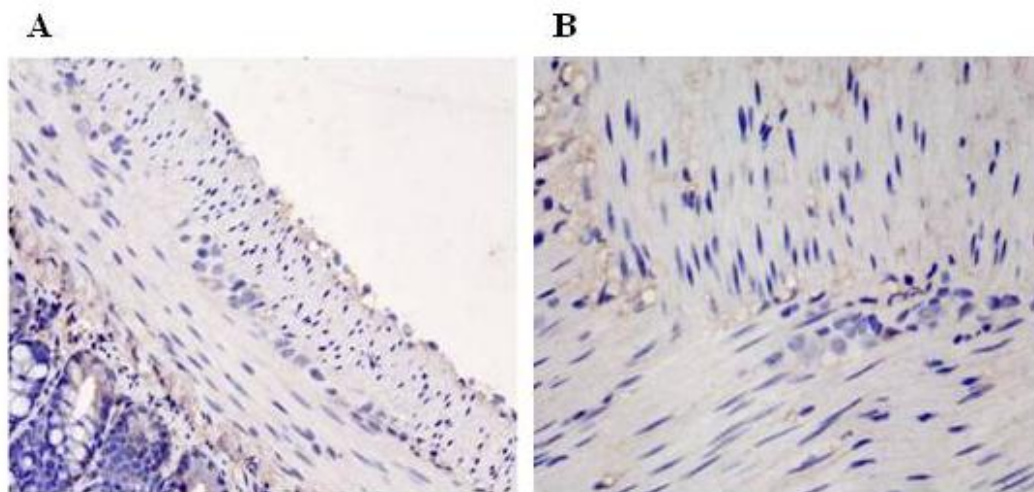


Figura 4.19. Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. Técnica de imunohistoquímica: ausência de imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1D} X200 e X400, respectivamente (diluição 1:10).

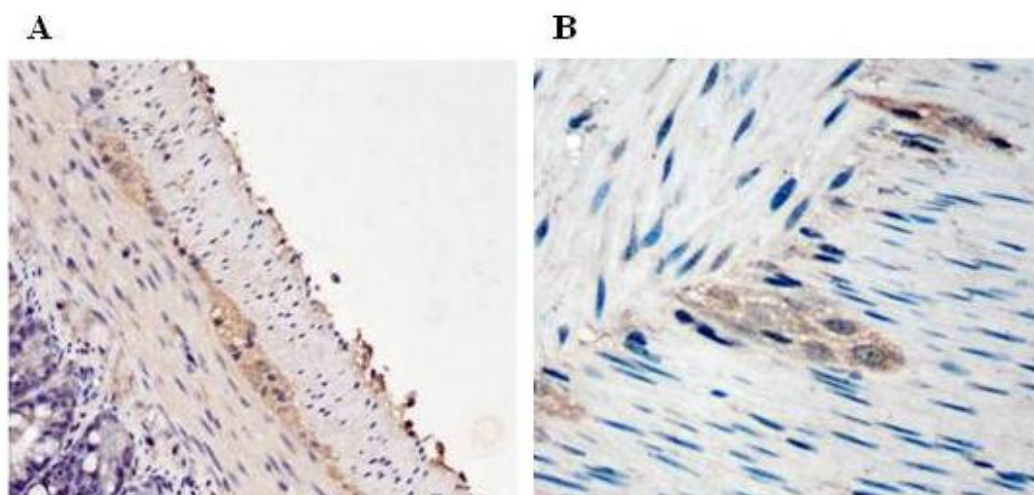


Figura 4.20. Íleo de ratos Wistar machos (A e B) de 9 semanas. Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{2A} X200 e X400, respectivamente (diluição 1:10) presente nas células ganglionares situadas no plexo mientérico da parede intestinal (setas).

Capítulo 5

Discussão

Discussão

Os estudos funcionais de contracção de músculo liso de órgãos isolados realizados tiveram como objectivo a investigação dos mecanismos farmacológicos subjacentes ao efeito da metformina a nível intestinal. Tendo em atenção os sintomas GI associados à toma de metformina, nomeadamente a elevada incidência de diarreia em doentes diabéticos, elaborou-se uma estratégia metodológica para a identificação desses mesmos mecanismos, que foi sendo construída à medida dos resultados obtidos em cada protocolo experimental.

A vantagem dos estudos farmacológicos *in vitro*, comparativamente com os estudos *in vivo*, prende-se, por um lado, com a manipulação da concentração efectiva do fármaco no intestino e, por outro, com a simplicidade da quantificação da resposta do órgão. Os animais foram sacrificados por decapitação, no sentido de evitar a possível interferência de substâncias anestésicas na contractilidade do órgão. A preparação biológica utilizada como modelo experimental *in vitro* para o estudo dos sintomas gastrointestinais associados à metformina foi o íleo de rato, isto é, a porção de intestino com maior reactividade farmacológica. Neste estudo, foram efectuadas curvas CR de adições independentes, uma vez que ensaios preliminares revelaram que a contracção induzida pela metformina é uma contracção tipicamente fásica, não apresentando um *plateau* estável que permita a adição sucessiva de doses, de modo a construir-se uma curva CR cumulativa. Do mesmo modo, cada uma das diferentes frequências de estimulação eléctrica foi efectuada de forma independente para evitar o esgotamento e a danificação do órgão, com intervalos de 15 minutos entre cada estimulação. As diferentes concentrações de metformina, utilizadas para a realização das curvas CR, foram estabelecidas de acordo com as concentrações plasmáticas do fármaco obtidas com as doses diárias utilizadas na prática clínica que variam de 0,5 a 3 g. Assim, a metformina foi testada em concentrações que variaram entre 1 e 36 μM (Brunton *et al.*, 2007).

Tanto a metformina (1-36 μM) como a 5-HT (0,1-60 μM) induziram contracções dependentes da concentração em segmentos de íleo de ratos Wistar controlo e ratos GK diabéticos (tabelas II e IV). Os estudos histoquímicos e imunohistoquímicos revelaram que o íleo dos dois grupos de animais apresentava características morfológicas idênticas, apesar de se observarem perturbações vasculares e neuroendócrinas em ratos GK, o que confirma a presença da doença nestes animais tidos como um modelo de DT2 não obesos. No que diz respeito aos parâmetros farmacológicos, verificou-se um aumento da eficácia do fármaco ao

longo do tempo, sem alterações relativas à potência. De facto, ao longo de duas curvas CR sucessivas, observou-se um aumento significativo dos valores de $E_{máx}$ sem alterações do pEC_{50} . Como o perfil de acção ao fármaco se revelou mais eficaz na segunda curva CR, foram posteriormente sempre executadas duas curvas CR à metformina, e cuja incubação dos diferentes antagonistas/inibidores/bloqueadores decorreu 15 minutos antes de cada dose da segunda curva CR. Em relação à resposta contráctil do órgão à 5-HT exógena ($E_{máx}$: $15,91 \pm 2,13$, $n=14$; pEC_{50} : $5,57 \pm 0,21$, $n=12$), verificou-se que esta foi mais eficaz e potente que a metformina ($E_{máx}$: $8,52 \pm 0,53$, $n=56$; pEC_{50} : $4,93 \pm 0,06$, $n=40$) ($p=0,00$ e $p=0,01$), quando comparamos primeiras curvas CR. De salientar que o $E_{máx}$ foi calculado como a média das respostas máximas de cada um dos segmentos de íleo à metformina uma vez que, em curvas de adições independentes, a resposta máxima nem sempre é obtida na última dose de metformina. Neste ponto, os nossos resultados permitem reforçar a ideia descrita na literatura: a associação do fármaco à diarreia. A contracção dose-dependente induzida pela metformina nos segmentos de íleo de rato, assim como o aumento da resposta contráctil do órgão ao longo do tempo justificam, não só o aumento da motilidade intestinal, que pode ser subjacente a esse sintoma, como também o agravamento desse sintoma em doses terapêuticas sucessivas ou mais elevadas.

No sentido de perceber se o mecanismo de acção da metformina tem ou não uma componente neuronal, utilizou-se a estimulação eléctrica de campo como ferramenta de activação da inervação intrínseca dos segmentos de íleo, já que esta induz a despolarização dos neurónios, estimulando-os à libertação de neurotransmissores.

A TTX, uma neurotoxina que bloqueia os canais de sódio sensíveis à voltagem presentes nos neurónios entéricos, permitiu a avaliação da contracção do músculo liso na ausência da influência neuronal. Por outro lado, o hexametónio, um antagonista dos receptores nicotínicos dos gânglios autonómicos, foi incubado em simultâneo para garantir a ausência da influência da acetilcolina, principal neurotransmissor excitatório do SNE, pois a transmissão colinérgica está implicada no controlo das vias nervosas que regulam a motilidade GI e, por conseguinte, na modulação da libertação neuronal de acetilcolina e outras substâncias neuronais que contribuem em larga escala para a contracção intestinal (Olsson e Holmgren, 2001). Além disso, a TTX apenas bloqueia a actividade nervosa dependente da despolarização, não impedindo a libertação das reservas vesiculares neuronais, nas quais a acetilcolina poderá estar presente, decorrente da activação de receptores.

Com o intuito de validar o protocolo experimental no qual se induz a contracção do intestino com EEC, realizaram-se curvas FR na presença de hexametónio e de TTX. A redução de cerca de 81% da resposta contráctil do órgão permite concluir que grande parte da contracção do íleo é mediada por substâncias libertadas a partir dos terminais nervosos, em que a contracção residual observada traduz a componente mediada por substâncias de origem não neuronal. Em suma, a EEC activa eficazmente a componente nervosa intrínseca das preparações intestinais utilizadas neste estudo.

Posteriormente, testou-se o efeito da metformina (36 μM) na resposta contráctil do íleo à EEC. A não alteração da curva FR pelo fármaco sugere um mecanismo intestinal independente da mediação neuronal. Estes resultados foram corroborados pelos estudos em que se induziu a contracção intestinal por estimulação química: não foram observadas alterações das curvas CR à metformina na presença da combinação de hexametónio e TTX. Uma vez inibida a componente neuronal, inferiu-se que a contracção do órgão desencadeada pela metformina se devia ou ao efeito que esta exerce a nível pós-sináptico, isto é, nas células musculares lisas das camadas musculares longitudinal e circular responsáveis pela motilidade intestinal, ou à libertação de substâncias de origem não neuronal.

Relembrando os mecanismos subjacentes à contracção intestinal detalhados na introdução, considerou-se a hipótese do reforço da acção da acetilcolina a nível pós-sináptico por parte do fármaco em estudo. No tracto gastrointestinal, os vários tipos de receptores muscarínicos estão localizados em neurónios (M_1 e M_4) e nas células musculares lisas (M_2 e M_3), mediando processos como a contracção muscular e a secreção intestinal (Tobin *et al.*, 2009). Uma vez que a atropina é um antagonista não selectivo dos receptores muscarínicos, a sua utilização permitiu bloquear a acção de toda a população dos mesmos, existente nas preparações de íleo de rato. O facto de a atropina não ter alterado as curvas CR à metformina excluiu o envolvimento de receptores muscarínicos no mecanismo contráctil do fármaco. Assim, e tendo em conta os resultados descritos no parágrafo anterior, podemos excluir a componente colinérgica do mecanismo de acção intestinal da metformina.

Achou-se também necessário o despiste da interacção da metformina com a NOS, uma vez que o fármaco oferece protecção cardiovascular, estimulando a acção da isoforma endotelial desta enzima e contribuindo para um dos principais benefícios da terapêutica com metformina, nomeadamente a redução do risco cardiovascular associado à DT2 (Calvert *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2006). No tracto GI, a origem do NO é maioritariamente neuronal, sendo

produzido pelos neurónios do plexo mientérico (Martín *et al.*, 2001). Para além das fibras nervosas entéricas, as células intersticiais de Cajal bem como as células musculares lisas demonstram imunoreactividade à NOS (Teng *et al.*, 1998; Xue *et al.*, 1994). Deste modo, avaliou-se a interferência da metformina com a NOS. Contudo, relativamente à motilidade intestinal, o NO exerce um efeito inibitório nas células musculares lisas, provocando o seu relaxamento, pelo que a contracção induzida pela metformina teria que ser resultado de um efeito inibitório na enzima. Assim, as três isoformas da NOS foram inibidas através da L-NNA. A literatura sugere uma dependência temporal de inibição enzimática que pode variar sendo que, para estudos *in vivo*, é aconselhada uma pré-incubação superior a 30 minutos, enquanto que para estudos *in vitro* são recomendados 15 minutos de incubação, de modo a garantir a inibição das três isoformas (Alderton *et al.*, 2001). Neste estudo, a L-NNA foi adicionada aos banhos de órgãos 15 minutos antes de cada dose da curva CR de metformina, pelo que se assume a inibição eficaz das isoformas enzimáticas. Uma vez que não se observaram diferenças significativas entre as curvas CR à metformina na ausência e na presença do inibidor enzimático, o mecanismo de contracção intestinal do fármaco não envolve o NO.

A interferência da metformina na componente histaminérgica intestinal também foi estudada. Apesar de em intestino de rato estarem descritos outros tipos de receptores histaminérgicos, analisou-se apenas o papel dos receptores H₁, uma vez que estão localizados nas células de músculo liso e medeiam a sua contracção (Chang *et al.*, 1979). Assim foram efectuadas curvas CR, na presença e na ausência de mepiramina, tendo-se observado um bloqueio significativo de cerca 41% da resposta contráctil, o que permitiu sugerir o envolvimento dos receptores H₁ no mecanismo da metformina. A mepiramina é classificada tradicionalmente como o antagonista dos receptores histaminérgicos H₁, sendo o ligando de referência utilizado na caracterização farmacológica dos mesmos. Contudo, foi recentemente reclassificada como um agonista inverso devido à sua actividade intrínseca negativa nos receptores H₁ humanos expressos em células COS-7 (Bakker *et al.*, 2000) e que se caracteriza pela sua capacidade em reduzir a actividade basal constitutiva do receptor. Os receptores de histamina do tipo 1 são receptores metabotrópicos transmembranares associados a proteínas G_{q/11} activadoras da fosfolipase C, a qual converte o PIP₂ em IP₃ e DAG. Verificou-se que a mepiramina se liga com elevada afinidade ao receptor, que se encontra na sua forma inactiva, promovendo o acoplamento da proteína G ao receptor H₁ e reduzindo assim a disponibilidade celular de proteínas G_{q/11}. Deste modo, a mepiramina pode influenciar outros receptores que

partilhem a mesma via de transdução de sinal, isto é, as proteínas $G_{q/11}$, como é caso dos receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, 5-HT₅, M_{1/3/5}, α_1 , H_{1/2} e receptores de ATP. De facto, a mepiramina poderá estar a interferir com a activação de um subtipo de receptores 5-HT₂ que poderão ser os mediadores da resposta contráctil à metformina nas preparações de íleo de rato, face aos resultados apresentados e discutidos mais adiante. Para além disso, Fitzsimons e colaboradores (2004) observaram que a mepiramina diminui os níveis basais de Ca^{2+} intracelular. As suas conclusões demonstram que a mepiramina interfere com o mecanismo de contracção do músculo liso, já que este é um processo altamente dependente da elevação de Ca^{2+} intracelular. Nesse sentido, a alteração significativa da curva CR à metformina, observada na presença da mepiramina, pode ser resultante ou da interferência da mepiramina no mecanismo de transdução de sinal associado à activação de outros receptores que o partilhem, ou da inibição da contracção muscular e não propriamente porque são receptores H₁ os mediadores da resposta contráctil à metformina.

Sabendo que a actividade intestinal apresenta uma vasta componente serotoninérgica, tornou-se obrigatório estudar o envolvimento da 5-HT na resposta contráctil intestinal à metformina. Tendo em conta a distribuição dos tipos de receptores de 5-HT, descritos em intestino de rato, partiu-se de um antagonista não selectivo para vários tipos de receptores que nos permitisse, de um modo geral, avaliar a participação da 5-HT no perfil de contracção intestinal da metformina. A metiotepina é um antagonista não selectivo dos receptores 5-HT_{1/2/5/6/7}, tendo reduzido a resposta máxima da metformina em 64,8%, o que demonstra efectivamente a participação de receptores serotoninérgicos no mecanismo intestinal do fármaco. Direcionou-se então o estudo para a caracterização farmacológica do tipo/subtipo de receptor que pode estar a mediar esse efeito, recorrendo-se a antagonistas selectivos dos receptores descritos no tracto GI de rato, conforme consta na tabela I do capítulo 1. De referir que os recursos disponíveis para a realização do presente estudo não permitiram fazer um *screening* mais pormenorizado, pelo que nos restringimos somente à utilização de antagonistas dos receptores descritos no intestino e dos considerados mediadores da contracção. Deste modo, excluíram-se os receptores 5-HT₅ e 5-HT₆ e os receptores 5-HT₄ e os 5-HT₇, os primeiros por não estarem descritos no tracto GI, e os segundos por mediar o relaxamento intestinal. Assim, avaliámos a intervenção de receptores 5-HT_{1B}, 5-HT₂ e 5-HT₃ na resposta contráctil à metformina através de estudos funcionais, bem como a imunoreactividade aos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A}, através de estudos

imunohistoquímicos ao dispormos apenas de anticorpos específicos para os mesmos, não tendo sido possível a aquisição de outros.

No que diz respeito aos receptores do tipo 1, e tendo presente que os receptores do subtipo 5-HT_{1B} estão associados à contracção muscular, foi utilizado o antagonista SB 224289 na concentração de 1 μM, a qual apresenta maior selectividade para receptores 5-HT_{1B}, comparativamente a receptores 5-HT_{1D} (pKi de 8,16±0,06 para receptores 5-HT_{1B} e pKi de 6,27±0,09 para receptores 5-HT_{1D}, determinados em receptores humanos recombinados expressos em linhas celulares CHO – *Chinese Hamster Ovary cell line*) (Selkirk *et al.*, 1998). Uma vez que o SB 224289 não alterou a curva CR à metformina excluiu-se a participação dos receptores 5-HT_{1B} na resposta contráctil ao fármaco. Estes resultados foram corroborados pelos estudos imunohistoquímicos que revelaram a ausência de marcação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nas camadas musculares e plexos nervosos dos cortes histológicos de íleo de rato utilizados. Ora, a inexistência destes receptores nas preparações do material biológico analisado exclui a possível intervenção dos mesmos no mecanismo de acção intestinal associado à metformina. Apesar de alguma controvérsia de resultados, a literatura tem vindo a sugerir o envolvimento de receptores 5-HT₁ no controlo da motilidade intestinal. Os receptores 5-HT_{1A} foram identificados em neurónios entéricos de intestino de cobaias e de rato (Dietrich e Kilbinger, 1996; Kirchgessner *et al.*, 1996 e 1993). Recentemente, Foong e colaboradores (2010) demonstraram a participação dos mesmos na geração de potenciais pós-sinápticos inibitórios no plexo submucoso de íleo de cobaias. Por outro lado, Borman e Burleigh (1997) sugerem ainda a intervenção dos receptores 5-HT_{1D} na contracção da camada circular de músculo liso em intestino delgado de humano. A literatura propõe ainda um receptor de características particulares a nível GI, nomeadamente o receptor 5-HT_{1P} que, apesar de ainda não estar efectivamente caracterizado, parece ser expresso apenas a nível GI, controlando a sua actividade. Assim, seria importante o desenvolvimento de antagonistas selectivos deste subtipo de receptor para, futuramente, despistar a sua intervenção efectiva no mecanismo de contracção intestinal induzido pela metformina.

Atendendo à participação dos receptores 5-HT₂ na contracção GI, utilizou-se um antagonista não selectivo, a ritanserina (pKi de 8,8 para receptores 5-HT_{2A}, 8,3 para receptores 5-HT_{2B} e 8,9 para receptores 5-HT_{2C}) (Baxter *et al.*, 1995), tendo esta provocado uma redução significativa de cerca de 67,8% na resposta máxima à metformina. Para clarificar que subtipo de receptor 5-HT₂ poderia estar a mediar a resposta contráctil à metformina, foram igualmente efectuadas curvas CR na presença de cetanserina, antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (pKi de 8,9 e 7,0, respectivamente) (Baxter *et al.*,

1995). Porém, como não foram observadas diferenças significativas entre as curvas CR efectuadas na presença e na ausência deste último antagonista comparativamente com a ritanserina, por exclusão de partes, as experiências sugerem o envolvimento dos receptores 5-HT_{2B} na resposta contráctil à metformina. Tanto mais que este perfil de resposta, na presença dos dois antagonistas, foi igualmente observado nas curvas CR à 5-HT exógena, isto é, a ritanserina bloqueou a resposta máxima à 5-HT em cerca de 62,4%, enquanto que a cetanserina apenas alterou significativamente a curva CR à 5-HT na última dose. Os estudos imunohistoquímicos revelaram ainda a presença de receptores 5-HT_{2A} não em células musculares, mas em células ganglionares do plexo mientérico dos segmentos isolados de íleo de rato. Mais ainda, sendo igual a afinidade da ritanserina e a da cetanserina pelos receptores 5-HT_{2A}, pela semelhança dos respectivos pKi, e tendo sido testadas na mesma concentração, reforça-se a ideia da intervenção de um receptor para o qual a cetanserina não tem afinidade e a ritanserina tem. Embora a cetanserina tenha mais afinidade para receptores 5-HT_{2A} que para receptores 5-HT_{2C}, será pouco provável o envolvimento destes últimos, não descritos a nível periférico. O facto de a cetanserina reduzir a resposta máxima à 5-HT exógena, poderá traduzir o antagonismo nos receptores 5-HT_{2A} neuronais que, pela sua localização ganglionar pré-juncional no plexo mientérico revelada nos estudos imunohistoquímicos, poderão contribuir para a libertação da fracção neuronal de 5-HT ou de outros neurotransmissores que induzam contracção intestinal. Na literatura, os receptores 5-HT_{2A} estão descritos no tracto GI e têm sido referidos como os principais responsáveis pela contracção à 5-HT em preparações de íleo e estômago de rato (Briejer *et al.*, 1997, Komada e Yano 2007), enquanto que essa mesma responsabilidade é atribuída a receptores 5-HT_{2B} em preparações de estômago de rato (Baxter *et al.*, 1994; Komada e Yano 2007), intestino delgado e cólon humano (Borman *et al.*, 2002; Borman e Burleigh, 1997). Contudo, uma vez que os resultados obtidos indiciam a intervenção dos receptores 5-HT_{2B} no mecanismo intestinal da metformina, será imperiosa a localização celular futura dos mesmos em preparações de íleo de rato. De salientar ainda que está descrita, tanto para a ritanserina como para a cetanserina, afinidade nanomolar para receptores adrenérgicos $\alpha_{1A/B/D}$ humanos (Yoshio *et al.*, 2001), embora Scofield e seus colaboradores (1995) tenham detectado a presença mRNA deste tipo de receptores em intestino de rato. A influência dos mesmos a nível intestinal traduz-se na contracção das células de músculo liso (Ponti *et al.*, 1996) pelo que o antagonismo dos receptores α_1 pela cetanserina ou ritanserina poderia influenciar a resposta contráctil à metformina, se esta for mediada pelo receptor adrenérgico. No entanto, pensamos não ser relevante uma vez que em

preparações de íleo de rato são mais abundantes outro tipo de receptores adrenérgicos que não os α_1 (Nasser *et al.*, 2006).

É conhecida a intervenção dos receptores 5-HT₃ na modulação neuronal da contracção intestinal. A acção de antagonistas deste tipo de receptores é eficaz no controlo de sintomas GI pelo que, nesse sentido, a literatura sugere que os receptores 5-HT₃ medeiam vias neuronais excitatórias que contribuem para a contracção intestinal, como é verificado em íleo de cobaias, rato e ratinho (Fox and Morton 1990; Tuladhar *et al.*, 2000; Kiso *et al.*, 2001). No entanto, há que ter presente, como discutido adiante, que os receptores 5-HT₃ podem ter uma localização não neuronal no intestino, nomeadamente em células EC (Gebauer *et al.*, 1993). A activação destes receptores é feita por agonistas que pertencem à classe das biguanidas como a 1-fenilbiguanida e a meta-clorofenilbiguanida (Morain *et al.*, 1994), isto é, moléculas estruturalmente semelhantes à metformina. Cubeddu e seus colaboradores (2000) avaliaram a possível afinidade da metformina para receptores 5-HT₃, expressos de forma funcional em células de neuroblastoma de ratinho N1E-115, através de ensaios de competição entre radioligandos e a metformina. Dessa forma, concluíram que o fármaco não tem afinidade para os receptores 5-HT₃, o que está de acordo com os nossos resultados.

Com efeito, para avaliar a participação dos receptores 5-HT₃ na resposta contráctil dos segmentos intestinais à metformina, foi utilizado um antagonista selectivo, o MDL 72222 na concentração de 1 μ M (Ki de 5,3 nM em receptores 5-HT₃ em córtex de rato) (Hoyer *et al.*, 1994), não tendo sido observada qualquer alteração da curva CR à metformina.

Deste modo, tendo em conta que o mecanismo de acção não neuronal da metformina envolve a componente serotoninérgica, propôs-se que esta poderia interferir na libertação endógena de 5-HT a partir das células enterocromafins, uma vez que estas são o principal depósito de 5-HT no intestino. Na realidade, o que poderia estar a acontecer com os antagonistas serotoninérgicos utilizados, é que estes poderiam estar a antagonizar a resposta contráctil à 5-HT endógena, cuja libertação é estimulada pela metformina ao nível daquelas células EC. Dados da literatura sugerem que a 5-HT tem um papel importante na fisiopatologia de perturbações GI. Por exemplo, no síndrome carcinóide, uma doença resultante de tumores localizados nas células EC, ocorre libertação exagerada de 5-HT a partir dessas células, processo este que contribui para a ocorrência de diarreia severa e desconforto abdominal associados à doença (Carling *et al.*, 2002; Von Der Ohe *et al.*, 1993). Já na síndrome do intestino irritável, as perturbações na função das células EC e na sinalização da

5-HT afectam directa e indirectamente as funções motora e secretora intestinais que podem levar à ocorrência de sintomas gastrointestinais como a diarreia e a obstipação (Crowell 2004). Assim, tendo em conta o papel fisiológico da 5-HT na motilidade intestinal descrito no capítulo 1, e as evidências que comprovam o seu envolvimento em sintomas gastrointestinais, pretendeu-se avaliar a influência da metformina na libertação da 5-HT a partir das células EC. Apesar de o controlo da actividade das células EC não estar ainda esclarecido, alguns autores propõem que a estimulação das mesmas é regulada por receptores 5-HT₃ e 5-HT₄. Gebauer e colegas (1993), sugerem a localização desses receptores nas células EC de íleo de cobaia, em que a activação dos receptores 5-HT₃ induz um mecanismo de *feed-back* positivo, enquanto que os 5-HT₄ causam inibição na libertação de 5-HT. Estes dados são corroborados por estudos realizados em intestino de rato e humano (Turvill *et al.*, 2000, Schwörer e Ramadori, 1998). Assim, o estímulo à desgranulação das células EC por parte da metformina foi também estudado neste trabalho através da utilização da reserpina. Esta é um inibidor do transportador vesicular de monoaminas, cujo efeito se traduz na depleção dos grânulos de 5-HT. Uma vez que se verificou uma depressão significativa da curva CR à metformina de cerca de 73,4%, concluímos que efectivamente a metformina provoca a libertação de 5-HT endógena a partir das células EC. Por outro lado, Gebauer e colaboradores (1993), demonstraram que os receptores 5-HT₃ das células EC diferem dos receptores 5-HT₃ neuronais do plexo mientérico devido à sua elevada afinidade para os antagonistas tropisetron e para o MDL 72222 e baixa afinidade para o ondasetron. As experiências levadas a cabo com o MDL 72222 permitem-nos excluir a intervenção dos receptores 5-HT₃ presentes nas células EC como os intermediários entre a metformina e a libertação de 5-HT. Estas conclusões estão de acordo com o estudo de Cubeddu e seus colaboradores (2000) que referem que os sintomas gastrointestinais associados ao fármaco se devem à indução da desgranulação das células enterocromafins, sendo esta independente da activação de receptores 5-HT₃.

Numa colaboração com o Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foi possível a aquisição de um modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2, nomeadamente ratos machos *Goto-Kakizaki*, num total de 6 animais. Foram isolados apenas 4 segmentos intestinais de cada animal, pelo que a limitação do número de experiências obrigou a uma planificação restrita dos protocolos experimentais a efectuar em animais diabéticos. Desta forma, foram efectuadas curvas CR à metformina e à 5-HT na presença de ritanserina, tendo em conta a evidente participação serotoninérgica na contratilidade intestinal induzida pela metformina e o envolvimento efectivo de receptores 5-

HT₂. Como já foi referido inicialmente nesta discussão, os estudos imunohistoquímicos efectuados em preparações intestinais de animais GK apenas foram utilizados para confirmar a presença da doença nestes animais, não tendo sido possível por limitações económicas proceder à localização celular dos receptores 5-HT_{2B} como complemento dos resultados obtidos nos estudos funcionais.

Nos animais diabéticos, no que diz respeito aos parâmetros farmacológicos da metformina, não se verificaram alterações da eficácia e da potência do fármaco ao longo do tempo. De facto ao longo de duas curvas CR sucessivas, ao contrário dos animais controlo (ratos Wistar), não se observou um aumento dos valores de E_{máx}. Comparando os dois grupos de animais, relativamente à segunda curva CR, a eficácia da metformina revelou-se menor em animais diabéticos. Poderemos então sugerir que a presença da DT2 pareceu provocar o comprometimento da eficácia do fármaco que depende da libertação de 5-HT endógena e estimulação de receptores 5-HT₂ das células musculares lisas.

Com efeito, relativamente às curvas CR à metformina na ausência e na presença de ritanserina, não se registaram diferenças estatisticamente significativas excepto na última dose do fármaco. Observou-se ainda, nos ratos GK, uma maior contracção basal à metformina na presença do bloqueio de receptores 5-HT₂ pela ritanserina, quando comparada com o mesmo tipo de protocolo em animais controlo. Estes resultados não permitiram concluir sobre o envolvimento de receptores 5-HT₂ na resposta contráctil ao fármaco em animais diabéticos. Estas observações sugerem um comprometimento do controlo gastrointestinal motivado pela DT2, já que a resposta contráctil dos segmentos de íleo pode não estar tão dependente da libertação de 5-HT a partir das células EC ou mesmo dos próprios receptores 5-HT₂. Tendo em conta a incidência de sintomas gastrointestinais na DT2, o aumento da contracção basal observado pode ser o mecanismo subjacente à diarreia diabética e ser consequência da neuropatia diabética, uma das principais complicações da doença. Os estudos histoquímicos e imunohistoquímicos em preparações intestinais de animais GK comparadas com preparações de animais controlo, confirmam o estado patológico intestinal motivado pela doença, uma vez que se observa nitidamente o espessamento da parede vascular em animais GK, apesar de não se observarem depósitos de glicogénio nas membranas basais (que seriam consequência da hiperglicémia prolongada motivada pela DT2). Além disso, a actividade neuroendócrina das células musculares lisas da camada longitudinal do intestino de animais diabéticos, comprovada pela imunoreactividade à NSE, denuncia o descontrolo GI motivado pela doença.

Já em relação às curvas CR à 5-HT na ausência e na presença de ritanserina em ratos GK, comprovou-se também o envolvimento de receptores 5-HT₂ na resposta contráctil à 5-HT

exógena, uma vez que se observaram diferenças estatisticamente significativas na segunda e última doses. De salientar que o número de experiências em que este protocolo foi realizado ($n=4$) não permitiu consistência de resultados em todas as doses da curva CR à 5-HT. Numa comparação entre animais controlo e animais GK, as diferenças entre as amplitudes de contracção das curvas CR à 5-HT na presença e na ausência de ritanserina, foram da mesma ordem de grandeza. No entanto, como o número de experiências em animais diabéticos foi reduzido, o poder estatístico da amostra não possibilitou a existência de diferenças estatisticamente significativas nas mesmas doses onde aquelas foram verificadas em animais controlo. Apesar de estarmos conscientes da limitação de resultados, devido ao número de animais diabéticos disponíveis para este trabalho, prosseguiu-se com o estudo, atendendo à mais valia que a inclusão dos mesmos constituía para os objectivos propostos. Comparando a resposta contráctil à 5-HT exógena de animais controlo com a de animais diabéticos, sugere-se que a acção pós-sináptica da 5-HT parece não se alterar sob a influência da doença, já que o efeito da ritanserina em ambas as condições foi idêntico e por não se terem verificado diferenças significativas nos valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} . Assim, sob a influência da DT2, poderá haver um comprometimento na libertação de 5-HT endógena induzida pela metformina, enquanto que a acção pós-sináptica da 5-HT em células musculares lisas parece não ser afectada pela doença. Adicionalmente, fica demonstrado o envolvimento dos receptores 5-HT₂ na resposta contráctil à 5-HT, tanto em animais controlo como em ratos GK.

O impedimento financeiro constituiu uma grande limitação ao presente trabalho uma vez que dificultou a aquisição de animais, fármacos antagonistas, anticorpos e o desenvolvimento de estudos moleculares que permitissem identificar o mecanismo bioquímico intestinal da metformina. A aquisição de ratos GK surgiu de uma colaboração com outro grupo de investigadores já no decurso do trabalho laboratorial. Atendendo à vantagem de uma comparação entre animais controlo e animais diabéticos, aceitámos de imediato essa hipótese. Contudo, temos consciência que a grande diferença entre o número de preparações de íleo dos dois grupos de animais não permitiu fazer uma comparação consistente dos parâmetros farmacológicos entre ambos. Para além disto, uma vez que a principal conclusão é a influência da metformina na libertação de 5-HT a partir das células enterocromafins, serão necessários estudos adicionais que clarifiquem os mecanismos bioquímicos e farmacológicos associados a esse mecanismo de acção do fármaco. Por outro lado, na literatura disponível, não foram encontrados estudos funcionais de contracção de músculo liso de intestino de rato à metformina, pelo que, sendo o presente trabalho pioneiro

nessa área, não houve a possibilidade da comparação dos nossos resultados com os de outros investigadores.

Capítulo 6
Conclusões

Conclusões

A metformina é um fármaco antidiabético oral amplamente utilizado na prática clínica. No entanto, está associado a efeitos adversos, nomeadamente a sintomas gastrointestinais como a diarreia. Nesse sentido, o este trabalho procurou compreender os mecanismos farmacológicos subjacentes à diarreia induzida pela metformina, através de estudos funcionais de contracção de músculo liso de íleo de rato. Os resultados obtidos em animais controlo excluem a possibilidade de um mecanismo neuronal, bem como o envolvimento do NO, dos receptores colinérgicos e dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃, no mecanismo de contracção intestinal induzido pela metformina. Mais ainda, sugere-se o envolvimento dos receptores 5-HT_{2B}, sendo que, no modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2, ficou comprovado o envolvimento de receptores do tipo 5-HT₂. Os estudos histoquímicos/imunohistoquímicos revelaram imunoreactividade a receptores 5-HT_{2A} em células ganglionares do plexo mientérico nas preparações biológicas estudadas, para além de confirmarem, nos animais diabéticos, a presença de alterações morfológicas resultantes da doença.

Propomos como principal mecanismo de acção intestinal da metformina, a indução da libertação de 5-HT a partir das células enterocromafins e consequente estimulação de receptores 5-HT_{2B} das células musculares lisas, uma vez que na presença da DT2 poderá haver um comprometimento na libertação da 5-HT endógena induzida pela metformina, enquanto que a acção pós-sináptica da 5-HT nas camadas musculares parece não ser afectada pela doença.

Concluimos então que a contracção basal do órgão na presença da doença pode ser determinante para um maior ou menor efeito da metformina como indutor de diarreia através da libertação de 5-HT.

Capítulo 7
Referências Bibliográficas

- ABBASI F, Carantoni M, Chen Y, Reaven G. Further. *Diabetes Care* (1998) 21(8):1301-1305.
- ABBASI F, Kamath V, Rizvi A, Carantoni M, Chen Y, Reaven G. Results of a placebo-controlled study of the metabolic effects of the addition of metformin to sulfonylurea-treated patients: evidence for a central role of adipose tissue. *Diabetes Care* (1997) 20:1863-1869.
- AHLMAN H and Nilsson O. The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of Oncology* (2001) 12:63-68.
- ALDERTON W, Cooper C, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* (2001) 357:593-615.
- ALENGRIN F, Grossi G, Canivet B, Dolai-Kitabgi J. Inhibitory effects of metformin on insulin and glucagon action in rat hepatocytes involve post-receptor alterations. *Diabète et Metabolisme* (1987) 13:591-597.
- ANDRADE R, Barnes N, Baxter G, Bockaert J, Branchek T, Cohen M, Dumuis A, Eglen R, Göthert M, Hamblin M, Hamon M, Hartig P, Hen R, Herrick-Davis K, Hills R, Hoyer D, Humphrey P, Latté K, Maroteaux L, Martin G, Middlemiss D, Mylecharane E, Peroutka S, Saxena P, Sleight A, Villalon C, Yocca F. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{1,2,4,5,6,7}. Last modified on 2010-08-11. Accessed on 2011-06-06. IUPHAR database (IUPHARDB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=1/12>;
- ARGAUD D, Roth H, Wiernsperger N, Leverve X. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* (1993) 213:1341-8.
- ASCHE C and Nelson R. The Benefits and Risks of New Therapies for Type 2 Diabetes. *Journal of Managed Care Pharmacy* (2008) 14(7):655-657.
- BAILEY C. Metformin and intestinal glucose handling. *Diabetes/Metabolism Reviews* (1995) 11:23-32.
- BAILEY C, Turner R. Metformin. *N. Engl. J. Med.* (1996) 334:574-579.
- BAILEY C, Wilcock C, Scarpello J. Metformin and the intestine. *Diabetologia* (2008) 51:1552-1553.
- BAKKER R, Wieland K, Timmerman H, and Leurs R. Constitutive activity of the histamine H1 receptor reveals inverse agonism of histamine H1 receptor antagonists. *Eur J. Pharmacol.* (2000) 387:5-7.
- BALY D, Horuk R. Dissociation of insulin-stimulated glucose transport from the translocation of glucose carriers in rat adipose cells. *J Biol. Chem.* (1987) 262:21-24.
- BARD J, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek T and Weinshank R. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* (1993) 268:23422-23426.
- BARNES N, Andrade R, Bockaert J, Butler A, Hamon M, Hensler J, Herrick-Davis K, Hoyer D, Maroteaux L, Martin G, Peters J, Roth B, Sharp T, Villalon C, Neumaier J. 5-hydroxytryptamine receptors, introductory chapter. Last modified on 2011-04-18. Accessed on 2011-06-26. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=1>.

- BAUMAN W, Spungen A, Shaw S, Herbert V, Jayatilleke E. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care* (2000) 23:1227-1231.
- BAXTER G, Kennett G, Blaney F and Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends in Pharmacological Sciences* (1995) 16(3):105-110.
- BAXTER G, Murphy O and Blackburn T. Further characterization of 5- Hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.* (1994) 112:323-331.
- BENARROCH E. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* (2007) 69(20):1953-7.
- BERTACCINI G, Coruzzi G, Histamine receptors in the digestive system, In Schwartz J, Haas H. *The Histamine Receptor*. Wiley Liss, 1992 (pages 193–230).
- BERTRAND P. ATP and sensory transduction in the enteric nervous system. *Neuroscientist* (2003) 9(4):243-260.
- BERTRAND P, Kunze W, Furness J, Bornstein J. The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience* (2000) 101(2):459-69.
- BHALLA R, Toth K, Tan E, Bhatta R, Mathias E, Sharma R. Vascular effects of metformin: Possible mechanisms for its antihypertensive action in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Hypertens.* (1996) 9:570-576.
- BLONDE L, Dailey G, Jabbour S, Reasner C, Mills D. Gastrointestinal tolerability of extended-release metformin tablets compared to immediate-release metformin tablets: results of a retrospective cohort study. *Curr. Med. Res. Opin.* (2004) 20(4):565-572.
- BODEN G and Shulman G. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation* (2002) 32(3):14-23.
- BORMAN R and Burleigh D. Functional evidence for a 5-HT_{2B} receptor mediating contraction of longitudinal muscle in human small intestine. *British Journal of Pharmacology* (1995) 114:1525-152.
- BORMAN R, Burleigh D: 5-HT_{1D} and 5-HT_{2B} receptors mediate contraction of smooth muscle in human small intestine. *Ann. NY. Acad. Sci.* (1997) 812:222-223.
- BORMAN R, Tilford N, Harmer D, Day N, Ellis E, Sheldrick R, Carey J, Coleman R, Baxter G. 5-HT(2B) receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *Br J Pharmacol.* (2002) 135(5):1144-51.
- BRANCHEK T, Mawe G and Gershon M. Characterization and Localization of a Peripheral Neural 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtype (5-HT_{1P}) with a Selective Agonist, 3H-5-Hydroxyindalpine. *The Journal of Neuroscience* (1988) 8(7):2582-2595.
- BRIEJER M, Mathis C, Schuurkes J. 5-HT receptor types in the rat ileum longitudinal muscle: focus on 5-HT₂ receptors mediating contraction. *Neurogastroenterol. Motil.* (1997) 9(4):231-7.

- BRUNTON, L, Lazo, J, Parker, K. Secção VI. Fármacos que afectam a função gastrointestinal; e secção XII – Hormonas e seus antagonistas. In Goodman and Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11th ed, McGraw-Hill Companies, 2007 (pág. 894 e 1465-1482).
- BUDHOO M, and Kellum J. Evidence for a 5-HT₄ receptor pathway mediating chloride secretion in the rat distal colon. *J. Surg. Res.* (1994) 57:44-48.
- BYTZER P, Talley N, Jones M, Horowitz M. Oral hypoglycaemic drugs and gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2001) 15:137-142 (b).
- BYTZER P, Talley N, Leemon M, Young L, Jones M, Horowitz M. Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with Diabetes Mellitus. *Arch. Intern. Med.* (2001) 161:1989-1996 (a).
- CALVERT J, Gundewar S, Jha S, Greer J, Bestermann W, Tian R, Lefer D. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes* (2008) 57:696-705.
- ČAMBOROVÁ P, Hubka P, Ulková I, Hulín I. The pacemaker activity of interstitial cells of cajal and gastric electrical activity. *Physiol. Res.* (2003) 52: 275-284.
- CARLING D and Hardie D The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* (1989) 1012:81-86.
- CARVALHO C, Correia S, Santos M, Seíça R, Oliveira C, Moreira P. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. *Mol. Cell Biochem.* (2008) 308:75-83.
- CASPARY W, Zavada I, Reimold W, Deuticke U, Emrich D, Willms B: Alterations of bile acid metabolism and B12 absorption in diabetics on biguanides. *Diabetologia* (1977) 13:187-193.
- CEFALU W. Diabetic dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Diabetes and Metabolic Syndrome. Clinical Research and Reviews* (2008) 2:208-22.
- CERSOSIMO E, DeFronzo R. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab. Res. Rev.* (2006) 22:423-436.
- CHAN V. Chronic Diarrhea: An uncommon side effect of celiac plexus block. *Anesth. Analg.* (1996) 82:205-7.
- CHANG R, Tran V, Snyder S. Characteristics of histamine H₁-receptors in peripheral tissues labeled with [3H]mepyramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1979) 209(3):437-42.
- CHARLON V, Boucher F, Mouhieddine S, Leiris J. Reduction of myocardial infarct size by metformin in rats submitted to permanent left coronary artery ligation. *Diabetes Metab* (1988) 14:591-595.
- CHEN Z, Mitchelhill K, Michell B, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters L, Power D, Montellano P, Kemp B. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* (1999) 443:285-289.

- CLARKE B, Ewing D, Campbell I. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia* (1979) 17:195-212.
- CLEASBY M, Dzamko N, Hegarty B, Cooney G, Kraegen E, Ye J. Metformin prevents the development of acute lipid-induced insulin resistance in the rat through altered hepatic signaling mechanisms. *Diabetes* (2004) 53:3258-3266.
- CLORE J, Glickman P, Nestler J, Blackard W. In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA free fatty acid-stimulated gluconeogenesis in normal humans. *Am. J. Physiol.* (1991) 261:425-9.
- COSTA M, Brookes S, Henning G. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* (2000) 47:15-19.
- CROWELL M. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *British Journal of Pharmacology* (2004) 141:1285-1293.
- CROWELL M, Mathis C, Schettler V, Yunus T and Lacy B. The effects of tegaserod, a 5-HT receptor agonist, on gastric emptying in a murine model of diabetes mellitus. *Neurogastroenterol. Motil.* (2005) 17:738-743.
- CUBEDDU L, Bönisch H, Göthert M, Molderings G, Racké K, Ramadori G, Miller K, Schwörer H. Effects of metformin on intestinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) release and on 5-HT₃ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2000) 361:85-89.
- CZECH M, Clancy B, Pessino A, Woon C, Harrison S. Complex regulation of simple sugar transport in insulin-responsive cells. *TIBS* (1992) 17:197-201.
- DAMSBO P, Handberg A, Beck-Nielsen H. Reversibility of the defect in glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese NIDDM's treated with diet and metformin. *Diabetes* (1990) 39, Suppl.1, 1070.
- DAVIDOFF F, Bertolini D, Haas D. Enhancement of the mitochondrial Ca²⁺ uptake rate by phenethylbiguanide and other organic cations with hypoglycemic activity. *Diabetes* (1978) 27:757-65.
- DAVIS B, Xie Z, Viollet B, Zou M. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* (2006) 55:496-505.
- DEFRONZO R. Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann. Intern. Med.* (1999) 131:281-303.
- DEFRONZO R, Goodman A, for the Multicenter Metformin Study Group. Efficacy of metformin in NIDDM patients poorly controlled on diet *alone* or diet plus sulfonylurea. *N Engl. J. Med.* (1995) 333:541-9.
- DEGEN L, Matzinger D, Merz M, Appel-Dingemanse S, Osborne S, Lüchinger S, Bertold, R, Maecke H and Beglinger C. Tegaserod, a 5-HT₄ receptor partial agonist, accelerates gastric emptying and gastrointestinal transit in healthy male subjects. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2001) 15:1745-1751.
- DEL PRATO S, Marchetto S, Pipitone A, Zanon M, Vigili de Kreutzenberg S, Tiengo A: Metformin and free fatty acid metabolism. *Diabetes Metab Rev* (1995) 1:33-41.

- DESPRES J. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Metabolism* (2003) 29(6):53-61.
- DETAILLE D, Devos P, Wiernsperger N. Respective molecular effects of insulin and metformin on glucose uptake using the *Xenopus* oocyte model as expression system. *Diabetologia* (1988) 41 Suppl.1:707.
- DETAILLE D, Devos P. Wiernsperger N. Potentiating effect of metformin on insulin-induced glycogen uptake and glycogen metabolism within *xenopus* oocytes. *Diabetologia* (1998) 41:2-8.
- DIETRICH C and Kilbinger H. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus: potential mechanisms. *Neuropharmacology* (1996) 35(4):483-8.
- EARNEST C. Exercise interval training: An improved stimulus for improving the physiology of pre-diabetes. *Medical Hypotheses* (2008) 71:752-761.
- EDWARDS J, Vincent A, Cheng H, Feldman E. Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics* (2008) 120:1-34.
- ERDINE S. Celiac Ganglion Block. *Interventional Treatment* (2005) 17(1):14-22.
- PONTI F, Giaroni C, Cosentino M, Lecchini S, and Frigo G. Adrenergic Mechanisms in the Control of Gastrointestinal Motility: From Basic Science to Clinical Applications. *Pharmacol. Ther.* (1996) 69(1):59-78.
- FEHER M, Al-Mrayat M, Brake J, Leong KS. Tolerability of prolonged release metformin (Glucophage® SR) in individuals intolerant to standard metformin – results from four UK centres. *Br. J. Diabetes. Vasc. Dis.* (2007) 7:225-228.
- FIORICA-HOWELLS E, Hen R, Gingrich J, Li Z and Gershon M. 5-HT_{2A} receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT_{2A} knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2002) 282:877-893.
- FISCHER Y, Thomas J, Rösen P, Kammermeier H. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology* (1995) 136(2):412-420.
- FITZSIMONS C, Monczor F, Fernández N, Shayo C, Davio C. Mepyramine, a Histamine H₁ Receptor Inverse Agonist, Binds Preferentially to a G Protein-coupled Form of the Receptor and Sequesters G Protein. *The Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(33):34431–34439.
- FOONG J, Parry L, Gwynne R, Bornstein J. 5-HT_{1A}, SST(1), and SST(2) receptors mediate inhibitory postsynaptic potentials in the submucous plexus of the guinea pig ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2010) 298(3):384-394.
- FOX A, Morton I. An examination of the 5-HT₃ receptor mediating contraction and evoked [³H]-acetylcholine release in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* (1990) 101:553-558.
- FOXX-ORENSTEIN A, Kuemmerle J, Grider J. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology* (1996) 111: 1281-1290.

- FRIELING T, Cooke H, Wood J. Histamine receptors on submucous neurons in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* (1993) 264:74-80.
- GARBER A, Duncan T, Goodman A, Mills D, Rohlf J. Efficacy of Metformin in Type II Diabetes: Results of a Double-Blind, Placebo-controlled, Dose-Response Trial. *American Journal of Medicine* (1997) 102:491-97.
- GEBAUER A, Merger M, Kilbinger H Modulation by 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1993) 347:137-140.
- GERSHON M. Roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Ailment. Pharmacol. Ther.* (1999) 13(2):15-30.
- GERSHON M and Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* (2007) 132:397-414
- GILLIES C, Abrams K, Lambert P, Cooper N, Sutton A, Hsu R, Khunti K. Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. *BMJ* (2007) 334:299.
- GLATZLE J, Sternini C, Robin C, Zittel T; Wong H, Reeve J, Raybould H. Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* (2002) 123(1):217-26.
- GOLAY A. Metformin and body weight. *Internal Journal of Obesity* (2008) 32:61-72.
- GOLDSTEIN, B. Clinical translation of "a diabetes outcome progression trial": ADOPT appropriate combination oral therapies in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2007) 92(4):1226-1228.
- GOTO Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.* (1976) 119(1):85-90.
- GRANT P, Stickland M, Booth N, Prentice C. Metformin causes a reduction in basal and post-venous occlusion plasminogen activator inhibitor-1 in type 2 diabetic patients. *Diabet Med.* (1991) 8:361-5.
- GRIDER J, Kuemmerle J, Jin J. 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT₄/5-HT_{1p} receptors on sensory CGRP neurons. *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology* (1996) 270(5):778-782.
- GRIDER J. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse *J Pharmacol. Exp. Ther.* (2003) 307:460-467.
- GRUNDY S, Brewer H, Cleeman J, Smith S, Lenfan C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* (2004) 109:433-8.
- GUANDALINI, Stefano; Vaziri, Haleh. Diarrhea: Diagnostic and Therapeutic Advances; *Clinical Gastroenterology*. 1st ed. Humana Press. 2011. Chapter 1: Definition, epidemiology, pathophysiology, Clinical Classification and Differential Diagnosis of Diarrhea (pages 1-32).

- GUDMUNDSDOTTIR H, Aksnes H, Heldal K, Krogh A, Froyshov S, Rudberg N, Os I. Metformin and antihypertensive therapy with drugs blocking the renin angiotensin system, a cause of concern? *Clin Nephrol* (2006) 66:380-385.
- HAAS H, Sergeeva O and Selbach O. Histamine in the Nervous System. *Physiol. Rev.* (2008) 88:1183-1241.
- HANDBERG A, Kayser L, Hoyer P, Voldstedlund M, Hansen H, Vinten J. Metformin ameliorates diabetes but does not normalize the decreased GLUT 4 content in skeletal muscle of obese (fa/fa) Zucker rats. *Diabetologia* (1993) 36:481-486.
- HANSEN M. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol. Res.* (2003) 52:1-30.
- HARDIE D, Hawley S, Scott J. AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept. *J Physiol.* (2006) 574(1):7-15.
- EGDE S, Wong A, Perry M, Ku P, Moy T, Loeb M and Eglen R. 5-HT₄ receptor mediated stimulation of gastric emptying in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (1995) 351:589-595.
- HENIN N, Vincent M, Gruber H and Van den Berghe G. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J* (1995) 9:541-546.
- HIROTA C and McKay D. Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology* (2006) 149:463-479.
- HIRST G and Edwards F. Role of Interstitial Cells of Cajal in the Control of Gastric Motility. *J. Pharmacol. Sci.* (2004) 96:1-10.
- HOLMES B, Kurth-Kraczek E and Winder W. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.* (1999) 87:1990-1995.
- HORMAN S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoigne A, Hue L, Proud C and Rider M. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current Biol.* (2002) 12:1419-1423.
- HOUWERZIJL EJ, Snoek WJ, van Haastert M, Holman ND. Severe lactic acidosis due to metformin therapy in a patient with contra-indications for metformin. *Ned Tijdschr Geneesk* (2000) 144:1923-1926.
- HOWLETT H, Davidson J. New prolonged-release metformin improves gastrointestinal tolerability. *Br J. Diabetes Vasc. Dis.* (2004) 4:273-7.
- HOYER D, Clarke D, Fozard J, Hartig P, Martin G, Mylecharene E, Saxena P, Humphreys P. VII. International Union of Pharmacology Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin); *Pharmacological Reviews* (1994) 46(2):157-203.
- HUIZINGA J and Lammers W. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2009) 296:1-8.

- HUNDAL H, Ramlal T, Reyes R, Leiter L, Klip A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* (1992) 131:1165-1173.
- HUNDAL R, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi S, Schumann W, Petersen K, Landau B, Shulman G. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* (2000) 49(12):2063-9.
- IKEDA T, Iwata K, Murakami H. Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. *Biochem. Pharmacol.* (2000) 59(7):887-90.
- JAIN V, Sharma D, Prabhakar H, Dash HH. Metformin-associated lactic acidosis following contrast media-induced nephrotoxicity. *European Journal of Anaesthesiology* (2008) 25:166-67.
- JASPER J, Kosaka A, To Z, Chang D and Eglen R. Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7b}). *Br. J. Pharmacol.* (1997) 122:126-132.
- JESSEN N, Pold R, Buhl E, Jensen L, Schmitz O, Lund S. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. *J. Appl. Physiol.* (2003) 94:1373-9.
- JOHNSON A, Webster J, Sum C, Heseltine L, Argyraki M, Cooper B and Taylor R. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients. *Metabolism* (1993) 42:1217-22.
- KADOWAKI M, Wang X, Shimatani H, Yoneda S and Takaki M. 5-HT₄ receptor enhances the propulsive power of the peristaltic reflex in the rat distal colon. *Auton. Neurosci.* (2002) 99:62-65.
- KATZUNG B. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th Edition. McGraw-Hill Medical, 2009.
- KAWABATA H and Ishikawa K. Cardioprotection by Metformin Is Abolished by a Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Ischemic Rabbit Hearts. *Hypertens. Res.* (2003) 26:107-110.
- KERSHAW E and Flier J. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2004) 89:2548-56.
- KIMURA N, Masuda S, Tanihara Y, Ueo H, Okuda M, Katsura T and Inui K. Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab. Pharmacokinet.* (2005) 20:379-386.
- KIRCHGESSNER A, Liu M, Howard M, Gershon M. Detection of the 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat bowel and pancreas: comparison with 5-HT_{1P} receptors. *J. Comp. Neurol.* (1993) 327(2):233-50.
- KISO T, Ito H, Hiyata K, Kamato T, Naitoh Y, Iwaoka K and Yamagushi T. A novel 5-HT₃ receptor agonist, ym-31636, increases gastrointestinal motility without increasing abdominal pain. *Eur. J. Pharmacol.* (2001) 431:35-41.
- KOMADA T and Yano S. Pharmacological Characterization of the 5-Hydroxytryptamine-receptor subtypes in circular muscle from the rat stomach. *Biol. Pharm. Bull.* (2007) 30(3):508-513.

- KOMORI T, Nakamura J, Hamada Y, Koh N, Hotta N. Effects of glucosamine, metformin, and JTT-501 on glycogen synthesis in cultured myotubes from human NIDDM subject. [Abstract] *Diabetes* (1998) 47 (suppl. 1).
- KOZKA I and Holman G. Metformin blocks downregulation of cell surface GLUT4 caused by chronic insulin treatment of rat adipocytes. *Diabetes* (1993) 42:1159-65.
- KUMAR, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Robbins & Cotran – *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*; 7^a ed; Saunders – Elsevier; Copyright 2005; Capítulo 17 – O Trato Gastrointestinal (873-874) e Capítulo 24: O Sistema Endócrino (pages 1243-1260).
- KUNIHICO A, Shoemaker J, Overend T, Petrella R. Effects of lifestyle modification on central artery stiffness in metabolic syndrome subjects with pre-hypertension and/or pre-diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* (2009) 83:249-56.
- LALAU J. Lactic Acidosis Induced by Metformin: Incidence, Management and Prevention. *Drug Saf.* (2010) 33(9):727-740.
- LALAU J, Lacroix C, Compagnon P, Cagny B, Rigaud J, Bleichner G, Chauveau P, Dulbecco P, Guérin C, Haegy J. Role of metformin accumulation in metformin-associated lactic acidosis. *Diabetes Care* (1995) 18:779-784.
- Large V, Beylot M. Modifications of citric acid cycle activity and gluconeogenesis in streptozotocin-induced diabetes and effects of metformin. *Diabetes* (1999) 48:1251-7.
- LEGTENBERG R, Houston R, Oeseburg B, Smits P. Metformin improves cardiac functional recovery after ischemia in rats. *Horm. Metab. Res.* (2002) 34:182-185.
- LI Z, Zhou Z, Daniel E. Expression of gap junction connexin 43 and connexin mRNA in different regional tissues of intestine in dog. *Am. J. Physiol.* (1993) 265:911-916.
- LIN Y and Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology* (2010) 204:1-11.
- LIU S, Xia Y, Hu H, Ren J, Gao C, Wood J. Histamine H3 receptor-mediated suppression of inhibitory synaptic transmission in the submucous plexus of guinea-pig small intestine. *Eur. J. Pharmacol.* (2000) 397:49-54.
- LOCHHEAD P, Salt I, Walker K, Hardie D, Sutherland C. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* (2000) 49:896-903.
- LUMMIS S, Barnes N, Hales T, John A. Peters. 5-HT₃ receptors, introductory chapter. Last modified on 2010-03-29. Accessed on 2011-06-06. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=68>
- LYSY J, Israeli E, Goldin E. The prevalence of chronic diarrhea among diabetic patients. *The American Journal of Gastroenterology* (1999) 94(8):2165-2170.

- REIMANN M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz P, Ludwig B, Hanefeld M, Bornstein S. An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacology and Therapeutics* (2009) 121(3):317-331.
- MARTÍN M, Jiménez M and Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Current Pharmacological Design* (2001) 7:881-908.
- MARTINS V, Paiva I, Maia C, Carvalheiro M. Rastreo de Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista Portuguesa de Diabetes* (2009) 4(4):156-162.
- MATSUMOTO T, Noguchi E, Ishida K, Kobayashi T, Yamada N, Kamata K. Metformin normalizes endothelial function by suppressing vasoconstrictor prostanoids in mesenteric arteries from OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* (2008) 295:1165-1176.
- MATTHAEI S, Haman A, Klein H, Benecke H, Kreyman G, Flier J, Greten H. Association of metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes* (1991) 40:850-857.
- MCGARRY J and Dobbins R. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* (1999) 42:128-38.
- MCGUINNESS M and Talbert R. Phenformin-induced lactic acidosis: a forgotten adverse drug reaction. *Ann. Pharmacother.* (1993) 27:1183-7.
- MCLEAN P and Coupar I. Further investigation into the signal transduction mechanism of the 5-HT₄-like receptor in the circular smooth muscle of human colon. *Br. J. Pharmacol.* (1996) 118:1058-1064 (B).
- MCLEAN P and Coupar I. Stimulation of cyclic AMP formation in the circular smooth muscle of human colon by activation of 5-HT₄-like receptors. *Br. J. Pharmacol.* (1996) 117:238-239 (A).
- MICHEL K, Zeller F, Langer R, Nekarda H, Kruger D, Dover T, Brady C, Barnes N, Schemann M. Serotonin excites neurons in the human submucous plexus via 5-HT₃ receptors. *Gastroenterology* (2005) 128(5):1317-26.
- MILLER L. Small intestinal manifestations of diabetes mellitus. *The yale journal of biology and medicine* (1983) 56:189-193.
- MISBIN R. Phenformin associated lactic acidosis: pathogenesis and treatment. *Ann. Intern. Med.* (1977) 87:591-595.
- MISRA P and Chakrabarti R. The role of AMP kinase in diabetes. *Indian J. Med. Res.* (2007) 125:389-398.
- MITSUI R, Ono S, Karki S, Kuwahara A. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterol. Motil.* (2005) 17:585-594.
- MLINAR B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta* (2007) 375:20-35.

- MONCADA S, Palmer M, Higgs E. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* (1991) 43(2):109-142.
- MORAIN P, Abraham C, Portevin B, De Nanteuil G. Biguanide derivatives: agonist pharmacology at 5-hydroxytryptamine type 3 receptors in vitro. *Mol. Pharmacol.* (1994) 46(4):732-42.
- MORELLI A, Filippi S, Vignozzi L, Mancina R, Maggi M. Physiology of Erectile Function: An Update on Intracellular Molecular Processes. *eau - ebu update series (European Association of Urology)* (2006) 4(3):96-108.
- MORGAN D, Ray C, Balon T, Mark A. Metformin increases insulin sensitivity and lowers arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* (1992) 20:421.
- MORROW V, Foufelle F, Connell J, Petrie J, Gould G, Salt I: Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* (2003) 278:31629-31639.
- MUNTZEL M, Hamidou I, Barrett S. Metformin attenuates salt-induced hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* (1999) 33(5):1135-40.
- MUSI N, Hirshman M, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson J, Ljunqvist O, Efendic S, Moller D, Thorell A, Goodyear L. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* (2002) 51:2074-81.
- NAGI D and Yudkin J. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups. *Diabetes Care* (1993) 16:621-9.
- NASEEM K. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects Med.* (2005) 26(1-2):33-65.
- NASSER Y, Ho W, Sharkey K. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J. Comp. Neurol.* (2006) 495(5):529-53.
- NATHAN D, Buse J, Davidson M, Heine R, Holman R, Sherwin R, Zinman B. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* (2006) 49:1711-21.
- NELSON D and Cox M. *Lehninger – Principles of Biochemistry*. 5th ed, Freeman and Company, 2008.
- NEMETH P, Ort C, Wood J. Intracellular study of effects of histamine on electrical behaviour of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *J. Physiol.* (1984) 355:411-425.
- NIESLER B, Frank B, Kapeller J, Rappold G. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* (2003) 310:101-11.
- NILSSON O, Dahlstrom A, Geffard M. An improved immunocyto-chemical method for subcellular localization of serotonin in rat enterochromaffin cells. *J. Histochem. Cytochem.* (1987) 35:319-26.

- NING Y, Zhu J, Chan H. Regulation of ion transport by 5-hydroxytryptamine in rat colon. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2004) 31:424-428.
- NOBACK C, Strominger N, Demarest R, Ruggiero D. *The human nervous system: Structure and Function*. 6th ed. Humana Press, 2005. Chapter 20: Autonomic Nervous system, (pages 349-371).
- OLSSON C and Holmgren S. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A* (2001) 128:481-503.
- ONO S, Mitsui R, Karaki S, Kuwahara A. Muscarinic and 5-HT₄ receptors participate in the regulation of the frequency of spontaneous contractions of the longitudinal muscle in rat distal colon. *Biomed. Res.* (2005) 26:173-177.
- OWEN M, Doran E, Halestrap A. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* (2000) 348(3):607-614.
- PAN H and Gershon M. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestines. *J. Neurosci.* (2000) 20:3295-3309.
- PATANÈ G, Piro S, Rabuazzo A, Anello M, Vigneri R, Purrello F. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes* (2009) 49:735-40.
- PETERSEN J, Liu W, Kapusta D, Varner K. Metformin Inhibits Ganglionic Neurotransmission in Renal Nerves. *Hypertension* (1979) 29:1173-1177.
- PONGWECHARAK J, Tengmeesri N, Malanusorn N, Panthong M, Pawangkapin N. Prescribing metformin in type 2 diabetes with a contraindication: prevalence and outcome. *Pharm. World Sci.* (2009) 31(4):481-486.
- PORTE D and Kahn S. Beta-cell dysfunction and failure in T2DM: potential mechanisms. *Diabetes* (2001) 50:160-63.
- PRASANTH N, Surampudi M, John-Kalarickal J, Fonseca V. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mount Sinai Journal of medicine* (2009) 76:216-26.
- PROCTOR W, Bourdet D, Thakker D. Mechanisms Underlying Saturable Intestinal Absorption of Metformin. *Drug Metabolism and Disposition* (2008) 36:1650-1658.
- PRONTUÁRIO TERAPÊUTICO; INFARMED; Maio de 2009; Grupo 8.4.2. Antidiabéticos orais (326-333) (a).
- PRONTUÁRIO TERAPÊUTICO; INFARMED; Março de 2009; Grupo 8.4.2. Antidiabéticos orais (326-333) (b).
- QUAN C, Talley N, Jones M, Spies J, Horowitz M. Gain and Loss of Gastrointestinal Symptoms in Diabetes Mellitus: Associations With Psychiatric Disease, Glycemic Control, and Autonomic Neuropathy over 2 Years of Follow-up. *Am. J. Gastroenterol.* (2008) 103:2023-2030.

- RADZIUK J, Zhang Z, Wiernsperger N, Pye S. Effects of metformin on lactate uptake and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Diabetes* (1997) 46:1406-13.
- RAINS S, Wilson G, Richmond W, Elkeles R. The reduction of low density lipoprotein cholesterol by metformin is maintained with long-term therapy. *Journal of the Royal Society of Medicine* (1989) 82.
- RAJ P. Celiac Plexus/Splanchnic Nerve Blocks. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* (2001) 5(3):102-115.
- RAJU B, Resta C, Tibaldi J. Metformin and late gastrointestinal complications. *The American Journal of Medicine* (2000) 109:260-261.
- RAMACHANDRAN A, Mary S, Mukesh B, Bhaskar A, Vijay V. The Indian Diabetes Prevention Programme shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP-1). *Diabetologia* (2006) 49:289-97.
- RAPIN J, Lespinasse C, Yoa R, Wiernsperger N. Erythrocyte glucose consumption in insulin-dependent diabetes: effect of metformin in vitro. *Diabetes Metab.* (1991) 17:164-167.
- REDDI A and Jyothirmayi G. Effect of chronic metformin treatment on hepatic and muscle glycogen metabolism in KK mice. *Biochem. Med. and Metab. Biol.* (1992) 47:124-132.
- REEVES J, Bunce K, Humphrey P. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus. *Br J Pharmacol.* (1991) 103:1067-1072.
- REN J, Dominguez L, Sowers J, Davidoff A. Metformin but not glyburide prevents high glucose-induced abnormalities in relaxation and intracellular Ca²⁺ transients in adult rat ventricular myocytes. *Diabetes* (1999) 48:2059-65.
- ROURU J, Koulu M, Peltonen J, Santti E, Hänninen V, Pesonen U, Huupponen R. Effects of metformin treatment on glucose transporter proteins in subcellular fractions of skeletal muscle in (fa/fa) Zucker rats. *Br. J. Pharmacol.* (1995) 115:1182-1187.
- SAKAR Y, Meddah B, Faouzi M, Cherrah Y, Bado A, Ducroc R. Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporter. *Journal of Physiology and Pharmacology* (2010) 61(3):301-307.
- SALPETER S, Greyber, Pasternak G, E Salpeter. E. Risk of Fatal and Nonfatal Lactic Acidosis With Metformin Use in Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch. Intern. Med.* (2003) 163:2594-2602.
- SANDER L, Lorentz A, Sellge G, Coëffier M, Neipp M, Veres T, Frieling T, Meier P, Manns M, Bischoff S. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut* (2006) 55:498-504.
- SANTOS, Sónia Alexandra Pinto Ribeiro da Silva – Efeitos adversos dos triptanos: suas bases farmacológicas. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (2005). Tese de Doutoramento.
- SARABIA V, Lam L, Burdett E, Leiter L, and Klip A. Glucose Transport in Human Skeletal Muscle Cells in Culture Stimulation by Insulin and Metformin. *J. Clin. Invest.* (1992) 90:1386-1395.

- SARTORETTO J, Melo G, Carvalho M, Nigro D, Passaglia R, Scavone C, Cuman R, Fortes Z. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sciences* (2005) 77:2676-2689.
- SCHAFER G. Some new aspects on the interaction of hypoglycemia-producing biguanides with biological membranes. *Biochem. Pharmacol.* (1976) 25:2014-2024.
- SCHEEN A. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* (1996) 30:359-371.
- SCHILLER L, Santa C, Schmulen A, Hendler R, Harford W, Fordtran J. Pathogenesis of fecal incontinence in diabetes mellitus: Evidence for internal anal sphincter dysfunction. *N. Engl. J. Med.* (1982) 307:1666-71.
- SCHWÖRER H and Ramadori G. Autoreceptors can modulate 5-hydroxytryptamine release from porcine and human small intestine in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (1998) 357:548-552.
- SCOFIELD M, Liu F, Abel P, Jeffries W. Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1995) 275(2):1035-42.
- SELKIRK J, Scott C, Ho M, Burton M, Watson J, Gaster L, Collin L, Jones B, Middlemiss D, Price G. SB 224289 – a novel selective (human) 5-HT_{1B} receptor antagonist with negative intrinsic activity. *Br. J. Pharmacol.* (1998) 125:202-208.
- SENA CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernandes R, Seiça R. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* (2011) 163(2):424-37.
- SHAKIL A, Church R, Rao S. Gastrointestinal Complications of Diabetes. *Am. Fam. Physician.* (2008) 77(12):1697-1702.
- SHERWOOD, Lauralee; *Human Physiology: from cells to systems*. 7th Edition. Brooks Cole. 2008. Chapter 8: Muscle Physiology (pages 257-298).
- SHULMAN G, Williams P, Liljenquist J, Lacy W, Keller U, Cherrington A. Effect of hyperglycemia independent of changes in insulin or glucagon on lipolysis in the conscious dog. *Metabolism* (1980) 29:317-320.
- SILVESTRE J, Carvalho S, Mendes V, Coelho L, Tapadinhas C, Ferreira P, Povoas P, Ceia F. Metformin-induced lactic acidosis: a case series. *Journal of Medical Case Reports* (2007) 1:126.
- SINDELAR D, Chu C, Rohlie M, Neal D, Swift L, Cherrington A. The role of fatty acids in mediating the effects of peripheral insulin on hepatic glucose production in the conscious dog. *Diabetes.* (1997) 46:187-96.
- TAMURA K, Palmer J, Wood J. Presynaptic inhibition produced by histamine at nicotinic synapses in enteric ganglia. *Neuroscience* (1988) 25:171-179.

- TEIXEIRA-LEMOS E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc. Diabetol.* (2011) 28:10-12.
- TENG B, Murthy K, Kuemmerle J, Grider J, Sase K, Michel T, Makhlof G. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* (1998) 275:342-351.
- TEWARI P, Nath S, Mazumdar G. Increased prothrombin time and lactic acidosis: rofecoxib drug interaction with acenocoumarin and metformin. *Annals of Cardiology Anaesthesia* (2007) 10:58-60.
- THOMSEN H and Morcos S. Contrast media and metformin. Guidelines to diminish the risk of lactic acidosis in non-insulin dependent diabetics after administration of contrast media. *Eur. Radiol.* (1999) 9:738-40.
- TOBIN G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *Journal of Physiology and Pharmacology* (2009) 60(1):3-21.
- TOMKIN G, Hadden R, Weaver J, Montgomery D. Vitamin-B12 status of patients on long-term metformin therapy. *Br. Med. J.* (1971) 2:685-687.
- TOMKIN G. Malabsorption of vitamin B12 in diabetic patients treated with phenformin: a comparison with metformin. *Br. Med. J.* (1973) 3:673-675.
- TUCKER G, Casay C, Phillips P, Connor H, Ward J, Woods H. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (1981) 12:235-246.
- TULADHAR B, Costall B, Naylor R. Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine mediating relaxation in the rat isolated ileum. *British Journal of Pharmacology* (1996) 119:303-310.
- TULADHAR B, Womack M, Naylor R. Pharmacological characterization of the 5-HT receptor-mediated contraction in the mouse isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.* (2000) 131:1716-1722.
- TUO B, Sellers Z, Paulus P, Barrett K, Isenberg J. 5-HT induces duodenal mucosal bicarbonate secretion via cAMP- and Ca²⁺-dependent signaling pathways and 5-HT₄ receptors in mice. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2004) 286:444-451.
- TURVILL J, Connor P, Farthing M. The inhibition of cholera toxin-induced 5-HT release by the 5-HT₃ receptor antagonist, granisetron, in the rat. *British J. of Pharmacol.* (2000) 130:1031-1036.
- TUSHUIZEN M, Bunck M, Pouwels P, Bontemps S, Waesberghe J, Schindhelm R, Mari A, Heine R, Diamant M. Pancreatic Fat Content and β -Cell Function in Men With and Without T2DM. *Diabetes Care* (2007) 30(11):2916-21.
- UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* (1998) 352:854-65.
- VALDEZ C. New Agents in the Management of Type 2 Diabetes: Do They Provide an Opportunity for Shift in the Treatment Paradigm? *Journal of Managed Care Pharmacy* (2008) 14(7):650-654.

- VANDER A, Sherman J, Luciano D, Widmaier E, Raff H, Strang H. Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. McGraw-Hill; 9th ed. 2003. Chapter 15: Digestion and absorption of food (pages 563-603).
- VIDON N, Chaussade S, Noel M, Franchisseur C, Huchet B, Bernier J. Metformin in the digestive tract. *Diabetes Res. Clin. Pract.* (1988) 4:223-229.
- VIOLLET B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol.* (2006) 574(1):41-53.
- VON DER OHE M, Camilleri M, Kvols L, Thomforde G. Motor dysfunction of the small bowel and colon in patients with the carcinoid syndrome and diarrhea. *N. Engl. J. Med.* (1993) 329(15):1073-8.
- WANG D, Jonker J, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel A, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2002) 302:510-515.
- WEBB C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advan. Physiol. Educ.* (2003) 27:201-206.
- WIERNSPERGER N. Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes and Metabolism* (1999) 25:110-127.
- WILCOCK C and Bailey C. Reconsideration of inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption. *J. Pharm. Pharmacol.* (1991) 43(2):120-121.
- WINDER W. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (2001) 91:1017-1028.
- WOOD J, Alpers D, Andrews P. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* (1999) 45:6-16.
- WOOD J. Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut* (2006) 55:445-447.
- WOOD J. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J. Gastroenterol.* (2007) 13(9):1313-1332.
- World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization (1999).
- World Health Organization. Screening for Type 2 Diabetes. Report of a World Health Organization and International Diabetes Federation meeting. World Health Organization (2003).
- WRIGHT A, Cull C, Macleod K, Holman R. Hypoglycemia in Type diabetic patients randomized to and maintained on monotherapy with diet, sulphonylurea, metformin, or insulin for 6 years from diagnosis: UKPDS73. *Journal of Diabetes Complications* (2006) 20:395-401.
- WU M, Johnston P, Sheu W, Hollenbeck C, Jeng C, Goldfine I, Chen Y, Reaven G. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care* (1990) 13:1-8.

- WYATT S, Winters K, Dubbert P. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *American Journal of Medical Science* (2006) 331:166-74.
- XUE C, Pollock J, Schmidt H, Ward S, Sanders K. Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J. Auton. Nerv. Syst.* (1994) 49:1-14.
- YOA R, Rapin J, Wiernsperger N, Martinand A, Belleville I. Demonstration of defective glucose uptake and storage in erythrocytes from non-insulin-dependent diabetic patients and effects of metformin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (1993) 20:563-567.
- YOSHIO R, Taniguchi T, Itoh H, Muramatsu I. Affinity of serotonin receptor antagonists and agonists to recombinant and native alpha1-adrenoceptor subtypes. *Jpn. J. Pharmacol.* (2001) 86:189-195.
- ZANG M, Zuccolo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman N, Cohen R. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* (2004) 279:47898-905.
- ZHOU G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman M, Goodyear L, Moller D. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* (2001) 108(8):1167-74.
- ZHOU M, Xia L, Wang J. Metformin Transport by a Newly Cloned Proton-Stimulated Organic Cation Transporter (Plasma Membrane Monoamine Transporter) Expressed in Human Intestine. *Drug Metabolism and Disposition* (2007) 35:1956-1962.
- ZIMMET P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* (2001) 414:782-7.