



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PATRÍCIA SARAIVA NASCIMENTO

A CÉLULA BETA PANCREÁTICA NA DIABETES

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
DRA. JOANA CARINA DE PINHO MARQUES SARAIVA

MARÇO/2018

FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE DE COIMBRA, PORTUGAL

A CÉLULA BETA PANCREÁTICA NA DIABETES

Autor: Patrícia Saraiva Nascimento^a

Orientador: Dra. Joana Carina de Pinho Marques Saraiva^b

^a Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, Aluna

^b Hospitais da Universidade de Coimbra, CHUC, Médica Endocrinologista do SEDM e
Assistente Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para a
Disciplina de Endocrinologia

E-mail: patricia_sn@sapo.pt

Índice

1. Resumo	7
2. Abstract	8
3. Introdução	9
4. Materiais e métodos	12
5. Nota histórica	13
6. Fisiologia da célula β	14
6.1. Fatores de transcrição	15
6.2. <i>Metabolic coupling</i> fatores e estimulação pela glicose, na secreção de insulina	16
6.3. Vias de sinalização	16
6.4. Secreção de insulina	17
7. Sobrevivência, proliferação e diferenciação das células β	20
7.1. A massa de células β	20
7.2. Fatores que aumentam a massa da célula beta	21
7.3. Fatores que promovem a perda de função e massa da célula beta	23
8. Fatores que estimulam a libertação de insulina	24
8.1. Diabetes tipo 1	25
8.1.1. Fatores genéticos	27
8.1.2. Fatores ambientais.....	33
8.2. Diabetes tipo 2	35
8.2.1. Fatores genéticos	36
8.2.2. Fatores ambientais.....	41
8.2.3. Mecanismos de resistência à insulina na DM2	43
9. Intervenção clínica	47
9.1. Transplante de pâncreas	47
9.2. Transplante de ilhéus de Langerhans	50
9.3. Substituição das células β pancreáticas.....	52
9.4. Terapia génica	53
9.5. Preservação da célula β com análogos da GLP-1	54
10. Conclusão	56
Referências Bibliográficas	61

Lista de Figuras

Figura 1 - Células pancreáticas dispersas nos ilhéus de Langerhans, de modo não uniforme.

Figura 2 - Secreção de insulina na célula β pancreática.

Figura 3 - Fatores que influenciam a massa de células β .

Figura 4 - Função das moléculas MHC II em resposta a um autoantigénio.

Figura 5 - Aumento dos autoantigénios durante a evolução da DM1.

Figura 6 - Alterações na função e na massa das células β , ao longo da DM2 e suas causas.

Figura 7 - Dentro da célula a glicose é maioritariamente metabolizada pela via glicolítica, mas há uma pequena parte que entra na via das hexosaminas. TCA: ciclo do ácido tricarboxílico, também conhecido como ciclo de Krebs.

Figura 8 - Aspeto posterior de um enxerto de pâncreas.

Figura 9 - Etapas no isolamento de ilhéus, antes de serem transplantados.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Regulação da libertação de insulina.

Tabela 2 - Formas genéticas da DM1, associadas a síndromes.

Tabela 3 - Risco de diabetes de acordo com ao vários haplótipos.

Abreviaturas

11BHSD1: *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*

BB: *biobreeding*

BB-DR: *diabetes-resistant biobreeding*

CAMKII: proteína quinase ii dependente de cálcio-calmodulina

CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao camp

DAG: diacilglicerol

DM1: diabetes *mellitus* tipo 1

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2

EAD: *endocrine autoimmune disease*

GAD65: ácido glutâmico descarboxilase 65

GAD67: ácido glutâmico descarboxilase 67

Gene HFN-4 α : gene do fator 4 α do hepatócito

Gene TCF7L2: *transcription factor 7-like 2*

GLUT1: proteína 1 transportadora de glicose

GLUT2: proteína 2 transportadora de glicose

GLUT4: proteína 4 transportadora de glicose

GMPC: monofosfato de guanosina cíclico

HLA: antígeno leucocitário humano

Hsp60: proteína de choque térmico de 60 da

IA-2: *islet antigen-2*

IA-2B: fgrina

IAA: autoanticorpos anti-insulina

ICA512: *islet cell autoantigen 512*

ICA69: *islet cell autoantigen 69 kd*

IP3: inositol-1,4,5-trifosfato

IPF1: fator promotor da insulina

IRS: *insulin receptor substrat*

Kir 6.2: *inwardly rectifying k⁺ channel*.

MIN-6: *mouse insulinoma pancreatic beta-cell*

NeuroD: proteína fator de diferenciação neurogénica

NeuroD1/BETA2: diferenciação neurogénica 1/ trans-ativador 2 da célula beta *e-box*

NOD: *non obese diabetic*

PDX-1: duodeno-pancreático *homeobox 1*

PKA: *protein kinase a*

PKC: *protein kinase c*

PKG: *protein kinase g*

PLC: fosfolipase c

POPS: poluentes orgânicos persistentes

PPAR γ : recetor ativado pelo proliferador γ do peroxissoma

RAGE: recetores para produtos finais de glicação. avançada

RE: retículo endoplasmático

Slc30A8: *solute carrier family 30 (zinc transporter)*

SRI-1: substratos do recetor insulínico 1

SRI-2: substratos do recetor insulínico 2

SRIS: substratos do recetor insulínico

TNF- α : fator de necrose tumoral α

Znt8: transportador de zinco 8

1. Resumo

Introdução: A diabetes tem uma prevalência superior a 1 milhão de pessoas no nosso país, segundo os dados mais recentes do Observatório Nacional da Diabetes. Neste trabalho, são inicialmente abordados os principais aspetos da fisiologia da célula β . De seguida, explicam-se os mecanismos patológicos subjacentes à DM1 e à DM2, bem como os fatores que já são aceites como causadores da doença e fatores que se pensa que possam estar na origem da doença. Por último, é feita uma revisão sobre as terapias com potencial curativo da doença.

Objetivos: Tendo em conta a prevalência desta doença na população portuguesa, o objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão da literatura sobre a fisiopatologia dos dois tipos de diabetes mais frequentes (diabetes tipo 1 e da diabetes tipo 2), na perspectiva da célula β e alvo terapêutico. **Métodos:** Foi efetuada uma revisão sistemática da literatura médica a partir de artigos tirados do *Pubmed*, publicados essencialmente nos últimos 5 anos e de livros da especialidade. Os artigos foram selecionados através da relevância do título e/ou do *abstract* para o tema do trabalho. **Discussão:** São abordados os principais tipos de diabetes quanto às suas etiologias. É também feita uma revisão da fisiologia da célula β e da sua fisiopatologia na diabetes. Por último é feita uma revisão sobre as terapias com potencial curativo da doença. **Conclusão:** Já existem vários avanços nas terapêuticas capazes de curar a diabetes. No entanto, elas ainda têm muitos inconvenientes associados, como por exemplo a imunossupressão. Por outro lado, existem terapias que são capazes de curar a diabetes que não acarretam imunossupressão, mas a sua aplicação ainda não foi bem-sucedida.

Palavras-Chave: Células β pancreáticas, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, glucagon, insulina.

2. Abstract

Introduction: The pathology of diabetes has a prevalence above 1 million people in our country, according to the latest data from the National Diabetes Observatory. In this work we start by explaining the main aspects of β -cell physiology. Next, the pathological mechanisms underlying DM1 and DM2 are explained, as well as the factors that are already accepted as causes of the disease and the factors that are thought to be possible causes of the disease, these ones are hypotheses that are not consensual yet. Finally, a review is done on therapies with curative potential of the disease, although these one are not available yet in our country.

Objectives: Taking into account the prevalence of this disease in the Portuguese population, the objective of this work is to review the literature on the pathophysiology of the two most frequent types of diabetes (type 1 diabetes and type 2 diabetes) in the β cell perspective and therapeutic target. **Methods:** A systematic review of the medical literature was made from articles taken from Pubmed, published mainly in the last 5 years and from books of this medical specialty. The articles were selected by the relevance of the title and / or abstract according to the theme of the work. **Discussion:** The etiologies of the main types of diabetes are described. A review of β cell physiology and its pathophysiology in diabetes is also made. Finally, a review is made on therapies with curative potential of the disease. Although they are not available in our country, it is already possible to have access to some of these treatments abroad. **Conclusion:** There are already several advances in therapies capable of curing diabetes, but they still have many associated drawbacks, such as immunosuppression. On the other hand, there are therapies that can cure diabetes that do not need immunosuppression, however its application has not been successful until now.

Keywords: Pancreatic beta cells, type 1 diabetes, type 2 diabetes, glucagon, insulin.

3. Introdução

Segundo o observatório Nacional da Diabetes, em 2015, a prevalência da Diabetes em Portugal, foi aproximadamente 13,3%, na faixa etária entre os 20 e os 79 anos, ou seja, mais de 1 milhão de portugueses. (7)

A diabetes caracteriza-se pela incapacidade do organismo em recrutar glicose da corrente sanguínea, sendo esta ação mediada pela insulina. (8) A insulina é uma hormona produzida no pâncreas, sendo essencial para a homeostasia do organismo. (9)

O pâncreas divide-se, histologicamente em duas partes: o pâncreas endócrino e o pâncreas exócrino. (9) O pâncreas exócrino é responsável pela produção de enzimas digestivas, sintetizadas nas células acinares e secretadas no ducto pancreático. (10) O pâncreas endócrino é formado por pequenas glândulas endócrinas, aproximadamente 1 milhão, que estão agrupadas em ilhéus de Langerhans. (9) Estes ilhéus são constituídos por 5 tipos diferentes de células. (9)

As células β e as células α constituem a maior parte do volume dos ilhéus de Langerhans (pâncreas endócrino). As células β participam na biossíntese da insulina, regulando a sua transcrição e tradução. O número de células β também é regulado pelos níveis de insulina. O glucagon é produzido pelas células α e a sua função é manter a glicémia estável em situações de jejum. A insulina além de influenciar os níveis de glicose sanguínea, também interfere nos níveis de glucagon. Assim, tal como a insulina, o glucagon controla os níveis de glicose. Existem ainda outras hormonas e fatores responsáveis pelo controlo das células β pancreáticas, tais como a somatostatina e a grelina. (9)

A porção endócrina do pâncreas é drenada por um sistema porta – sistema porta insulino-acinoso. O sistema porta possibilita a ação local das hormonas nos ácinos do pâncreas exócrino. (2) As hormonas são também transportadas através da circulação sistémica, até aos diversos órgãos alvo.

Segundo a classificação da OMS existem vários tipos de diabetes. A DM2 é a mais frequente, atingindo proporções epidémicas no mundo. Esta resulta, frequentemente, da perda de função e da massa de células β , acarretando muitas vezes insulinoresistência e hiperinsulinemia. (11) A diabetes tipo 1 caracteriza-se pela destruição das células β , causando perda de massa destas células e, conseqüentemente, deficiência absoluta de insulina.

A diabetes é uma doença crónica complexa, cuja terapêutica consiste em tratamentos médicos continuados, associada a estratégias multifatoriais para retardar as complicações da doença. O tratamento da DM1 consiste na insulino-terapia. No entanto, a administração de insulina exógena não consegue mimetizar na totalidade a atividade fisiológica dos Ilhéus de Langerhans. Deste modo, as hiperglicemias mantidas podem levar ao desenvolvimento de complicações microvasculares, como nefropatia e doença renal crónica, retinopatia, neuropatia e complicações macrovasculares, como doença arterial periférica, doença coronária e doença cerebrovascular. O tratamento da DM2 apresenta um maior número de opções, onde se incluem alterações no estilo de vida, tratamento da obesidade e fármacos com variados mecanismos de ação, que pretendem: aumentar a secreção de insulina - sulfonilureias, análogos da meglitinida e derivado da D-Fenilalanina - ou aumentar a sensibilidade hepática à insulina - metformina - ou aumentar a sensibilidade à insulina, não só a nível hepático, mas também a nível do músculo esquelético ou do tecido adiposo - agonistas dos recetores ativados pelos proliferadores dos peroxissomas, PPARs - ou afetar essencialmente a absorção de glicose - inibidores da α -glicosidase - ou mimetizar os efeitos das incretinas ou prolongar a sua ação - agonista do recetor GLP-1 e inibidores do DPP4 - ou reduzir a glicémia, suprimindo o glucagon e retardando o esvaziamento gástrico - pramlintida. (9) Pode ainda ser necessário recorrer à utilização de insulina. (12) Um dos tratamentos atualmente disponíveis para a DM2 baseia-se no papel fisiológico do péptido-1 *glucagon like*, GLP-1. O GLP-1 é produzido pelo intestino como resposta aos alimentos ingeridos, nas

células L-enterogénicas, no íleon e no cólon. (13) Verificou-se que o GLP-1 potencia a secreção de insulina, induzida por glicose - efeito incretina - e pode proteger as células β , permitindo a sua sobrevivência. (14) Conseguem obter-se níveis constantes de GLP-1 através de administrações subcutâneas de análogos de GLP-1, enquanto níveis transitórios e níveis fisiológicos mais baixos de GLP-1 são conseguidos através da utilização inibidores da dipeptidil peptidase 4, IDPP4. A dipeptidil peptidase é uma endoprotease que degrada o peptídeo GLP-1. Ambas as classes terapêuticas, atualmente disponíveis no mercado, conseguem uma normalização da glicemia sustentada e durável. Além disso, em modelos animais, também já se mostrou que promovem a preservação das células beta. Um inconveniente destes fármacos, análogos de GLP-1 e IDPP4, é terem mostrado perder a sua eficácia ao longo do tempo, em alguns pacientes. Até à data, não existem marcadores que consigam determinar esses subgrupos de doentes. Apesar destas terapêuticas, a DM2 possui várias complicações, quer a curto prazo - hipoglicémia, coma hiperosmolar hiperglicémico - quer a longo prazo - complicações microvasculares, a nível oftalmológico, neuronal e renal; complicações macrovasculares, doença arterial periférica, doença coronária e doença cerebrovascular;

Por outro lado, existem estudos que demonstram ser possível curar a diabetes. Para tratar qualquer tipo de diabetes podem substituir-se as células β pancreáticas patológicas por células β saudáveis, regeneradas a partir do mesênquima, ou obtidas por de transplantação.

Tendo em conta a elevada prevalência desta patologia na população portuguesa, pretende-se com este trabalho fazer uma revisão da literatura sobre a fisiopatologia da célula β na diabetes tipo 1 e na diabetes tipo 2 e alvo terapêutico.

4. Materiais e métodos

Foi efetuada uma revisão sistemática da literatura médica do tema do trabalho, tendo sido incluídos artigos científicos, artigos de revisão e livros da especialidade.

Com recurso à base de dados *Pubmed*, foram utilizadas, em várias combinações, as palavras-chave: células β pancreáticas (*pancreatic beta cells*), diabetes tipo 1 (*type 1 diabetes*), diabetes tipo 2 (*type 2 diabetes*), glucagon (*glucagon*), insulina (*insulin*). Foram selecionados os artigos mais recentes, tendo sido, maioritariamente publicados nos últimos 5 anos. Os artigos utilizados foram essencialmente de língua inglesa, mas também foi incluído um artigo em espanhol.

Concluída a pesquisa, os artigos foram filtrados, primeiramente pelo título que apresentavam e, posteriormente pelo conteúdo do resumo, tendo-se avaliado quais eram os artigos que coincidiam com o tema do trabalho.

5. Nota histórica

Pensa-se que a Diabetes *Mellitus* faça parte do grupo das doenças mais antigas da humanidade, tendo as referências mais antigas a esta doença sido feitas pelo povo Egípcio.

(15)

A primeira vez que a insulina foi isolada foi em 1922. (12) Os autores deste feito foram Banting e Best. (12)

A distinção entre os tipos de Diabetes *Mellitus* 1 e 2 foi efetuada em 1936, mas apenas no ano de 1988 a DM2 foi descrita como fazendo parte da síndrome metabólica. (15)

6. Fisiologia da célula β

Na diabetes a capacidade de utilização da glicose, pelas células que utilizam esta fonte de energia, está alterada. (9) Esta utilização é estimulada pela ação da hormona insulina, produzida no pâncreas. (9) O pâncreas divide-se, do ponto de vista histológico em pâncreas endócrino e pâncreas exócrino. (9) O pâncreas exócrino tem como função auxiliar a digestão, secretando moléculas, ao nível das células acinares, que participam na digestão. (2) O pâncreas endócrino é formado pelos ilhéus de Langerhans. (9) Estes ilhéus são constituídos por vários tipos de células: ξ , σ , PP, α e β . (9) Estas células estão dispersas em cada ilhéu de Langerhans, de modo não uniforme (Figura 1). (9)

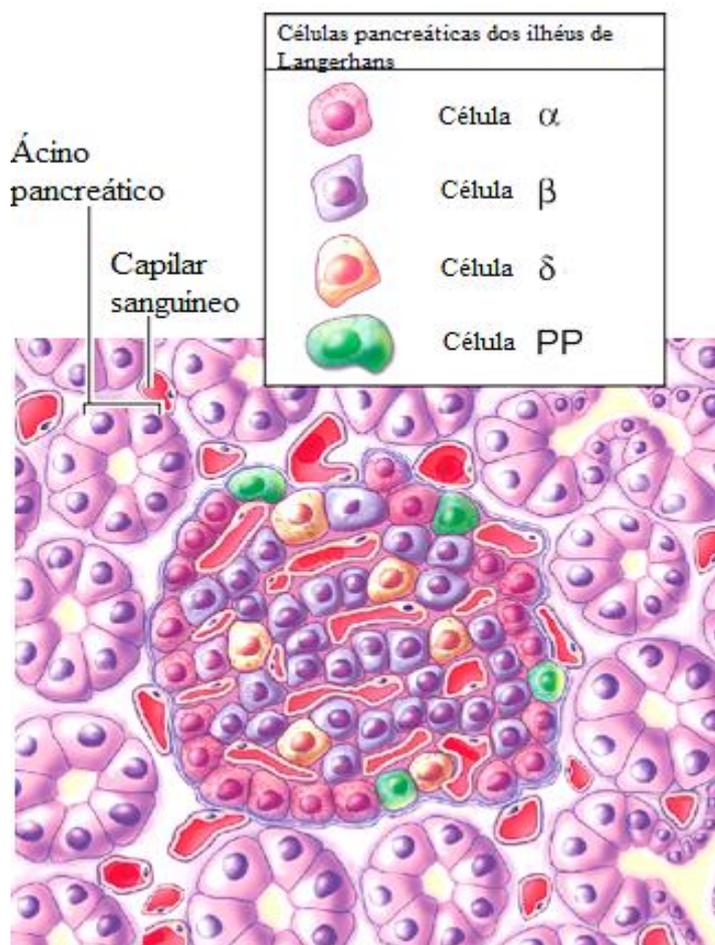


Figura 1 - Células pancreáticas dispersas nos ilhéus de Langerhans, de modo não uniforme. Adaptado de Mescher A. Junqueira's Basic Histology; 2009. (1)

No pâncreas, a insulina é produzida ao nível das células β , sendo importante que a fisiologia da célula β pancreática não esteja comprometida. (8,16) A insulina tem também outras funções tais como regular o número de células β , o que também é muito importante no controlo da glicémia. (3) A secreção de insulina deve-se maioritariamente a estímulos de origem exógena. (9) No entanto, também se verifica produção basal de insulina, em jejum, sem que haja influência de estímulos exógenos, desde que a glicémia seja superior a 80-100mg/dL. (9) As células β , juntamente com as células α constituem a maior porção do pâncreas endócrino. O glucagon é a hormona produzida pelas células α , e a sua função consiste em manter a glicémia estável em situações de jejum. A insulina também interfere nos níveis de glucagon. Assim, tal como a insulina, o glucagon controla a glicémia. (8) Existem ainda outras hormonas e fatores responsáveis pelo controlo das células β pancreáticas, tais como a somatostatina e a grelina. (9)

A porção endócrina do pâncreas é drenada por um sistema porta – sistema porta insulino-acinoso. Este sistema porta possibilita a ação local das hormonas nos ácinos do pâncreas exócrino. (2) Estas hormonas disseminam-se também, através da corrente sanguínea, até aos diversos órgãos alvo.

MIN6, *primary islets* e células β pancreáticas isoladas a partir de humanos e de ratinhos, são alguns dos modelos de células β mais utilizados para estudos *in vitro*. (11)

6.1. Fatores de transcrição

A célula β tem inúmeros fatores de transcrição responsáveis pela expressão de insulina e também pela regulação da sua secreção. (17) Dois exemplos de fatores de transcrição da célula β são o NeuroD1 e o PDX-1. (18)

O fator de transcrição PDX-1 é determinante para a função pancreática, nomeadamente das células β , sendo necessário para a maturação, desenvolvimento, regulação

e manutenção. (17,19) Já foi demonstrado em ratinhos que a sua ausência pode causar diabetes. (17) Na ausência deste fator de transcrição, há menor expressão dos genes antiapoptóticos, verificam-se anomalias no processamento de insulina, o recetor GLP-1 não é expresso e há lipotoxicidade e glucotoxicidade. (17)

6.2. *Metabolic coupling* fatores e estimulação pela glicose, na secreção de insulina

Existem vários fatores capazes de induzir a secreção de insulina na célula β . (9) O fator principal é a glicose. (9) Exemplos de outros fatores de origem metabólica incluem: malato, NADPH, citrato, piruvato, glutamato e acil-CoA. Estes *metabolic coupling* fatores atuam ao nível da mitocôndria. (18)

6.3. Vias de sinalização

As vias de sinalização ligadas à regulação da secreção de insulina são a PKA, a PKC, a PKG e a CaMKII. (17)

O peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo a *glucagon-like 1* (GLP-1) ativam a via PKA. (17) Esta via de sinalização é ativada através da proteína G. (17) A proteína G é composta por subunidades diversas. (17) Existem subunidades que ativam a adenilato ciclase e outras subunidades que a inibem. (17) Quando a adenilato ciclase é ativada, o ATP é convertido em cAMP. (17) O cAMP ativa a PKA e a Epac2. (17) A PKA fosforila várias proteínas, nomeadamente os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L. (17) A via de sinalização Epac também induz a libertação de Ca^{2+} e a exocitose insulina. (18)

A via PKC, tal como a PKA também é regulada pela proteína G. (18) Os ativadores da via PKC são a acetilcolina, a colecistocinina e os ácidos gordos. (17) A PKC é ativada pela

molécula DAG. (18) A DAG é obtida aquando a ativação da PLC. (18) Com efeito, a ativação da PLC origina DAG e também IP3. (18)

A PKG é ativada pela cGMP, além de poder fosforilar muitas moléculas, é responsável por ajustar a concentração de cálcio intracelular. (18) O cálcio intracelular é regulado, principalmente mediante o encerramento dos canais KATP. (18)

A proteína CaMKII encontra-se dentro dos grânulos secretores de insulina e tem como função fosforilar várias proteínas. (18)

6.4. Secreção de insulina

Ao nível do núcleo da célula β existem fatores de transcrição que aumentam a transcrição do mRNA de insulina. (9) Após a síntese do mRNA de insulina, este sai do núcleo para o citoplasma (Figura 2). (20) No citoplasma, o mRNA dirige-se para o retículo endoplasmático rugoso. (2) No retículo endoplasmático rugoso é secretada a molécula de pré-pró-insulina. (2) Ainda no retículo endoplasmático rugoso, ocorre a clivagem da sequência sinal, formando-se pró-insulina, pelas enzimas microsomias. (9,2) A pró-insulina é formada pelos 3 componentes que ainda restam da molécula de pré-pró-insulina: as cadeias A e B e o péptido C. (2) As cadeias A e B estão ligadas entre si por pontes de dissulfeto. (2) A pró-insulina é armazenada numa vesícula secretora, revestida por clatrina. (9) Esta vesícula secretora contém uma protease específica. (20) Esta protease tem como função clivar o péptido C das cadeias A e B. (9,21) A reação correspondente ocorre no interior da vesícula secretora. (9) Além disso, a maturação da insulina exige a perda de revestimento com clatrina. (9) As vesículas de insulina maduras contêm insulina, péptido C e uma pequena quantidade de pró-insulina. (9) Estas vesículas são, após estimulação, libertadas da célula, por exocitose, para a corrente sanguínea. (2)

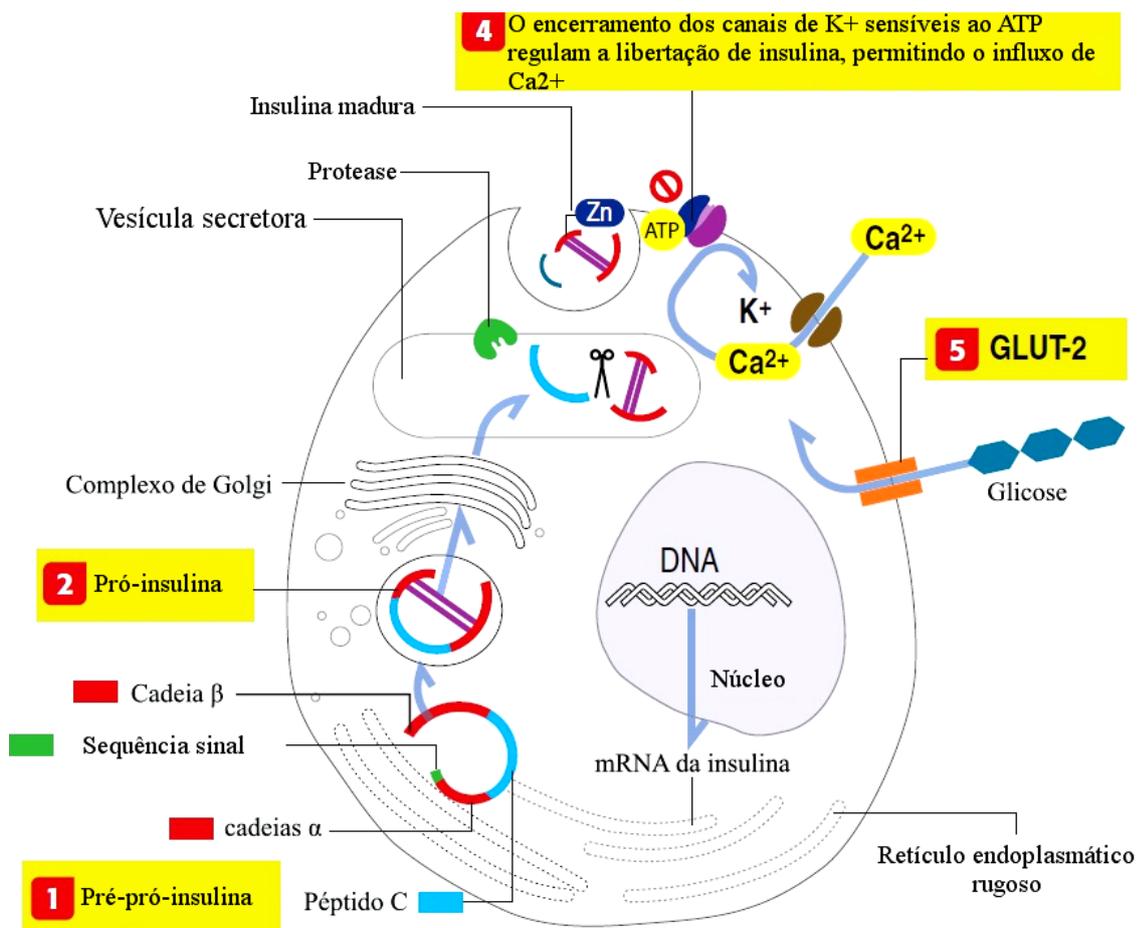


Figura 2 - Secreção de insulina na célula β pancreática. Adaptado de Abraham L Kierszenbaum, *et al*; 2015. (2)

A glicose é uma das moléculas que ativa a expressão de insulina. (12) Para tal glicose entra nas células β pancreáticas através dos transportadores GLUT 1 (em humanos) ou GLUT2 (em ratinhos), pois todas as células necessitam de um recetor para que a glicose consiga entrar para o meio intracelular. (2,17) O GLUT 1 está presente em todos os tecidos do organismo humano. (9) Adicionalmente, ao nível do fígado e do rim, a glicose também pode entrar na célula através do transportador de Na⁺, dependente de energia. (9) Já dentro das células, a glicose transforma-se em glicose-6-fosfato, pela glucocinase. (21) Posteriormente a glicose-6-fosfato é oxidada pela mitocôndria, com produção de ATP. (21) Além disso, também é formado ATP pelo ciclo de Krebs, através da glicólise. (17) Este ATP leva a que os

canais ATP-dependentes, que são dependentes de potássio, canais K_{ATP} , encerrem. (17,21) Estes canais são constituídos por subunidades do recetor de sulfonilureia (SUR1) e subunidades do retificador interno do canal de K^+ , Kir6.2. (2,17) Assim, dá-se a despolarização da membrana celular. (8) Posteriormente há entrada de sódio (Na^+) e de cálcio (Ca^{2+}) para o meio intracelular, mais concretamente, para os canais de cálcio do tipo L, dependentes de voltagem. (17) Este aumento do cálcio com origem extracelular, além do cálcio mobilizado de origem intracelular, fazem com que os grânulos secretores contendo insulina se fundam com a membrana celular, originando libertação de insulina na corrente sanguínea. (2,17) A primeira fase de secreção de insulina é rápida, sendo estimulada pelo Ca^{2+} . (17) Nesta fase ocorre a mobilização de grânulos de insulina para a membrana plasmática. (17) Ainda na primeira fase da secreção de insulina, são produzidos metabolitos que promovem a segunda fase da secreção de insulina, como por exemplo o glutamato. (17) São também ativadas, na primeira fase, algumas vias de sinalização celular como a via da PKA e a via da PKC, que promovem o aumento ou, simplesmente mantém a secreção de insulina. (17)

Por outro lado, a fase seguinte, ou seja, a segunda fase de secreção de insulina, é lenta. (17) A segunda fase de secreção de insulina não se concentra na reserva de grânulos secretores de insulina que se ligam a membrana plasmática. (17) Os grânulos que se ligam à membrana plasmática são imediatamente libertados, durante a primeira fase da secreção de insulina, em resposta ao Ca^{2+} . (17) Por sua vez, a segunda fase de secreção de insulina envolve um outro grupo de grânulos secretores de insulina que estão no citoplasma, que representam 94% dos grânulos totais. (17) Na segunda fase de secreção de insulina, os grânulos citoplasmáticos, são transformados em grânulos de insulina que se ligam à membrana plasmática, para que possam ser libertados, num processo designado “priming”. (17) A segunda fase é ativada pelo cAMP, ATP e Ca^{2+} produzidos. (17)

7. Sobrevivência, proliferação e diferenciação das células β

Os níveis de insulina na corrente sanguínea dependem da *clearance* desta hormona e da quantidade de insulina que é produzida e posteriormente secretada nas células β . (16) Assim os níveis de insulina dependem, entre outros fatores da normal fisiologia da célula β , previamente referida, e do número de células β . (16) Reciprocamente, a insulina também influencia a célula β . (1,8) Existem vários estudos que evidenciam o papel autócrino da insulina, quer na sobrevivência, quer na função das células β , tal como se observou num estudo com uma linhagem celular secretora de insulina (MIN6), sendo os efeitos autócrinos obtidos através da via de sinalização PI-3K. (3,17) No entanto estes resultados foram contrariados, em primatas (macaco-vervet). (3) Recentemente, descobriu-se uma nova hormona, a betatrofina, que tem um papel importante na replicação das células β , através de sinais metabólicos e celulares. (22) Quando a insulina se liga aos recetores de tirosina-cinase das células β pancreáticas, promove a sua autofosforilação - regulação autócrina. (3) Posteriormente a tirosina fosforila algumas proteínas, tais como a IRS. (17) Estas proteínas vão depois levar à ativação de uma cascata na qual é primeiramente ativada a molécula PI-3K, seguindo-se as moléculas PDK e Akt, de forma sequencial. (17) A via de sinalização PI-3K estimula a proliferação e protege contra a apoptose. (8,17)

7.1. A massa de células β

A massa de células β tem em conta o número de células β e o tamanho destas células. (17) Este valor é obtido através de um equilíbrio entre a apoptose, a neogénese, a hipertrofia e a proliferação (Figura 3). (3,17)

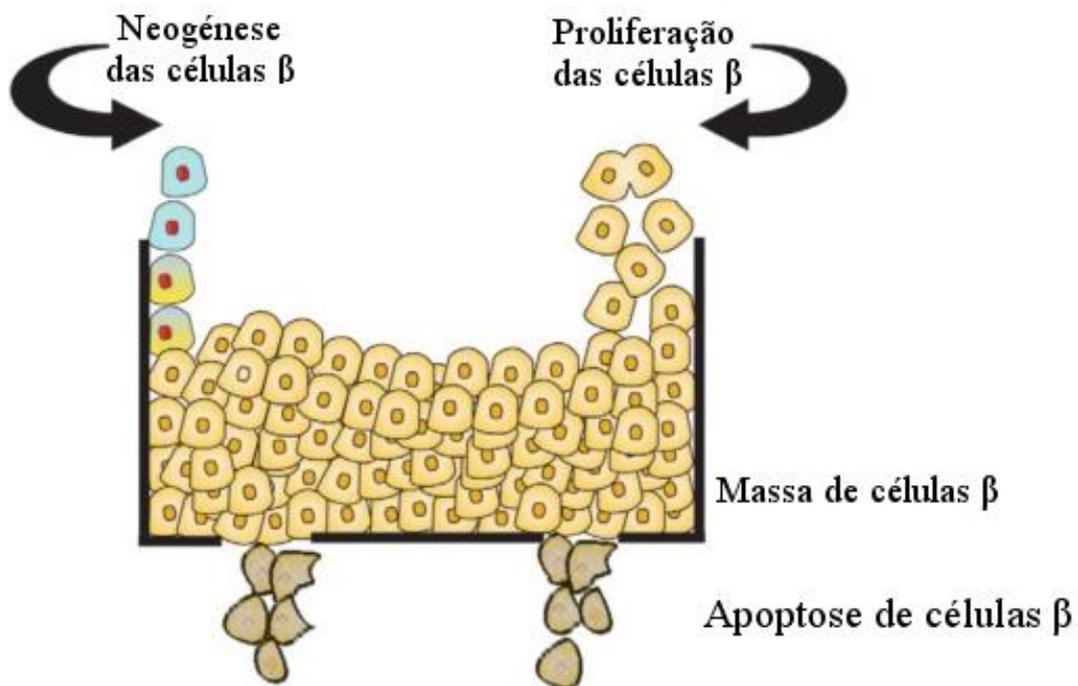


Figura 3 - Fatores que influenciam a massa de células β . Adaptado de Khadra A, *et al*; 2015. (3)

7.2. Fatores que aumentam a massa da célula beta

Além de induzir a secreção de insulina, a glicose induz a proliferação de células β , ou seja, a glicose aumenta a massa de células β . (23) Segundo estudos, em períodos de hiperglicemia prolongada, é necessário que haja neogênese para que as células β se possam expandir. (3) Modelos matemáticos mostraram que a massa de células β depende, além da glicemia, das flutuações da glicemia: verificou-se que não há alteração das células β no caso da glicemia ser constante. (3) Portanto, a hiperglicemia moderada leva a proliferação das células β - estado estacionário saudável. (3) Por outro lado, a hiperglicemia acentuada induz diminuição das células β - estado estacionário patológico. (3) Existem outros estudos que mostram que, em ratinhos infundidos com glicose, apesar da quantidade de células β do ducto se ter aproximadamente mantido, houve um aumento de 70% na massa de células β , em células acinares, no dia 3 a 4, de infusão de glicose. (3) Também se verificou que a massa de células β aumentava em ratinhos expostos, durante alguns dias, a uma dieta rica em gorduras.

(3) Por outro lado, em ratinhos infundidos com solução salina, as células β mantiveram-se constantes nos dois grupos. (3) Outros estudos também concluíram que as células β se moldam às exigências metabólicas. (3) A neogênese pode ser obtida a partir de células estaminais ou progenitoras, através de sinais que induzem a diferenciação e de sinais mitogénicos. (19) Estas células podem ser obtidas da medula óssea, dos ductos pancreáticos e dos ilhéus de Langerhans. (3) No entanto, a massa de células β , obtida através da neogênese, no adulto, é limitada. (17,24) É essencialmente através da proliferação e da hipertrofia que a massa das células β , no adulto, aumenta. (17) A replicação destas células, nos adultos, é muito lenta. (3) A replicação das células β pancreáticas em ratinhos é induzida por fatores intracelulares e extracelulares. (3) Um exemplo de um fator intracelular é Akt. (3) Esta molécula, regula a proliferação, o metabolismo, o crescimento e a sobrevivência celular. (17)

Relativamente à velocidade de replicação, esta aumenta na fase inicial da diabetes, em ratinhos EAD e NOD. (3) Quando foram tratados com insulina, tendo a glicose atingido valores normais, a velocidade de replicação diminuiu. (3) Estudos demonstram que a massa de células β decresce mais rapidamente na fase de pré-diabetes. (16) Na fase de diabetes, quando a doença é detetada, apesar de haver diminuição da massa de células β e da sua função estar comprometida, a quantidade de insulina produzida e secretada não diminui, o que acarreta exaustão das células β . (16) Quando a DM1 está na fase inicial, se for administrada insulina a estes doentes, verifica-se que há uma remissão praticamente completa da doença – fase da lua de mel. (16)

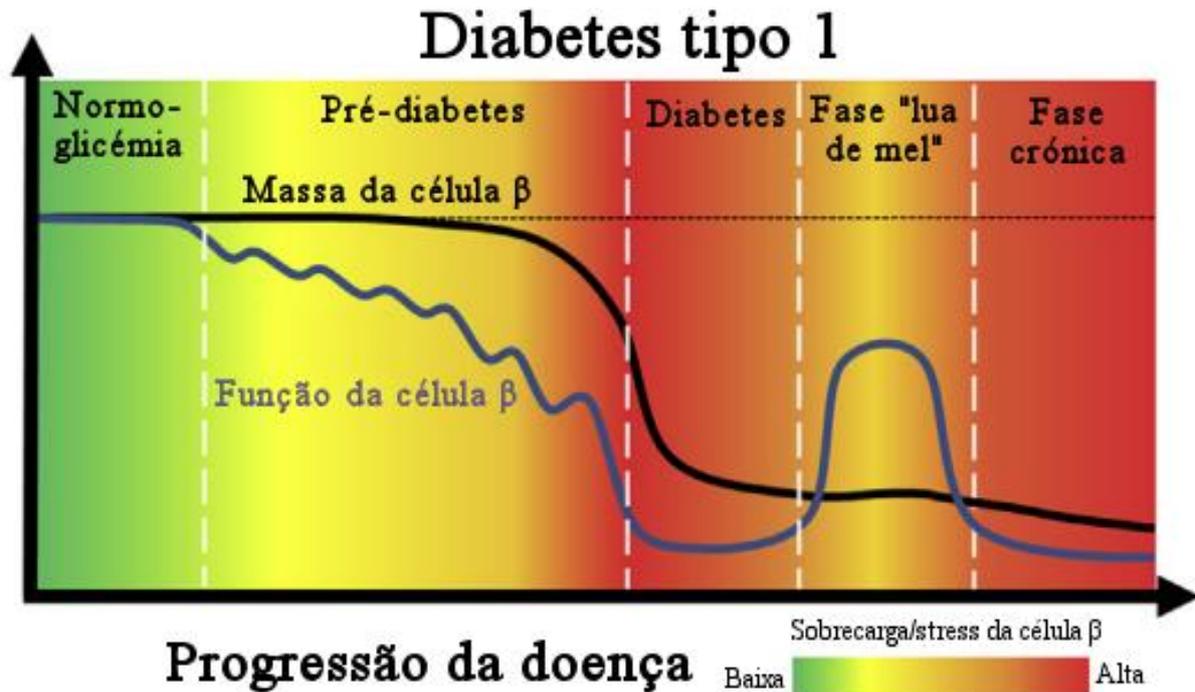


Figura 4- Evolução da massa e da função das células β , com a progressão da DM1. Adaptado de Chen C, *et al*; 2017. (16)

7.3. Fatores que promovem a perda de função e massa da célula beta

O *turnover* das células β afeta a sua longevidade: a diminuição da vida útil das células β pode diminuir a massa de células β . (3) Além disso, o *turnover* das células β e a idade do indivíduo podem influenciar o desenvolvimento e a progressão para DM2. (3,25) Com efeito, com a idade, a funcionalidade da célula β modifica-se. (3) Nomeadamente, a secreção de insulina nos humanos, vai decrescendo. (3) Esta anomalia na funcionalidade da célula β pode ser influenciada por diversos fatores, como anomalias a nível mitocondrial, radicais livres e a via de sinalização de insulina /IGF1. (3)

Verificou-se que o aparecimento da diabetes do tipo 1 coincide com a diminuição da massa de células β cerca de 70% a 80%, acreditando-se que esta redução se deva à insulite. (16,21) Na insulite há uma infiltração dos ilhéus de Langerhans por parte dos linfócitos T. (9) No entanto, a massa de células β , na altura em que a doença aparece varia entre indivíduos, de

acordo com a idade e com as características da insulite. (16) Pensa-se que a apoptose pode originar os mecanismos autoimunes desta doença. (17) A apoptose pode ser de carácter fisiológico, ou patológico. (17) A apoptose de carácter patológico deve-se a infeções víricas ou citocinas que levam a um grande número de proteínas *misfolded*, desencadeando *stress* ao nível do RE. (17)

Na DM2, a perda de massa de células β deve-se essencialmente ao estado estacionário patológico, devido a hiperglicemia acentuada, como referido anteriormente. (3)

8. Fatores que estimulam a libertação de insulina

Os fatores envolvidos na secreção de insulina são múltiplos e podem organizar-se em 3 categorias (Tabela 1). (9) Os fatores estimuladores induzem a secreção de insulina de forma direta. (9) O grupo dos amplificadores, aumenta a resposta da célula β face à glicose. (9) O grupo dos inibidores, impede a libertação de insulina. (9)

Estes efeitos na secreção de insulina são conseguidos através de diversos mecanismos. Os aminoácidos, por exemplo, estimulam a secreção de insulina, através do aumento de ATP, produzido no ciclo de Krebs, ou através do aumento da concentração de cálcio intracelular. (17) Dos fatores que estimulam a libertação de insulina, a glicose é o principal. (8)

Tabela 4 - Regulação da libertação de insulina. (9)

Estimulantes de libertação de insulina	Amplificadores da libertação de insulina, induzida por glicose	Inibidores da libertação de insulina
Glicose Aminoácidos: Leucina. Neuronal: estimulação vagal, acetilcolina. Fármacos: sulfunilureia, meglitinidas.	Hormonas entéricas: GLP-1, GIP, colecistocinina, gastrina e secretina. Neuronal: efeito β -adrenérgico das catecolaminas. Aminoácidos: arginina. Fármacos: agonistas GLP1.	Neuronal: efeito α -adrenérgico das catecolaminas. Humoral: somostatina. Fármacos: diazóxido, tiazídicos, β -bloqueadores, clonidina, fenitoína, vimblastatina, colchicina.

8.1. Diabetes tipo 1

A DM1 é uma doença crónica em que a produção endógena de insulina está comprometida, havendo uma deficiência acentuada de insulina. (12) Esta patologia caracteriza-se também, pelo fato de a hormona glucagon apresentar níveis superiores ao normal, pela ausência de resposta a alguns fatores que induzem a libertação de insulina, por parte da célula β e também por alterações no metabolismo dos lípidos. (9) Como a produção de insulina não é eficaz, há incapacidade de captação de glicose, o que induz erradamente um aumento do catabolismo pelos três principais locais onde a insulina atua: fígado, músculo e tecido adiposo. (8,9,16) Este catabolismo, tem como objetivo aumentar a glicose disponível, mas como foi mencionado a fisiopatologia da doença baseia-se em anomalias a outro nível. (9)

A DM1 pode subdividir-se em dois subtipos. (26) A classificação do tipo de diabetes em causa é importante no sentido de orientar o tratamento do doente, contudo, esta classificação da doença nem sempre é evidente. (26) A DM1 imunomediada define-se pela presença de um ou mais marcadores autoimunes (Figura 5). (26) Se a etiologia da DM1 não for de carácter autoimune, designa-se DM1 idiopática, sendo este tipo muito mais raro. (26)

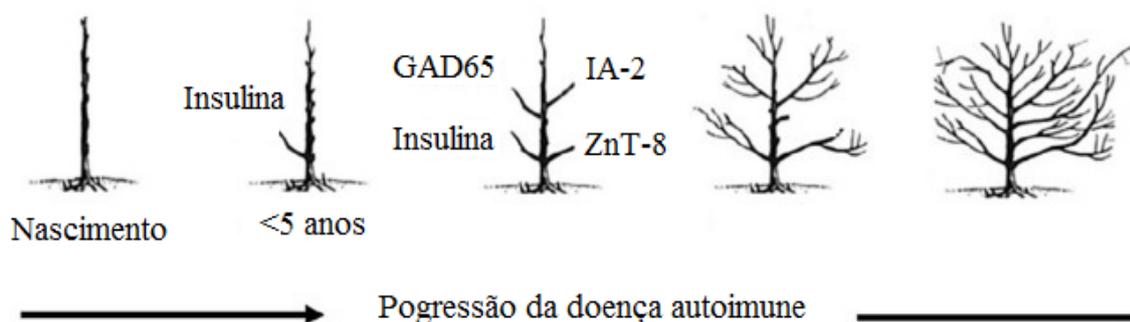


Figura 5 - Aumento dos autoantígenos durante a evolução da DM1. Adaptado de Morran MP, *et al*; 2015. (4)

Os marcadores autoimunes são anticorpos contra os ilhéus de Langerhans e autoanticorpos contra o GAD65, a tirosina fosfatase IA-2 e IA-2b e o ZnT8. (26) Estes anticorpos provocam a destruição das células β , não diretamente, mas através da insulite. (9) A destruição das células β origina a deficiência de insulina. (26) Histologicamente, a DM1 imunomediada, caracteriza-se por expressão aumentada de antígenos do complexo HLA, classe I ou antígenos do complexo HLA da classe II, nos ilhéus de Langerhans (Figura 4). (12) A etiologia de DM1 imunomediada relacionada com moléculas do complexo HLA da classe II é mais rara e é uma hipótese controversa. (12)

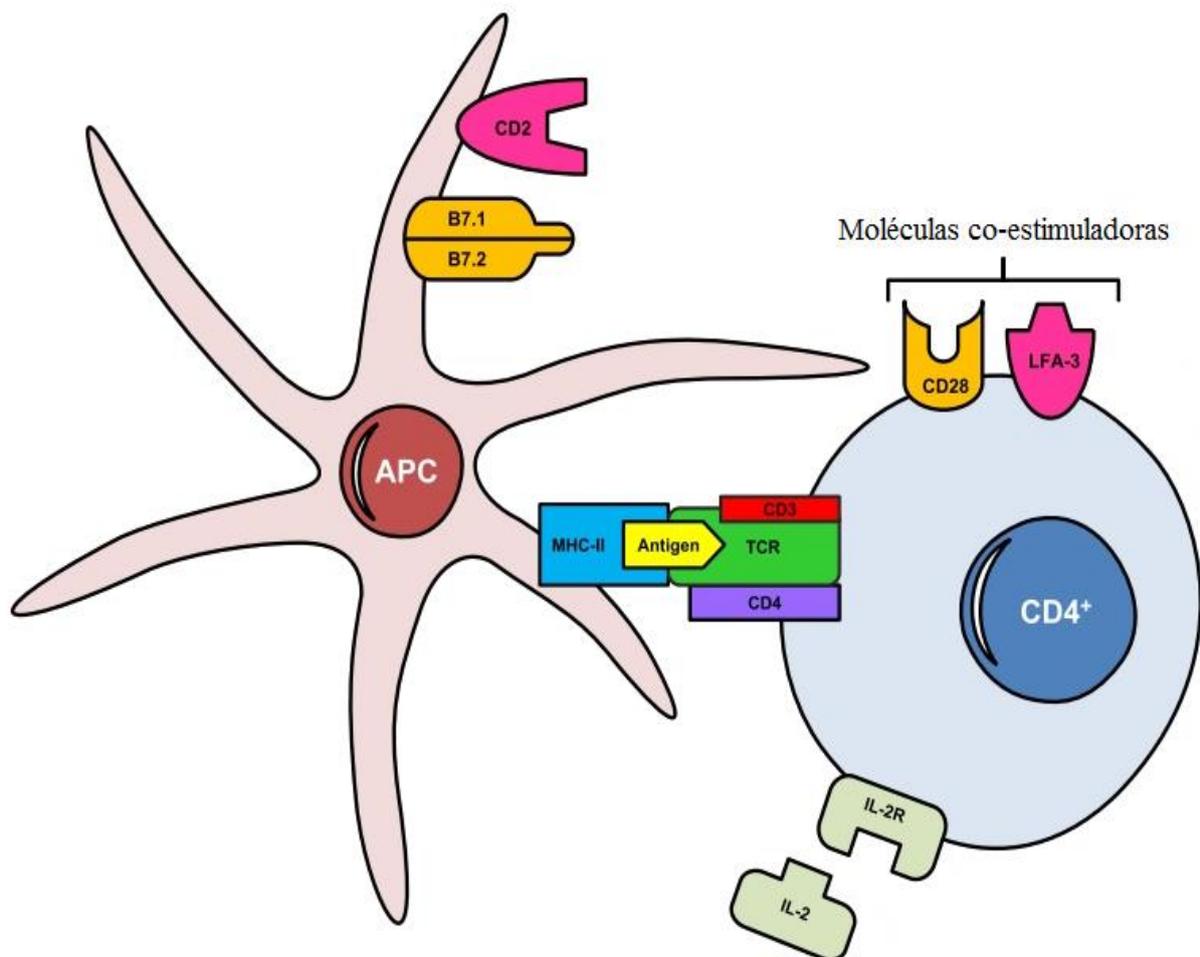


Figura 6 - Função das moléculas MHC II em resposta a um autoantígeno. Adaptado de Morran MP, *et al.* 2015. (4)

Além disso, ao nível dos ilhéus de Langerhans, há expressão de IFN- α e a expressão de Fas está aumentada. (12) O IFN- α é um grupo de citocinas produzidas na sequência de uma infecção viral ou de outro agente desencadeante de uma resposta autoimune. (27) O recetor Fas é uma proteína transmembranar pró-apoptótica. (28) As células T que na sua membrana apresentam ligantes destas Fas podem desencadear a morte celular dos ilhéus de Langerhans por apoptose. (17,28) Análises genéticas da DM1 imunomediada atribuíram ao complexo HLA, principalmente a alelos de classe II (mutações na proteína reguladora da autoimunidade (AIRE) que nos humanos é codificada pelo gene AIRE), a existência de suscetibilidade para esta doença. (12) Os antígenos virais também podem ser responsáveis pela autoimunidade das células β . (12)

A DM1 idiopática é um distúrbio que se caracteriza pela propensão à cetoacidose. (9) Pode resultar de fatores ambientais desconhecidos, associados a defeitos de cariz genético na célula β . (9)

Os modelos de ratinhos mais utilizados nos estudos da DM1 são BB, NOD e EAD. (12,3)

8.1.1. Fatores genéticos

Acredita-se que existem muitas formas genéticas de DM1 imunomediada, que estão codificadas dentro do locus MHC (Tabela 2). (9,4) Destes genes, os mais importantes codificam haplótipos da molécula HLA classe II DQ e DR. (9) Entre as formas genéticas de DM1, existem várias formas monogénicas. (12) Ainda há muitas formas genéticas de DM1 imunomediada que continuam por identificar. (12)

Provavelmente, nestas doenças há uma perda de tolerância aos próprios antígenos. (29)

Tabela 5 - Formas genéticas da DM1, associadas a síndromes. (12,29)

Forma genética de DM1	Genética	Incidência	Prevalência de DM1	Doenças autoimunes associadas	Altura de início
Síndrome poliglandular autoimune tipo I	gene AIRE	<1:100000/ano	2-33%	hipoparatiroidismo (80-85%) doença de Addison (60-70%) hipogonadismo (12%) doença autoimune da tiroide (10%) candidíase mucocutânea (70-80%) hepatite autoimune gastrite autoimune alopecia areata vitiligo queratoconjuntivite	infância
Síndrome poliglandular autoimune tipo II-IV	Poligénica	1-2:100000/ano	40-60%	doença autoimune da tiróide (70-75%) doença de Addison (40-50%) hipoparatiroidismo (0-5%) hipogonadismo (0-3%) hipopituitarismo (0-2%) gastrite autoimune anemia perniciosa neurodermite alopecia areata miastenia gravis lúpus eritematoso sistémico artrite reumatoide hepatite autoimune	Idade adulta
Síndrome de imunodesregulação, poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao X	Ligada ao X (FOXP3)	Extremamente rara	80%	doença autoimune da tiroide (25%) má absorção doenças autoimunes dermatológicas esclerose múltipla	infância

8.1.1.1. Suscetibilidade genética de carácter autoimune

As moléculas da classe II são moléculas apresentadoras de antígenos. (9) Esta capacidade é possível, em parte, pela composição das cadeias α e β em aminoácidos. (9,4)

Substituições em uma ou em duas regiões críticas podem diminuir ou aumentar a ligação de autoantígenos, aumentando a suscetibilidade para a DM1. (4)

A grande maioria dos doentes com DM1 (90%) são portadores do HLA-DR4, DQB1*0302 (também conhecido como DR3/4-DQ8/2) e/ou HLA-DR3, DQB1*0201 (também conhecido como DR3-DQ2) contra 40% dos controles com outro haplótipo. (12,4) Existem ainda alguns genes cujas variantes aumentam o risco de diabetes, nomeadamente HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1. (30) Existem indivíduos com certas variações destes genes, ou seja, determinados haplótipos, que têm risco muito aumentado de desenvolver diabetes do tipo autoimune (Tabela 3). (30) Estes genes codificam proteínas cujo papel é fundamental no sistema imunológico. (30) Os genes anteriormente mencionados fazem parte de um grupo de genes designados sistema antígeno leucocitário humano (HLA). (9,30) No entanto, destes indivíduos, apenas uma percentagem muito reduzida, 5%, desenvolve a doença. (30) Pelo contrário, existem outros haplótipos que sugerem ser protetores. (9,30)

Existem referências de estudos feitos em amostras de HLA de indivíduos que são familiares em primeiro grau, de doentes com DM1 e estudos dessas amostras na restante população, que mostram que os indivíduos familiares em primeiro grau de doentes com DM1, acarretam maior risco de DR3 / DR4 (ou DQ2 / DQ8), relativamente à restante população. (4) Ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais os genes da classe II podem influenciar a proteção ou a suscetibilidade para a DM1. (4)

Tabela 3 - Risco de diabetes de acordo com ao vário haplótipos. (9,12)

	DQA1	DQB1	DRB1
Alto risco	0301	0302 (DQ8)	0401 ou 0403 ou 0405
	0501	0201 (DQ2)	0301
Risco moderado	0401	0402	0801
	0301	0302	0404
	0101	0501	0101
	0301	0303	0901
Proteção moderada	0301	0302	0403
	0201	0201	0701
	0501	0301	1101
Proteção forte	0102	0602 (DQ6)	1501
	0101	0503	1401
	0201	0303	0701

8.1.1.2. Susceptibilidade genética determinada por genes não-MHC

Estes polimorfismos são responsáveis por causar DM1 autoimune. (4) Incluem a insulina, o gene PTPN22, o antígeno 4 dos linfócitos T (CTLA-4), a helicase induzida por interferão, o recetor de IL2 (CD25), um gene de tipo lectina (KIA00350), o gene ERBB3e, e um gene indefinido em 12q). (4)

8.1.1.2.1. Imunidade ao nível dos ilhéus pancreáticos de Langerhans

Já foram identificados alguns antígenos que podem ser causadores de DM1, estes aparecem meses a anos antes do início da doença. (11) A DM1 progride para um estado crónico, partindo de um estado inicial. (4) No estado crónico há um número elevado de autoantígenos que reage com células T e com autoanticorpos. (4) Há evidência que a

resposta, a nível destes ilhéus, contra os variados anticorpos se associa à manifestação da doença. (4) No entanto, esta resposta não é causada diretamente pela atuação destes anticorpos nos ilhéus de Langerhans. (9) Em vez disso, os ilhéus de Langerhans sofrem destruição devido a insulite. (9) Assim, a presença destes autoanticorpos nos ilhéus de Langerhans pode ser determinada para efeitos de diagnóstico e previsão do risco de DM1 imunomediada. (9)

Dos autoantígenos identificados, os melhor caracterizados foram: insulina, autoantígenos dos ilhéus de Langerhans 69 kDa (ICA69), o GAD65 e o GAD67, o ICA512 (IA-2) e IA-2 β , ZnT8 (Slc30A8), cromogranina A (ChgA), a proteína Hsp60, Carboxipeptidase H, Gangliosídeo GM2-1, Imogénio 38 (38 kDa), Glima 38 e periferina. (4)

À partida, a autoimunidade não deveria ocorrer visto que no timo do hospedeiro e também na medula óssea os autoantígenos são eliminados. (9,4) Por outro lado, existe ainda um mecanismo que reabilita as células T citotóxicas ou células T auxiliares autorreativas que não tenham sido detetadas pelo timo. (9) No entanto, as moléculas do hospedeiro de natureza proteica e os ácidos nucleicos, sofrem modificações constantes devido a eventos de carácter fisiológico. (4) Dessas modificações a mais importante é a citrulinação. (4) A citrulinação é um evento pós-tradução, com objetivo desconhecido em que há uma substituição molecular de uma arginina por uma citrulina. (4) A deteção de anticorpos contra proteínas citrulinadas é útil no campo das doenças autoimunes, para esclarecer os efeitos do ambiente na carga genética. (4) Na DM1, ao nível das células β , são gerados péptidos, na sequência de processamento de moléculas, por exemplo, o processamento de insulina. Os péptidos gerados sofrem processamento adicional ou são apresentados às células T reativas pelas células apresentadoras de antígenos. (4)

8.1.1.2.2. Autoanticorpos contra a insulina

A insulina além das suas funções fisiológicas, também tem um papel patológico na DM1 de outro ponto de vista: é um autoantígeno da DM1. (4)

Verificou-se que há maior risco de desenvolver doença agressiva em jovens (antes dos 5 anos) cujos autoanticorpos IAA se apresentam em grande concentração (acima de 2000nU/ml). (4) Em contraste, se os indivíduos possuírem níveis detetáveis de IAA, depois dos 15 anos de idade, a probabilidade de desenvolverem DM1 é inferior a 50%. (4) Existe um estudo que comprova que os IAA são quase sempre o primeiro autoanticorpo contra os ilhéus de Langerhans a aparecer, na DM1. (4) Além disso, o IAA é bom marcador para avaliar a progressão da doença, em crianças que são seguidas desde o nascimento. (4) No entanto, em doentes com DM1, verifica-se que geralmente existem níveis baixos de insulina, devido à destruição das células β , mesmo quando a DM1 não é imunomediada. (9)

8.1.1.2.3. Autoanticorpos IA-2 (ICA512)

Trata-se de uma molécula neuroendócrina, membro da família da tirosina fosfatase, sendo enzimaticamente inativa. (31) É um membro envolvido na regulação da secreção de insulina. (4) Pesquisas sugeriram que a presença de autoimunidade humoral contra os domínios, quer extracelular, quer intracelular da molécula, está relacionada com um risco elevado de desenvolver DM1 num menor período de tempo. (4)

8.1.1.2.4. Autoanticorpos contra o ZnT8

Este autoanticorpo é um membro da família dos transportadores de zinco. (4) Embora também seja expresso em células extrapancreáticas, é nas células intrapancreáticas que tem maior expressão. (4) A sua função na célula β é muito importante. (4) O zinco é necessário para o armazenamento de insulina e facilita a difusão de catiões. (4) Observam-se níveis

aumentados de pró-insulina, redução da transcrição de enzimas de processamento de insulina, grânulos de insulina com anomalias, intolerância à glicose, acumulação celular de Zn reduzido e diminuição secreção de insulina estimulada por glicose, na primeira fase, no caso de haver uma deleção de ZnT8 ao nível das células β . (4)

Verificou-se que o transportador de Zn apresentava autoanticorpos para uma percentagem de doentes saudáveis (inferior a 2%), e menos de 3% dos diabéticos tipo 2 e até 30% dos doentes com outras patologias de cariz autoimune associadas à DM1. (4) O maior grupo para o qual o transportador de Zn apresentava autoanticorpos, 60% a 80%, foi nos doentes com diabetes de novo. (4) Em 26% dos indivíduos com DM1 que apresentavam anticorpos ZnT8, não foram encontrado outros autoantígenos comuns como descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), tirosina fosfatase (IA-2) ou dos Ilhéus de Langerhans (ICA). (4) Além disso, já foram descobertos polimorfismos neste transportador de zinco que constituem autoantígenos da DM1. (4) Os dois polimorfismos mais comuns na DM1 são o Trp325 (W) e Arg325 (R). (4)

8.1.2. Fatores ambientais

O aumento da incidência da DM1 nos países industrializados, com uma concordância pequena (inferior a 60%) em gémeos monozigóticos, levou a um crescimento da importância atribuída aos fatores ambientais. (11) Os fatores ambientais descritos incluem micróbios, vírus, fatores psicossociais, fatores alimentares (exposição tardia ao glúten, amamentação versus fórmula infantil, fórmula de leite hidrolisado versus fórmula infantil convencional e deficiência em vitamina C, antropométricos, idade materna e POPs. (9,12,24,32) O envolvimento do sistema gastrointestinal na DM1, relaciona-se com a afeção flora intestinal ou com evidência de autoimunidade ao nível dos ilhéus de Langerhans. (12) Estudos realizados em ratinhos NOD, mostram que modificações na flora intestinal reduzem ou

evitam a ocorrência de DM1. (11) Os fatores alimentares identificados como causadores de diabetes, através de estudos realizados em bebês, incluem a introdução precoce de leite bovino e a introdução precoce de cereais (sendo mencionado, concretamente, um período inferior a 3 meses, como sendo considerado precoce), estes estudos carecem de comprovação. (12) Também existem estudos que associam a infecção por vírus entéricos com o risco de desenvolver DM1, mas, estes resultados são também contraditórios, entre a comunidade científica. (12,4) No entanto, em modelos animais há vários fatores ambientais capazes de provocar a doença, que já foram descritos: a infecção pelo vírus Kilham de ratinhos, em ratinhos BB-DR ou a injeção com ácido polinosínico-policítidílico. (12) Os vírus conseguem desencadear/induzir diabetes em modelos animais, quer através de destruição direta das células beta, quer causando infecção e/ou desencadeando um ataque autoimune contra essas células. (4) No entanto, o único fator ambiental que se provou ser capaz de aumentar o risco de desenvolver DM1 foi a rubéola e apenas a infecção de origem congénita. (12)

Como já foi referido, verificou-se, em muitas populações, um rápido aumento da incidência de DM1. (12,4) Considera-se que os fatores que impedem o desenvolvimento estão a diminuir ou os fatores que induzem a diabetes estão a aumentar. (12,4) Com efeito, existe uma teoria, denominada hipótese da higiene, que relaciona o aumento das doenças imunológicas, com a melhoria nas condições do saneamento. (9,4)

Existem estudos que revelam haver uma associação entre as quantidades séricas de bifenilos policlorados (POPs) e o desenvolvimento de DM1. (11) Um desses estudos sugere que a exposição a este POP pode causar aumento dos níveis séricos do anticorpo anti-GAD, comparativamente aos controlos. (11) Outro POP, a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, revelou apresentar efeitos tóxicos nas células β pancreáticas, em ratinhos. (11) Um dos efeitos patológicos desencadeados pela 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina foi a libertação excessiva de insulina, até à exaustão das células β pancreáticas. (11) Pelo contrário, estudos em ratinhos

NOD expostos a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina posteriormente a estes apresentarem insulite, revelaram que este composto pode evitar a DM1, através da redução da insulite. (11) A redução da insulite é conseguida através do aumento dos linfócitos T supressores no pâncreas. (11) Este tipo de linfócitos T possibilita a aquisição de uma imunotolerância, sem que se verifique imunocompetência. (33)

A DM1 é uma doença previsível quando são tidas em consideração as características genéticas, imunológicas e metabólicas de um indivíduo. (12)

8.2. Diabetes tipo 2

A hiperinsulinemia e a resistência à insulina são as grandes características da DM2. (25,34) Este tipo de diabetes apresenta também defeitos na secreção de insulina. (9,12) Mesmo nos casos em que há uma resistência acentuada à insulina, a DM2 só surge quando a secreção da insulina está alterada. (25)

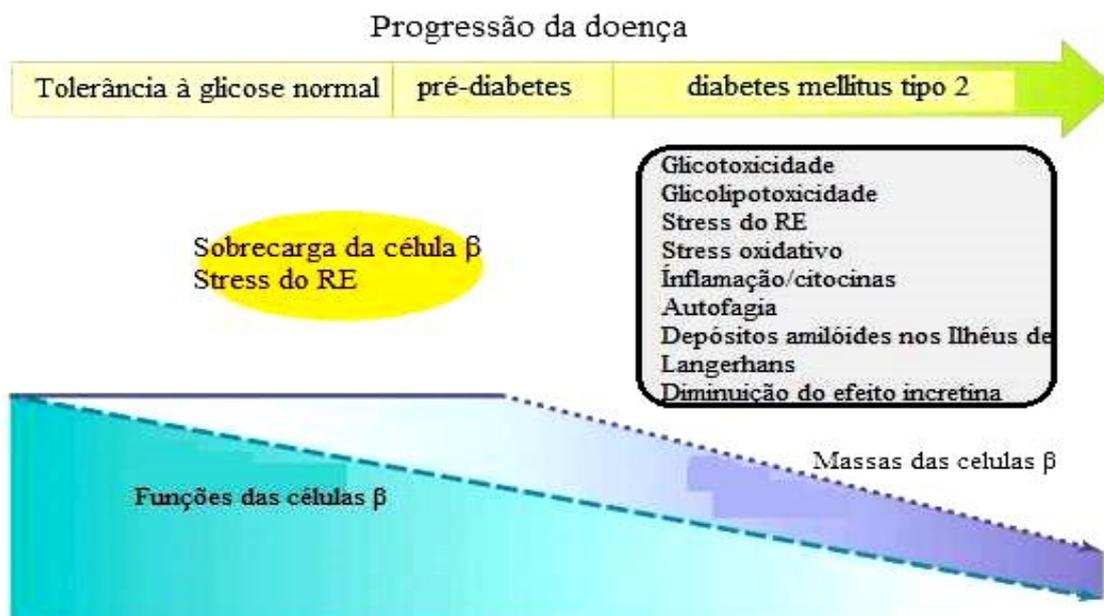


Figura 7 - Alterações na função e na massa das células β , ao longo da DM2 e suas causas.

Adaptado de Chon S, *et al*; 2016. (5)

A ausência de secreção de insulina (da primeira fase) e a detecção, pelas células β , de insulina alterada, são alterações que podem ser facilmente observadas numa fase precoce desta patologia. (25) Além disso, nesta doença, também é há diminuição da massa de células β (Figura 6). (25)

Parece mais provável que a diminuição da massa de células β esteja mais associada a apoptose, do que à diminuição da proliferação. (25)

No tratamento da DM2 são essenciais as terapias em que as características das células β estejam mantidas. (35) É sabido que o efeito incretina está reduzido em pacientes com DM2. (34) Os mecanismos patológicos subjacentes a esta constatação podem ser ou uma diminuição na secreção de GLP-1 a partir de células-L intestinais e, como consequência, uma redução nas concentrações plasmáticas de GLP-1, e/ou uma ação reduzida de GLP-1 nas células β . (34) É de notar que se pensava durante muito tempo que a atividade insulínica da GLP-1 estava preservada nos casos de DM2. (34) Esta diminuição do efeito incretina pode também dever-se a diferenças na expressão de GLP-1R e tradução do sinal nas células β , e, portanto, as ações terapêuticas dos análogos da GLP-1 ou os inibidores da DPP4. (34) Além disso, o fundo genético, a hiperglicemia, a hiperlipidemia, o recetor 3 da prostaglandina E, o recetor nuclear de glucocorticoide, a dessensibilização do GLP-1R e a sua internalização e a expressão dos níveis de arrestina- β -1 também podem ter impacto nas vias de sinalização de GLP-1 nas células β . (34) A proteína arrestina- β -1 participa nas vias de sinalização desencadeadas na célula β pela incretina GLP-1, intervindo na produção de cAMP. (36)

8.2.1. Fatores genéticos

Nesta doença é muito importante analisar a predisposição genética e a história familiar do indivíduo, mais do que na DM1. (26)

A DM2 pode dividir-se em formas monogénicas e formas poligénicas da doença. (12)
Nas formas monogénicas da doença, quando determinado gene está presente, ele provoca a doença. (12)

8.2.1.1. Formas monogénicas

Nestas formas, a doença deve-se exclusivamente a um gene, desempenhando os fatores ambientais um papel pequeno ou nenhuma influência. (12) Estas são as formas mais raras da doença. (12) Podem consistir em defeitos ao nível das vias que regulam a ação da insulina (quer com respostas defeituosas, quer com resistência à insulina) ou defeitos ao nível da sua secreção na célula β pancreática. (12)

8.2.1.1.1. Formas relativas à resistência à insulina:

Mutações no recetor insulínico

Estão descritas mais de 70 mutações. (12) Estas mutações podem afetar os recetores da célula β de várias formas: diminuindo a taxa de biossíntese de recetores e conseqüentemente o seu número (classe 1), inibição do transporte de recetores para a membrana plasmática (classe 2), diminuição da afinidade do recetor para a insulina (classe 3), inibindo a tirosina cinase (classe 4) ou acelerando a taxa de degradação do recetor (classe 5). (12)

Lipoatrophic diabetes

Esta forma de diabetes caracteriza-se pela hipertrigliceridemia, resistência à insulina, lipodistrofia e lipoatrofia. (12) Existem várias formas da doença, tais como a forma autossómica recessiva que se pensa ser devida a mutações no produto do gene Seipin e na 1-*acil-sn-glicerol-3-fosfato acetiltransferase-2* (AGPAT2). (12)

Mutações no recetor γ ativado pelo proliferador do peroxissoma

Verificou-se que pessoas homozigóticas para o alelo Pro12Ala são mais resistentes à insulina. (12) Foram identificadas duas mutações heterozigóticas diferentes no domínio de ligação do ligante deste recetor. (12) Considera-se que um polimorfismo comum (Pro12Ala) de aminoácidos neste recetor está associado a DM2. (12)

8.2.1.1.2. Formas relativas a defeitos na secreção de insulina:

Mutations in the insulin or proinsulin genes

Verificou-se que a hiperinsulinemia presente nesta síndrome é devida à presença de pró-insulina ou insulina mal dobrada ou aos seus produtos de degradação. (12) Estas anomalias devem-se a uma mutação no sítio de ligação ao recetor da molécula de insulina, nomeadamente a extremidade COOH da cadeia B da insulina. (12) Este recetor localiza-se no fígado, onde através dele é feita a depuração da insulina. (12) Ora, sem este recetor vai haver uma hiperinsulinemia. (12) Mutações na pró-insulina também podem tornar mais lenta a sua conversão em insulina, levando à sua acumulação. (12) Como a sua eliminação é lenta, a sua concentração no sangue aumenta. (12) Estes doentes têm uma forma leve da doença, não dependente de insulina. (12)

Diabetes mitocondrial

A mitocôndria participa na segunda fase de secreção de insulina. (18)

Estes doentes têm a mutação mitocondrial A3243G, que se associa a diabetes maternalmente transmitida e perda de audição neurosensorial. (12) Existem indivíduos em que a diabetes mitocondrial se associa uma síndrome mitocondrial, causada pela mesma mutação, associada a miopatia, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a

acidentes isquêmicos encefálicos (síndrome MELAS) e a diabetes, pois a mitocôndria participa na regulação da secreção de insulina. (12)

Diabetes Juvenil com manifestação na maturidade (MODY)

Caracterizam-se por hiperglicemia, que surge antes dos 25 anos de idade. (12,26) A sua hereditariedade é autossômica dominante. (12,26) A MODY resulta da mutação de um entre, pelo menos, 13 genes. As formas mais comuns são 2 mutações que codificam fatores de transcrição - fator nuclear dos hepatócitos (HNF)-4 α (MODY1), HNF-1 α (MODY3) - e a forma que envolve a mutação da enzima glicolítica glucocinase - GCK-MODY (MODY2). (12,26,32) Todos estes genes codificam alguma estrutura na célula pancreática, pelo que anomalias a este nível causam diabetes. (12) A clínica mais comum é o aumento assintomático da glicemia, num jovem com história familiar marcada de diabetes. (12,26) Alguns doentes apresentam hiperglicemia persistente, enquanto outros apresentam hiperglicemia ligeira. (12,26)

8.2.1.2. Formas poligénicas

As formas poligénicas da doença são também desencadeadas por fatores ambientais. (12) As manifestações incluem resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e músculo; produção hepática de glicose aumentada; e defeitos no processo de secreção de insulina pela célula β . (12) Já se conhecem alguns genes que aumentam a predisposição para a DM2. (12) Nestas formas, os genes causadores têm sido mais difíceis de identificar. (12) No entanto, os genes melhor estudados capazes de aumentar a predisposição para a DM2 são sintetizados abaixo.

Gene TCF7L2

Foi associado ao DM2 um microssatélite deste gene. (12,25) Pensa-se que este gene codifique fatores de transcrição envolvidos na homeostasia da glicemia, a sua ativação inibe a síntese de pró-glucagon ao nível das células enteroendócrinas, através da via de sinalização Wnt. (12,25) A Wnt é uma molécula que desencadeia a proliferação das células β , através da síntese de moléculas como a ciclina D1, que fazem com que as células progridam no ciclo celular. (34,37) Além disso a Wnt estimula a secreção de insulina, através do aumento da secreção de incretinas. (38)

Verificou-se ainda que polimorfismos ao nível do gene TCF7L2 levam a uma diminuição da secreção de insulina induzida por glicose. (12)

Gene HFN-4 α

O HFN-4 α está envolvido no desenvolvimento da MODY. (12) Mutações no gene HFN-4 α causam anomalias na secreção insulínica. (12) Além disso, polimorfismos na região promotora deste gene aumentam o risco de DM2, provavelmente, porque alteram a expressão genética. (12)

PPAR γ

O PPAR γ regula a diferenciação celular e a homeostasia da glicose. (12) Este receptor é expresso nas células β . (12,25) A sua eliminação leva a uma falência destas células, que se verifica quando se tem uma alimentação muito rica em gorduras. (12) Existe uma mutação nonsense neste recetor que protege contra o desenvolvimento de DM2, a mutação Pro12Ala (P12A) no PPAR γ 2. (12)

Gene Kir 6.2

A mutação nonsense neste gene, Glu23Lys (E23K), associa-se a maior risco de DM2, embora esse risco não se tenha verificado em todos os estudos. (12)

Gene Calpaína- 10

A variabilidade genética, ao nível deste gene, aumenta o risco de DM2, causando resistência à insulina. (12,39) Os mecanismos subjacentes a este risco ainda são desconhecidos. (12)

8.2.2.2. Fatores ambientais

Verificou-se que a resistência de insulina precede, em alguns anos, o aparecimento deste tipo de diabetes. (12) Existem vários fatores que podem predispor a esta resistência. (12) A ingestão excessiva de calorias mostrou ser um fator desencadeante de DM2, tal como um estilo de vida sedentário. (12,24) Além disso verificou-se que esta doença surge mais em doentes com dislipidemia e hipertensão prévias. (26)

Além dos hábitos alimentares associados a um estilo de vida sedentário e a fatores genéticos, outro fator de risco considerável é a poluição. (24,32) Pensa-se que estes disruptores endócrinos consigam prejudicar a fisiologia da célula β . (24) Já foram analisadas as consequências de pesticidas, contaminantes plastificantes, compostos orgânicos metálicos, e contaminantes alimentares, nas células β pancreáticas. (24,32) A principal localização onde os poluentes ambientais se acumulam é no tecido adiposo. (24,32) Estes podem contribuir para o início precoce da obesidade, o que permite o desenvolvimento precoce da diabetes. (24) Este estado pode persistir mesmo na idade adulta. (24)

Um exemplo de contaminantes associados a plásticos são os xenostrogénios e os estrogénios. (24) Este último contaminante pode aumentar o risco de DM2 em ambos os sexos. (24) Isto deve-se aos estrogénios originarem um aumento do Ca^{2+} ao nível das células

β pancreáticas, através do encerramento dos canais de K_{ATP} . (24) Assim, há sobreprodução de insulina, quer devido a estas moléculas estimularem diretamente a libertação de insulina, quer devido a provocarem resistência à insulina. (24) Portanto, os estrogénios provocam a falência da célula β , que desencadeia a DM2. (24)

A exposição a POPs, durante a gestação, ou durante a lactação, leva a intolerância à glicose, podendo causar DM2 numa idade adulta. (24) Entre os POPs, o contaminante TCDD, é um dos mais lesivos, tendo já sido retirado do mercado. (11,24)

O cádmio existe em abundância no tabaco e também em alimentos. (24) Este poluente diminui secreção de insulina, embora os mecanismos subjacentes não sejam conhecidos. (16) O arsénio pode ser encontrado em água contaminada. (11,24) Este metal induz a autofagia das células β e provoca a subregulação do gene PDX-1. (24,32) Outro metal a ter em conta, é mercúrio. (24) Este metal é abundantemente encontrado no marisco. (24) O mercúrio provoca intolerância à glicose, causando disfunção das células β , *stress* e morte celular. (24) Além disso, constatou-se que, em pessoas diabéticas, as quantidades corporais de zinco e de níquel são elevadas. (24) No entanto, ainda não se sabe as suas repercussões. (24)

Pensa-se que os pesticidas podem causar DM2. (11,24) Estes disruptores endócrinos danificam as células β por poderem induzir hiperglicemia e pancreatite. (24) Os pesticidas também aumentam a expressão dos genes responsivos aos estrogénios. (24)

Também existem poluentes ambientais em comida processada, tais como bifenilos policlorados. (24,32) Estes foram associados a um aumento do risco de desenvolver DM2, mas tal associação ainda não está comprovada. (11,24) Em níveis elevados destes produtos surge resistência à insulina e intolerância à glicose. (11) Assim, surge ao nível da célula β glucotoxicidade, devido à hiperglicemia. (12,24) A longo prazo esta toxicidade gera *stress* ao nível do RE, causada pelo aumento das espécies reativas de oxigénio. (24) Este *stress* inclui a ocorrência de glicação e níveis elevados de Ca^{2+} . (24) Os produtos de glicação

avançada ligam-se a um recetor (designado recetor de produtos de glicação avançada), o que permite desencadear a ação destes produtos finais. (24) Estes produtos estimulam o RAGE. (24) Assim, verifica-se apoptose celular originada pelas espécies reativas de oxigénio. (24) Além disso, também há uma diminuição da produção de insulina, induzida por glicose. (24) É provável que haja atuação simultânea de vários disruptores endócrinos, num indivíduo. (24) Estes efeitos podem ser aditivos, ou sinérgicos. (24) É raro que um único composto cause contaminação. (24) Os efeitos destes contaminantes dependem das características do indivíduo (diferenças na composição corporal, metabolismo e expressão genética) e das características do disruptor endócrino em causa (mecanismo de ação, dose e tempo de exposição). (24,32) Ou seja, o fato de um indivíduo ter estado exposto aos contaminantes ambientais, não determina que venha a ter consequências. (24) Esta interação pode, por outro lado já estar em parte determinada visto que o período fetal influencia o estado das células β na idade adulta. (24,25)

8.2.3.2. Mecanismos de resistência à insulina na DM2

A sensibilidade à insulina varia entre indivíduos, estando dependente da idade, raça, genética, gordura corporal (especialmente gordura abdominal), atividade física e medicação. (12,25)

Uma das causas de resistência à insulina é a presença de gordura abdominal. (12) O mecanismo subjacente ainda não é claro, mas já existem várias hipóteses, que podem ser aceites simultaneamente. (12) De fato, a gordura abdominal é mais ativa lipoliticamente relativamente à gordura subcutânea, pensa-se que isto se deva a ter mais recetores adrenérgicos. (12) Por outro lado, a gordura abdominal é resistente aos efeitos lipolíticos da insulina, o que também contribui para esta resistência. (12) Além disso, a gordura mesentérica contém 11 β HSD1, que é uma enzima que transforma a cortisona inativa em cortisol,

aumentando a produção de cortisol. (12) Isto leva, eventualmente os adipócitos a aumentar a lipólise e aumentar a produção de adipocinas. (12) As adipocinas são citocinas que interferem no metabolismo da glicose, devido a causarem inflamação das células β . (12,40)

A resistência à insulina engloba também anomalias na resposta da célula-alvo à insulina, quer endógena, quer exógena, havendo diminuição no transporte e metabolismo celular de glicose. (12) Face à resistência à insulina, as células β multiplicam-se e aumentam a sua função. (25) Assim, embora a resistência à insulina impõe o desenvolvimento de DM, isso raramente acontece na ausência de disfunção da célula β . (12,25)

Ao nível do músculo esquelético, a glicose é armazenada para sintetizar glicogénio. (12) A resistência à insulina, a este nível, prende-se com anomalias na síntese de glicogénio. (12) Além disso, o aumento de ácidos gordos para o músculo esquelético, na sequência de lipólise visceral, inibe a captação de glicose pelo músculo esquelético. (12,25) Segundo a hipótese de Randle, o aumento dos ácidos gordos livres provoca um aumento da acetil-coenzima A mitocondrial e uma diminuição das proporções (NADH)/NAD⁺, havendo inibição consequente de piruvato desidrogenase. (12) Como as concentrações de citrato mitocondriais e citosólicas vão aumentar, há inibição alostérica da fosfofrutocinase, a enzima que controla a taxa de glicólise. (12) A acumulação de glicose-6-fosfato, inibe a hexocinase II, aumentando as concentrações intracelulares de glicose e diminuindo a captação da mesma. (12) Verificou-se também que a captação de glicose induzida pela insulina varia inversamente com a quantidade de triglicéridos intramusculares. (12)

O *stress* ao nível do RE, nas células β pancreáticas, é outro mecanismo capaz de causar resistência à insulina. (25) Vários estudos demonstraram que a acumulação de proteínas *misfolded* em ratinhos, no RE, leva ao aparecimento de DM1 e de DM2. (25) Este *stress* tem origem em citocinas pró-inflamatórias, que reduzem o Ca²⁺ intracelular, presente no RE. (25) Além disso, este *stress* também pode ser provocado por lipotoxicidade. (25)

A hiperinsulinemia também leva à resistência à insulina, devido à subregulação dos recetores insulínicos e à perda de sensibilidade das vias de sinalização pós-recetoras. (12) Além disso, a hiperglicemia crónica, aumenta o metabolismo celular, produzindo muitas espécies reativas de oxigénio, dado que o aumento do metabolismo implica que haja fosforilação oxidativa. (25) As células β pancreáticas, relativamente às outras células do nosso organismo são mais suscetíveis às espécies reativas de oxigénio. (25) Com efeito, existem estudos que demonstram que são obtidas melhorias quando, células isoladas a partir de indivíduos com DM, são tratadas com agentes antioxidantes. (25) No entanto, as espécies reativas de oxigénio são necessárias para o normal funcionamento da célula β . (25) Nomeadamente, já foi demonstrado em ratinhos, que a presença destas moléculas, aumenta a secreção de insulina, induzida por glicose. (25)

Verificou-se ainda, em ratinhos, que os SRIs também são importantes na regulação da resistência à insulina. (12) O mecanismo que ativa os SRIs é a sua fosforilação. (12) A rutura de SRI-1 e SRI-2 causa, respetivamente, atraso no crescimento e leve resistência à insulina, e, insuficiência da célula β e resistência à insulina secundária. (12) Em muitos tecidos insulino-resistentes, foram encontradas alterações na fosforilação e nos níveis de SRI-1 e SRI-2. (12)

O TNF- α é uma molécula que se encontra aumentada em pessoas obesas e em ratinhos obesos. (43) Em ratinhos obesos é possível explicar as anomalias da ativação da SRI-1, da PKB e da PI-3 cinase, com base num mecanismo mediado pelo TNF- α . (12) Verificou-se que quando se diminuem os níveis de TNF- α , há uma melhoria na metabolização da insulina. (12)

A resistência à insulina induzida por glucocorticoides está relacionada com várias alterações. (12) Há uma alteração da distribuição da gordura, que passa a ser essencialmente gordura central. (12) Além disso verifica-se que há aumento dos níveis de triglicédeos e de ácidos gordos livres. (12) Por outro lado, os glucocorticoides interferem nas etapas iniciais da

ação da insulina no músculo e no fígado. (12) Por último, há interferência com a PI 3-quinase, associada à SRI-1. (12)

Quando a glicose entra na célula-alvo a maioria é metabolizada através da via glicolítica. (44) No entanto, há uma pequena porção de frutose-6-fosfato que entra na via da hexosamina (Figura 8). (44) No contexto de hiperglicemia, a sobrecarga da via das hexosaminas é maior. (44) Foi observado que, na presença de hexosaminas, o tecido adiposo desenvolve resistência insulínica, quer a nível das células adiposas, quer a nível do músculo esquelético. (12)

Verifica-se que os doentes infetados pelo vírus da imunodeficiência humana desenvolvem lipodistrofia que leva a resistência à insulina. (12) Pensa-se que o mecanismo molecular subjacente esteja relacionado com os inibidores da protease. (12)

Os inibidores da protease inibem o transporte de glicose in vitro e in vivo e interagem diretamente com o GLUT4. (12) O GLUT4 é outro dos transportadores de glicose, a sua função centra-se em transportar a glicose da corrente sanguínea para o músculo e para as células adiposas. (45) Pensa-se ainda que estes inibidores possam interferir na diferenciação de adipócitos. (12) Por último os inibidores da protease podem causar alterações a nível mitocondrial. (12)

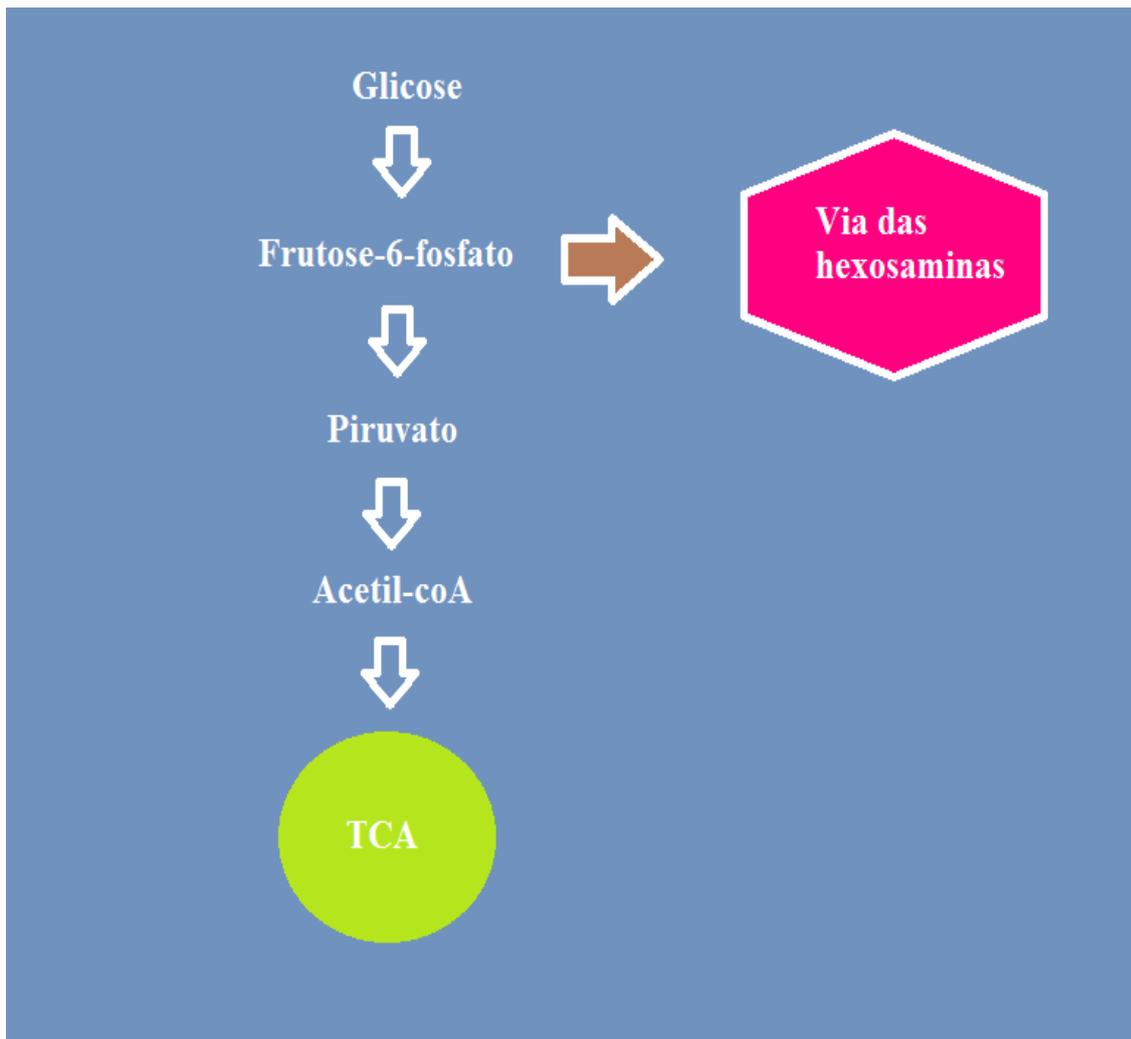


Figura 8 - Dentro da célula a glicose é maioritariamente metabolizada pela via glicolítica, mas há uma pequena parte que entra na via das hexosaminas. TCA: ciclo do ácido tricarboxílico, também conhecido como ciclo de Krebs.

9. Intervenção clínica

9.5. Transplante de pâncreas

Foi realizado pela primeira vez em 1966 por Kelly e pelos seus colaboradores. (23,6)
Esta é a única forma de se obter normoglicemia em doentes com DM1. (6) Até à atualidade já foram realizados mais de 35 000 transplantes, tendo a grande maioria sido realizada nos EUA (Figura 8). (6)

O transplante do pâncreas pode fazer-se isoladamente em caso de DM1 complicada labilidade glicêmica e/ou por hipoglicemia desconhecida e episódios severos de hipoglicemia, tendo havido a tentativa de controlar a diabetes por parte de um endocrinologista ou por um diabetologista. (46) Este transplante também se aplica a pacientes com DM2 que necessitem de insulina. (46)

As taxas de sobrevivência no primeiro ano de vida excedem os 95%. (6) Estas taxas de sobrevida, relativas aos órgãos transplantados, são superiores nos doentes que realizam em simultâneo transplante renal e transplante pancreático: rim 93%, pâncreas 86%. (6) A sobrevida dos órgãos transplantados no primeiro ano é superior a 83%. (6)

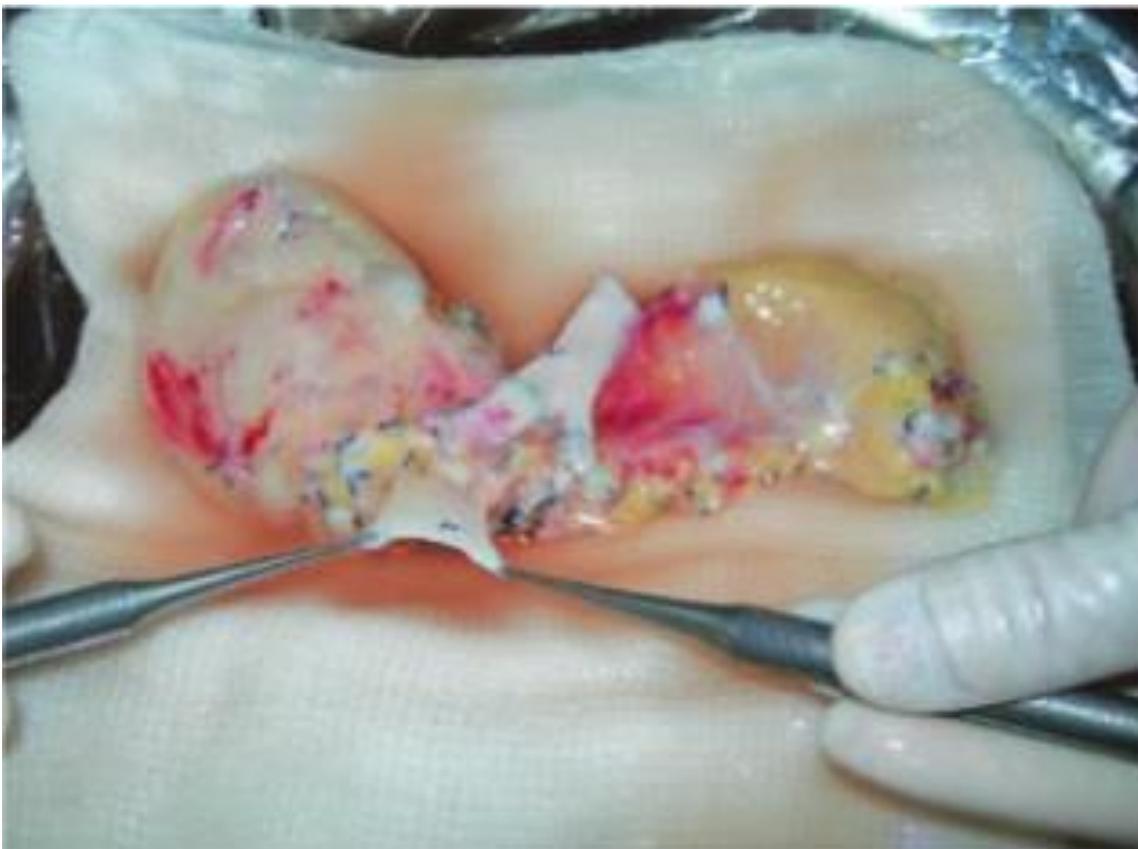


Figura 9 - Aspeto posterior de um enxerto de pâncreas. Adaptado de Meirelles Júnior RF, *et al*; 2015. (6)

Existem três tipos de recetores de transplante de pâncreas: transplante simultâneo de pâncreas e de rim, transplante de pâncreas isolado e transplante de pâncreas após transplante renal. (6) Destes 3, o que se realiza com mais frequência é o transplante simultâneo de pâncreas e de rim. (6)

As indicações para realizar o transplante pancreático em simultâneo com o transplante renal são o doente apresentar uremia (falência renal crónica em pré-diálise ou em diálise com TFG<20 ml/min) e DM1. (6)

Após o transplante, o doente é submetido a um regime imunossupressor, havendo, numa fase inicial, a indução da imunossupressão e, posteriormente, a manutenção da imunossupressão. (6) Os inconvenientes associados à imunossupressão crónica são infeções, neoplasias, entre outros. (23,46) Para evitar estes riscos são excluídas dos candidatos a este tipo de transplante os doentes com idade inferior a 18 anos (havendo exceções) e/ou que tenham DM1 por um período inferior a 5 anos. (46) Também são excluídos os doentes que apresentem marcada resistência à insulina ou que apresentem necessidades de insulina muito aumentadas. (46)

As complicações primárias incluem: trombose vascular (50%), pancreatite (20%), infeção (18%), fistulas (6,5%) e hemorragia (2,4%). (6) A este grupo de complicações foi atribuído o nome de falência técnica do transplante. (6) Estas complicações são seguidas por rejeição do transplante, de carácter agudo ou crónico. (6) Outras complicações são deiscência da parede abdominal e infeção. (6) As infeções constituem a principal causa de mortalidade e morbidade por transplante pancreático. (6) Mais tarde, as causas de mortalidade mudam para morte súbita e enfarte agudo do miocárdio. (6)

9.5. Transplante de ilhéus de Langerhans

É considerado um procedimento menos invasivo. (23,46) Quanto aos inconvenientes desta terapia, a longo prazo (5 anos após o transplante), apresenta o inconveniente de apenas 10% dos pacientes serem independentes de insulina, embora haja alguma discordância entre estudos. (23,46) Além disso, devido aos ilhéus de Langerhans não poderem ser multiplicados ex vivo e devido à falta de órgãos, esta terapia só pode ser oferecida a um número limitado de pacientes. (23) Por outro lado, há exaustão das células transplantadas. (35) Felizmente, com os avanços na engenharia genética, começaram a ser utilizados ilhéus de Langerhans de porcos para transplante. (47) Como estes contêm em muitas células retrovírus porcinos endógenos latentes (PERVs), têm de ser submetidos a terapia genética. (47) Para inativar estes vírus utilizou-se o gene CRISPR-Cas9. (47) Os cientistas pretendem criar porcos que sejam fontes de ilhéus de Langerhans imunologicamente compatíveis com seres humanos. (47) Para tal utilizar-se-iam células pluripotentes humanas que seriam incluídas em embriões de porcos. (47) O fenótipo destes embriões de porcos não incluiria um pâncreas, no seu organismo. (47) Contudo, o estudo desta possibilidade não pode ser levado a cabo devido a problemas éticos. (47)

Para a execução deste procedimento, as células são isoladas mecanicamente e enzimaticamente do dador. (23) Posteriormente, as células dos ilhéus de Langerhans são purificadas e injetadas, através da veia porta. (23) As células alojam-se rapidamente no fígado do recetor, onde, num curto espaço de tempo, são revascularizadas. (23) Já se conseguiu obter a normoglicémia com de ilhéus de Langerhans, originários de diferentes dadores. (46) O protocolo de Edmonton é considerado o melhor para explorar a viabilidade e a reprodutividade do transplante dos ilhéus de Langerhans. (23)

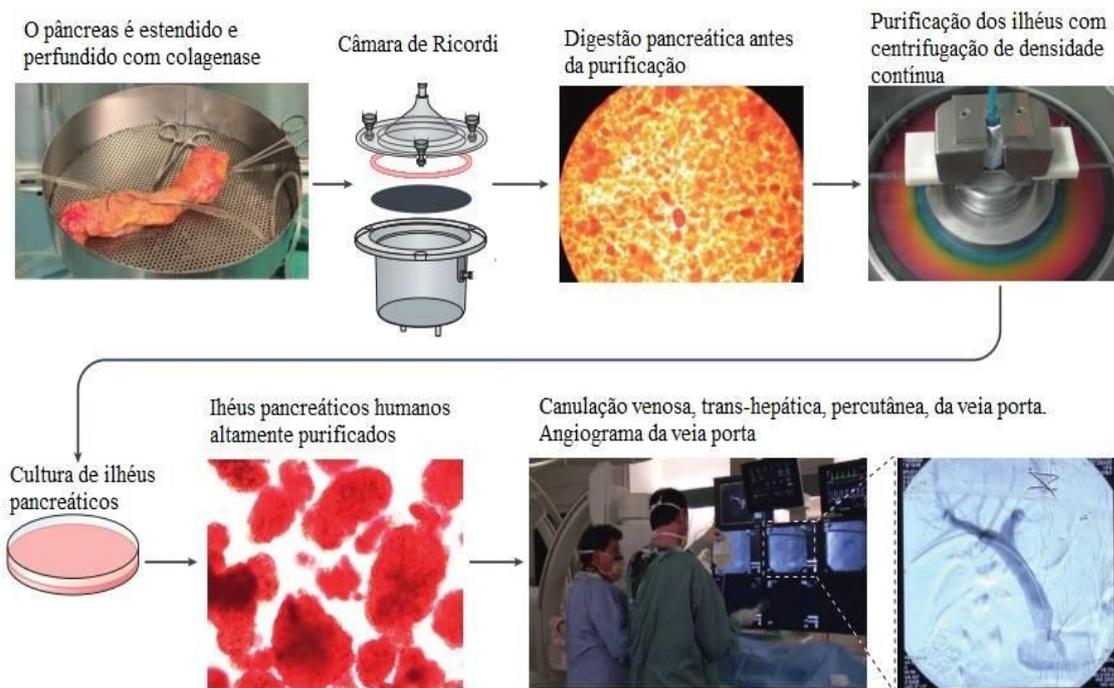


Figura 10 - Etapas no isolamento de ilhéus, antes de serem transplantados. Adaptado de Shapiro AMJ, *et al*; 2016. (46)

Há registos de doentes sujeitos a transplante de ilhéus de Langerhans, devido a DM1, com um regime imunossupressor isento de glucocorticoides, com bons resultados aos 12 meses, tendo sido utilizado, por exemplo o tacrolimus. (23) Além disso são seleccionados doadores que não tenham reatividade cruzada de antígenos HLA e evitando produtos dos ilhéus de Langerhans, quando possível. (46) Foram relatados, devido à imunossupressão o carcinoma basocelular e o carcinoma das células escamosas, ambos tratáveis, tendo a incidência sido de 2%. (46)

Segundo Brennan *et al.*, em doentes com DM1, os primeiros sete transplantes de ilhéus de Langerhans, apresentaram boa função do ilhéu, por um período superior a uma década, desde o momento em que os ilhéus de Langerhans foram transplantados. (23) Um dos doentes não apresentou dependência de insulina. (23) Não houve registos de doentes com complicações (linfoma, infeções oportunistas ou hipoglicémia acentuada). (23) Uma pequena fração da mortalidade associada a este transplante deveu-se a intervenções com a finalidade

de evitar a rejeição ou a complicações do transplante. (46) Há também registos, de um ensaio internacional multicêntrico, em 36 pacientes com DM1, em que 44% dos doentes obtiveram independência de insulina 1 ano após o transplante final, 28% tiveram função parcial e 28% apresentaram perda completa do enxerto 1 ano após o transplante final. (23)

Um dador para transplante de ilhéus pancreáticos é idealmente semelhante aos dadores de pâncreas. (46) No entanto, os dadores de ilhéus pancreáticos podem ter um IMC superior. (46) Constituem riscos do transplante de ilhéus pancreáticos a hemorragia e a trombose da veia porta. (46) As complicações deste tratamento incluem dor transitória no local de inserção do cateter intra-hepático e dor referida no ombro direito (irritação diafragmática), em 50% dos doentes, sendo estes tratados com analgésicos. (46) Há também aumento dos níveis de alanina transaminase e aspartato transaminase, que ocorre com a mesma frequência, mas que geralmente normaliza pós 1 mês. (46) Em 20% dos doentes foi observada microesteatose hepática de carácter reversível. (46) Foi relatada uma taxa de mortalidade de 2,9%, estando esta relacionada com complicações orgânicas da DM1. (46)

Este tratamento está aprovado em vários países, sendo também participado ou reembolsável por seguradoras. (46) Estes países incluem a Austrália, o Canadá, a Suíça, o Reino Unido, a França, a Itália, entre outros países europeus. (46) Trata-se de um tratamento considerado seguro, tendo já sido efetuados mais de 1500 transplantes de ilhéus de Langerhans. (46)

9.5. Substituição das células β pancreáticas

Esta terapêutica tem atualmente mais destaque do que a substituição dos ilhéus de Langerhans, por duas razões: um só dador pode permitir vários transplantes (induzindo a proliferação celular das células in vivo ou ex. vivo) e por ser um procedimento menos invasivo. (23,35,48) No entanto, apesar dos esforços o transplante de pâncreas ainda é mais bem-sucedido. (35) A substituição das células β pancreáticas é o tratamento indicado para a

doença e não apresenta os obstáculos das terapêuticas atuais. (23,35) Verificou-se, com estudos feitos em ratinhos, que as células mesenquimatosas são capazes de impedir que as células β pancreáticas sofram apoptose, de atenuar a resistência à insulina nos tecidos periféricos e induzir a regeneração das células β pancreáticas. (35) A regeneração das células β pancreáticas é conseguida com a migração das células mesenquimatosas para os locais onde as células β se apresentam defeituosas. (35) Nesses locais, as células β segregam citocinas e fatores de crescimento. A diferenciação das células mesenquimatosas é controlada por vários fatores de transcrição como o PDX-1, que devem ser reativados, durante a sua reprogramação. (35) Além disso, também já foi observada, em ratinhos, a conversão de células α em células β pancreáticas. (35)

9.5. Terapia gênica

Neste tipo de tratamento são utilizados genes com potencial para tratar a doença. (48) Os genes terapêuticos são aplicados às células que se pretendem tratar, através de um vector (ex.: vírus). (48) O potencial curativo desses genes terapêuticos traduz-se em mecanismos tais como substituição das células β perdidas ou reprogramando células não β em células β substitutivas. (48) A fim de reprogramar células não β em células β é necessário que as células expressem determinados fatores de transcrição como NeuroD e PDX-1. (48) Os benefícios destes genes terapêuticos já foram comprovados em ratinhos com hiperglicemia induzida por Estreptozotocina. (48) Encontra-se atualmente em estudo a possibilidade de evitar a autoimunidade contra as novas células β . (48)

Existe outro tratamento, na área de terapia gênica em que as células do hospedeiro mantêm o fenótipo para evitar mais problemas de cariz autoimune, e pretende-se apenas alterar a função da célula β . (48)

Há ainda outro método de tratamento em que se programam células não β para produzirem insulina. Para isso, são selecionadas células que consigam detetar as variações de insulina, o que garante que as células possuem o transportador GLUT2 e a enzima glucocinase. (48) As células que reúnem estas condições são as células hepáticas, as células do intestino delgado e as células hipotalâmicas. (48) Em relação aos vetores utilizados, verificou-se que os vetores de etiologia viral são mais eficientes. (48) Apesar dos estudos levados a cabo em ratinhos, eles não significam que em células humanas sejam obtidos os mesmos resultados. (48)

9.5. Preservação da célula β com análogos da GLP-1

Estudos feitos em ratinhos verificaram que os análogos da GLP-1 podem melhorar a função da célula β . (14)

O exenatido 4, aumenta a transcrição dos genes NeuroD1, GLUT2, induz a diferenciação de células estaminais embrionárias em células endócrinas produtoras de insulina e promove o aumento do número de células β . (5) O aumento do número de células β deve-se quer ao aumento da sua replicação, quer ao aumento da neogénese, quer à diminuição da apoptose. (14,5) Contudo, verificou-se que o exenatido apresenta o inconveniente de o seu efeito desaparecer, assim que o tratamento do doente diabético é interrompido. (14) No entanto, este inconveniente é evitável, pois, verificou-se que se o tratamento com exenatido tiver uma duração de 3 anos e se for descontinuado por 1 mês, o efeito do exenatido não desaparece. (14)

O Liraglutida mostrou aumentar a proliferação das células β , a secreção de insulina e diminuir a apoptose das células β . (5)

O Lixisenatido também mostrou ser eficaz no controlo da diabetes, no entanto, relativamente aos outros fármacos anteriormente mencionados, o Lixisenatido não aumenta a

proliferação de células β , nem diminui a sua apoptose. (5) No entanto, o número células pancreáticas humanas dos ratinhos tratados com Lixisenatido foi superior, visto que as células β lesadas foram tratadas. (5)

Em ratinhos mais velhos, verificou-se que o efeito de aumento do número de células β é nulo ou muito ténue, o que sugere que esta capacidade de multiplicação celular, também não se possa obter em dadores humanos mais velhos. (5)

10. Conclusão

A insulina é uma hormona produzida no pâncreas endócrino, pelas células β . A função desta hormona prende-se com a regulação do número de células β , nomeadamente através da promoção da sinalização anti-apoptótica, não estando os mecanismos subjacentes a esta sinalização esclarecidos. Além disso, a insulina também é responsável por controlar os níveis de glucagon.

A secreção de insulina é controlada essencialmente por fatores de origem exógena, que podem ser organizados em 3 grupos. Destes fatores, o principal é a glicose, que entra na célula através de transportadores. No entanto, também se observa uma produção basal de insulina em jejum, desde que a glicémia seja superior a 80-100mg/dL. Na célula β , a insulina é produzida por diversas vias de sinalização: PKA, PKC, PKG e CaMKII. A secreção de insulina ao nível da célula β inicia-se quando um fator de transcrição aumenta a transcrição de RNA de insulina. Depois do aumento da transcrição do RNA de insulina, há sucessivamente formação de pré-pró-insulina, pró-insulina e insulina. A pró-insulina é armazenada numa vesícula secretora, dentro da qual ocorre a clivagem do péptido C, separando-o das cadeias A e B. Posteriormente ocorre a maturação da insulina. Finalmente há libertação da insulina, a partir das vesículas, por exocitose, para a corrente sanguínea.

A massa de células β é atingida através de um equilíbrio entre a proliferação destas células, a sua neogénese e a apoptose. Para se obter a massa de células β , considera-se o número e o tamanho destas células. Consoante a massa destas células, o organismo consegue produzir mais ou menos insulina. Por outro lado, a insulina produzida também influencia a massa de células β . A neogénese no adulto é limitada. Relativamente à velocidade da replicação de células β , na patologia da diabetes, esta é maior na fase inicial da patologia. O turnover das células β afeta a sua longevidade, pois afeta a funcionalidade destas células devido a: anomalias mitocondriais, radicais livres e pela via de sinalização /IGF1.

A DM1 caracteriza-se pela deficiência de insulina, níveis de glucagon acima do normal, ausência de resposta a determinados fatores que deveriam induzir a libertação de insulina e alterações no metabolismo dos lípidos. Esta patologia pode dividir-se em 2 subtipos. A DM1 imunomediada é o subtipo mais frequente e caracteriza-se pela presença de um ou mais marcadores autoimunes. A DM1 pode ainda ser do tipo idiopática. Além dos dois tipos de DM1 referidos, as formas genéticas de DM1 podem ser divididas em grupos de síndromes: síndromes poliglandulares autoimunes 1; Os fatores genéticos mais importantes envolvidos na DM1 são os que codificam os haplótipos da molécula HLA classe II DQ e DR. Os fatores ambientais descritos para a DM1 são inúmeros. No entanto, apenas a rubéola com origem congénita é comprovadamente causa dora desta patologia. A DM1 é uma doença previsível quando são tidas em consideração as características genéticas, imunológicas e metabólicas de um indivíduo.

A DM2 caracteriza-se pela hiperinsulinemia e pela resistência à insulina. Além disso, neste tipo de diabetes há defeitos na secreção de insulina e diminuição da massa de células β . Na DM2 há uma diminuição do efeito incretina que pode dever-se à diminuição da produção destas moléculas, ou uma menor ação das mesmas nas células β . Por outro lado, a diminuição do efeito incretina também pode dever-se a diferenças na expressão de GLP-1R e tradução do sinal nas células β , e, portanto, as ações terapêuticas dos análogos da GLP-1 ou os inibidores da DPP4. Além disso, o fundo genético, a hiperglicemia, a hiperlipidemia, o recetor 3 da prostaglandina E, o recetor nuclear de glucocorticoide, a dessensibilização do GLP-1R e a sua internalização e a expressão dos níveis de arrestina- β -1 também podem ter impacto nas vias de sinalização de GLP-1 nas células β . Relativamente à genética, A DM2 pode dividir-se em formas monogénicas e formas poligénicas da doença, sendo as formas monogénicas as mais raras. Estas formas podem consistir em defeitos ao nível das vias que regulam a ação da insulina ou a sua secreção. As formas monogénicas da DM2 podem distribuir-se em dois

grupos: formas relativas à resistência à insulina e formas relativas a defeitos na secreção de insulina. As formas relativas à resistência à insulina incluem: mutações no recetor insulínico, *lipotrophic diabetes* e mutações no recetor γ ativado pelo proliferador do peroxissoma. As formas relativas a defeitos na secreção de insulina incluem: *mutations in the insulin or proinsulin genes*, diabetes mitocondrial e diabetes juvenil com manifestação na maturidade (MODY). As formas poligénicas da DM2 incluem alterações nos genes: TCF7L2, HFN-4 α , PPAR γ , Kir 6.2 e Calpaína- 10.

A ingestão excessiva de calorias mostrou ser um fator desencadeante de DM2, tal como um estilo de vida sedentário. (9,17) Além disso verificou-se que esta doença surge mais em doentes com dislipidemia e hipertensão prévias. (19) Pensa-se que outro fator de risco importante, causador deste tipo de diabetes seja a poluição, mas esta hipótese ainda necessita de ser mais estudada. A sensibilidade à insulina varia entre indivíduos, estando dependente da idade, raça, genética, gordura corporal, atividade física e medicação. Além disso, na DM2 existem múltiplos mecanismos celulares que levam a resistência à insulina, relacionados com anomalias na célula-alvo que incluem: anomalias na síntese de glicogénio, *stress* a nível do RE, hiperinsulinemia, rutura de SRI-1 e SRI-2, TNF- α , os glucocorticoides, a sobrecarga da via das hexosaminas e inibidores da protease (em doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana).

Apesar de já existirem novas terapias a nível celular, elas ainda apresentam muitos inconvenientes. As desvantagens do transplante do pâncreas são a falta de dadores e a necessidade de imunossupressão crónica. O transplante dos ilhéus de Langerhans é considerado um procedimento menos invasivo. No entanto verifica-se que apenas 10% dos pacientes são independentes de insulina, 5 anos após o transplante, embora haja alguma discordância entre estudos. Tem ainda os inconvenientes de ter de ser acompanhada de imunossupressão crónica e o fato de haver falta de dadores destas células. Esta última

dificuldade pode ser resolvida a partir de transplante de células de ilhéus de Langerhans humanas criadas em porcos, mas esta opção ainda não está disponível, devido a questões éticas. Pensa-se que num futuro próximo todos estes pontos sejam solucionados recorrendo a células do âmnio ou da placenta. A terapia génica é uma opção que ainda está pouco estudada e ainda não foi possível executá-la com sucesso em células humanas. A preservação da célula β com análogos da GLP-1, já foi efetuada com sucesso, em estudos realizados em ratinhos. No entanto, em ratinhos mais velhos, verificou-se que as células β , praticamente não se multiplicam, quando sujeitas a esta terapia, o que pode diminuir a motivação para investir mais estudos neste tipo de tratamento.

Agradecimentos

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Joana Carina de Pinho Marques Saraiva, pela disponibilidade e pela ajuda.

Ao João Bernardo, pelo apoio informático.

À minha família, pelo apoio incondicional ao longo do meu percurso académico.

Aos meus amigos, pelo companheirismo.

Muito obrigada a todos.

Referências Bibliográficas

1. Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition [Internet]. McGraw-Hill Education; 2009. Available from: <https://books.google.pt/books?id=UvaQaT6SIg4C>
2. Abraham L Kierszenbaum M.D. Ph.D. LTMDPD. Histology and cell biology: An introduction to pathology. Fourth. Elsevier / Mosby; 2015.
3. Khadra A, Schnell S. Development, growth and maintenance of β -cell mass: Models are also part of the story. *Mol Aspects Med.* 2015;42:78–90.
4. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Mol Aspects Med.* 2015;42:42–60.
5. Chon S, Gautier JF. An update on the effect of incretin-based therapies on β -cell function and mass. *Diabetes Metab J.* 2016;40(2):99–114.
6. Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Pacheco-Silva A. Pancreas transplantation: review. *Einstein (São Paulo).* 2015;13(2):305–9.
7. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. Observatório Nacional da Diabetes. 2015
8. Bhimji. SAESS. Physiology, Endocrine, Pancreas. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
9. Gardner DG, Shobac D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 2011. 715 p.
10. Sussel L. differentiation and diabetes. 2013;392(3):685–705.
11. Bodin J, Stene LC, Nygaard UC. Can Exposure to Environmental Chemicals Increase the Risk of Diabetes Type 1 Development ? 2015;2015.
12. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. Williams tratado de endocrinología. 2009.
13. Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br J Pharmacol.* 2012;166(1):27–41.

14. DeFronzo RA, Abdul-Ghani MA. Preservation of β -cell function: The key to diabetes prevention. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(8):2354–66.
15. Article R. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. 2012;27(4):269–73.
16. Chen C, Cohrs CM, Stertman J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab.* 2017;6(9):943–57.
17. Mota, M. D.S. and Regitano LCA. World $\hat{\text{e}}^{\text{TM}}$ s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher c. RFID Technol Secur Vulnerabilities, Countermeas. 2012;75–100.
18. Fernandez-Mejia M-LL de la V-M and C. Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes, Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. 2011.
19. Kim HS, Lee MK. β -Cell regeneration through the transdifferentiation of pancreatic cells: Pancreatic progenitor cells in the pancreas. *J Diabetes Investig.* 2016;7(3):286–96.
20. Guyton AC, Hall JE. *Human Physiology and Mechanisms of Disease.* Saunders; 1997. (Human Physiology & /Mechanisms of Disease).
21. Jameson JL. *Harrison’s Endocrinology.* McGraw-Hill Education / Medical.
22. Wang L, Song J, Wang C, Lin P, Liang K, Sun Y, *et al.* Circulating Levels of Betatrophin and Irisin Are Not Associated with Pancreatic β -Cell Function in Previously Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2616539.
23. Okere B, Lucaccioni L, Dominici M, Iughetti L. Cell therapies for pancreatic beta-cell replenishment. *Ital J Pediatr.* 2016;42(1):1–9.
24. Fabricio G, Malta A, Chango A, De Freitas Mathias PC. Environmental Contaminants and Pancreatic Beta-Cells. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2016;8(3):257–63.

25. Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, Cras-M??neur C, Bernal-Mizrachi E. Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med.* 2015;42:19–41.
26. Care D, Suppl SS. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Supplement 1):S13–27.
27. Liu XY, Pestka S, Shi YF. *Recent Advances in Cancer Research and Therapy* Elsevier. Science; 2012. (Elsevier insights).
28. Jeon KW. *International Review of Cytology.* Elsevier Science; 2002. (International Review of Cell and Molecular Biology).
29. Hansen MP. Type 1 diabetes and polyglandular autoimmune syndrome: A review. *World J Diabetes.* 2015;6(1):67.
30. Type 1 diabetes. 2013;1–9.
31. Joslin EP, Kahn CR. *Joslin’s Diabetes Mellitus: Edited by C. Ronald Kahn ... [et al.].* Lippincott Williams & Willkins; 2005. (Diabetes Mellitus).
32. Tudies S, Murea M, Ma L, Freedman BI. Genetic and environmental factors associated With type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *Rev Diabet Stud.* 2012;6–22.
33. Jaeckel E, Mpofo N, Saal N, Manns MP. Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 2008;40(2):126–36.
34. Roussel M, Mathieu J, Dalle S. Molecular mechanisms redirecting the GLP-1 receptor signalling profile in pancreatic β -cells during type 2 diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016;26(2):87–95.
35. Zang L, Hao H, Liu J, Li Y, Han W, Mu Y. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9(1):36.
36. Sonoda N, Imamura T, Yoshizaki T, Babendure JL, Lu J, Olefsky JM. Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic

- beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(18):6614–9.
37. Cooper GM, Hausman RE. *A Célula - 3ed: Uma Abordagem Molecular*. 2016.
 38. García-Martínez JM, Chocarro-Calvo A, Moya CM, García-Jiménez C. WNT/ β -catenin increases the production of incretins by entero-endocrine cells. *Diabetologia*. 2009;52(9):1913–24.
 39. Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, *et al*. Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):650–4.
 40. Dunmore SJ, Brown JEP. The role of adipokines in β -cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol*. 2013;216(1).
 41. Lakshminpathi J, Alvarez-Perez JC, Rosselot C, Casinelli GP, Stamateris RE, Rausell-Palamos F, *et al*. PKC ζ is essential for pancreatic β -cell replication during insulin resistance by regulating mTOR and cyclin-D2. *Diabetes*. 2016;65(5):1283–96.
 42. Maiese K. *Molecules to Medicine with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies*. Elsevier Science; 2016.
 43. Moller DE. Potential Role of TNF- α ; in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018 Apr 2;11(6):212–7.
 44. Johnson RJ, Feehally J, Floege J. *Nefrologia Clínica: Abordagem Abrangente* Elsevier Brasil; 2017.
 45. Bähr I, Bazwinsky-Wutschke I, Wolgast S, Hofmann K, Streck S, M??hlbauer E, *et al*. GLUT4 in the endocrine pancreas - Indicating an impact in pancreatic islet cell physiology? *Horm Metab Res*. 2012;44(6):442–50.
 46. Shapiro AMJ, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;13(5):268–77.

47. Kieffer TJ, Woltjen K, Osafune K, Yabe D, Inagaki N. Beta-cell replacement strategies for diabetes. *J Diabetes Investig.* 2017;1–7.
48. Handorf AM, Sollinger HW, Alam T. Insulin gene therapy for type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Transplant.* 2015;13:37–45.