



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
Departamento de Química e Farmácia

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

Amélia Marques da Silva

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da:
Professora Doutora Vera Ribeiro

2012



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
Departamento de Química e Farmácia

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

Amélia Marques da Silva

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da:
Professora Doutora Vera Ribeiro

2012

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright : Amélia Marques da Silva. A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e Agradecimentos

Quero agradecer...

...à Professora Doutora Vera Ribeiro, pela sua orientação na realização desta dissertação...

...aos meus amigos e ao Márcio pela preocupação, presença e pelos momentos que passámos.

Quero dedicar esta dissertação a toda a minha família, em especial aos meus pais e irmãs, por todos os ensinamentos, conselhos, paciência, preocupação, motivação, presença e bons momentos que me proporcionaram não só nestes 5 anos académicos como em toda minha vida.

Resumo

A diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crónica que se caracteriza por estados de hiperglicemia. Mundialmente estima-se que cerca de 346 milhões de pessoas sofram de diabetes.

A DM tipo 2 (DMT2), muitas vezes associada à obesidade, pode resultar de defeitos genéticos, ambientais e metabólicos que provocam uma resistência à insulina e incapacidade de secreção compensatória de insulina das células β do pâncreas, provocando níveis elevados de glicemia.

Os recetores nucleares são uma superfamília de fatores de transcrição, cuja atividade depende da ligação de ligandos, que regulam a expressão de genes envolvidos numa série de processos biológicos, como o metabolismo glicídico. Alguns membros desta superfamília são por isso potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da DMT2, sendo o recetor nuclear PPAR γ o alvo terapêutico das tiazolidionedionas (TZD), uma classe de fármacos antidiabéticos.

Outros recetores nucleares poderão vir a ser alvos terapêuticos de futuros fármacos antidiabéticos como o PPAR α , PPAR β , FXR, LXR, CAR e PXR. No entanto, para que estes recetores nucleares possam vir a ser utilizados no futuro, é necessário desenvolver mais estudos, ampliar o conhecimento das vias em que estão presentes e o modo como interferem nestas.

A terapia farmacológica, relativa aos recetores nucleares, poderá passar no futuro, pelo desenvolvimento de ligandos que sejam moduladores seletivos para cada um dos recetores. Pretende-se que da sua ativação resulte apenas a manifestação de efeitos desejáveis, como os de controlo da glicemia, através por exemplo, da melhoria da sensibilidade à insulina e da regulação da expressão de enzimas envolvidas no metabolismo glicídico.

Esta monografia pretende estudar alguns dos recetores nucleares, que estão, ou poderão estar, na base da patogénese da DMT2 e que são, ou poderão vir a ser, considerados alvos terapêuticos nesta patologia.

Palavras-chave: diabetes *mellitus* tipo 2; recetores nucleares; sensibilidade à insulina; neoglicogénese; moduladores seletivos da atividade dos RN.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a disease characterized by a chronic state of hyperglycemia. All over the world it is estimated that about 346 million people suffer from diabetes.

Type 2 DM (T2DM), often associated with obesity, may result from genetic, environmental and metabolic defects, which cause insulin resistance and inability of insulin compensatory secretion from pancreatic β cells, causing high levels of glycemia.

The nuclear receptors are a superfamily of transcription factors, which activity depends upon ligand binding, which regulate the expression of genes involved in a number of biological processes, such as glucose metabolism. Some members of this superfamily are, thus, potential therapeutic targets for treatment of T2DM. Nuclear receptor PPAR γ is already used as therapeutic target of thiazolidinediones (TZD), a class of anti-diabetic drugs.

Other nuclear receptors may become therapeutic targets for future antidiabetic agents, such as PPAR α , PPAR β , FXR, LXR, CAR and PXR. However, for these nuclear receptors to be used in the future, it is necessary to develop more studies, increasing knowledge of the pathways where they are present and how they affect them.

Pharmacologic therapy, concerning nuclear receptors, may in the future, pass through the development of ligands which act as selective modulators for each of the receptors. The intention is that their activation, only result in desirable effects, such as the control of glycemia, through for example, improved insulin sensitivity and regulating the expression of enzymes involved in carbohydrate metabolism.

This monography intends to study the nuclear receptors, which are, or may be, in the basis of T2DM pathogenesis and which are, or may be considered therapeutic targets for this disease.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; nuclear receptors; insulin sensitivity; gluconeogenesis; selective modulators of the activity of the NR.

Índice

Lista de Siglas e Abreviaturas	11
1. História	14
2. Epidemiologia da Diabetes	16
3. A Diabetes	20
3.1. Classificação Etiológica	20
3.1.1. Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	21
3.1.2. Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2	21
3.1.3. Outros Tipos Específicos de Diabetes <i>Mellitus</i>	22
3.1.4. Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional	24
3.2. Anomalia da Tolerância à Glicose (ATG) e Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ)	24
3.3. Resistência à insulina	24
3.4. Sintomatologia e Complicações	25
3.5. Diagnóstico	27
4. Recetores Nucleares	29
4.1. Estrutura	30
4.2. Conceitos importantes relacionados com a sinalização dos RN	33
5. PPAR	33
5.1. PPAR α	36
5.2. PPAR β/δ	36
5.3. PPAR γ	37
5.3.1. Tiazolidinedionas	39
5.3.2. Consequências da ativação do PPAR γ	41
5.3.3. A influência dos tecidos no mecanismo de sensibilização à insulina do PPAR γ	43
5.3.4. Agonistas Totais e Parciais	44
5.3.5. Futuros fármacos	45
5.3.5.1. Agonistas duplos PPAR α/γ e pan-Agonistas	45
5.3.5.2. SPPAR γ M	48
5.3.5.3. Outras abordagens	53
6. FXR (Recetor X de farnesóides)	53
6.1. O FXR e a sua influência na homeostasia da glicose	54
6.1.1. Influência do FXR na neoglicogénese	55
6.1.2. Influência do FXR na glicogénese	58
6.1.3. Influência do FXR na sensibilidade à insulina	59
6.2. Estudos clínicos sobre os efeitos das resinas ligadoras dos ácidos biliares (Colestiramina)	61
7. LXR (Recetor X do fígado)	62
7.1. LXR e a homeostasia da glicose	63
7.1.1. Influência do LXR na neoglicogénese	63
7.1.2. Influência do LXR na sensibilidade à insulina	65
7.1.3. Influência do LXR na secreção de insulina	66
7.2. Efeitos indesejáveis da ativação do LXR	66
7.3. No futuro	66
8. CAR (Recetor constitutivo de androstanos) e PXR (Recetor X de pregnanos)	67
8.1. Influência na glicémia	68

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

8.1.1. CAR.....	69
8.1.2. PXR.....	72
9. Conclusão.....	72
10. Referências bibliográficas.....	78

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Percentagem da incidência da diabetes em 2011 numa população entre os 20 e 70 anos.	17
Figura 2.2 - Percentagem da incidência da diabetes em Portugal por sexo, no ano de 2010.	18
Figura 2.3 - Percentagem da incidência da diabetes em Portugal por faixa etária, no ano de 2010.	19
Figura 2.4 - Distribuição da população com e sem diabetes por IMC, em Portugal no ano de 2010.	19
Figura 3.1 - Complicações mais significativas associadas à diabetes e órgãos mais afetados por esta doença.	26
Figura 4.1 - Esquema da estrutura/domínios comuns dos RN.	30
Figura 4.2 - Esquemas representando exemplos dos vários tipos de dimerização dos RN e da respetiva ligação aos HRE do DNA.	31
Figura 5.1 - Mecanismos de regulação da transcrição de genes do PPAR.	36
Figura 5.2 - A: Efeito dos fármacos e respetivas doses na concentração de HbA1c; B: Efeito na glicose plasmática em jejum (GPJ).	47
Figura 5.3 - Modelo hipotético do mecanismo de ação dos SPPAR γ M.	49
Figura 5.4 - Curvas dose-resposta da ativação do PPAT γ por diferentes tipos de agonistas, relacionadas com a eficácia e a potência.	51
Figura 5.5 - Comparação de dados modulados para a rosiglitazona (dose 8mg) e de dados de IMT131 besilato (doses 1mg e 10mg) na alteração da <i>baseline</i> da glicose plasmática em jejum (GPJ) e da HbA1c.	52
Figura 6.1 - Tratamento de ratinho db/db com GW4064.	55
Figura 6.2 - Modelo ilustrativo da influência, na expressão de genes, da ativação do FXR pelo agonista.	56
Figura 6.3 - A: Tratamento dos hepatócitos primários de ratinhos com o veículo DMSO (grupo controlo) ou com GW4064 (1 μ M) durante 24h. B: Tratamento dos Ratinhos <i>wt</i> e <i>FXR</i> ^{-/-} com veículo ou com GW4064 durante 11 dias.	57
Figura 6.4 - A: Supressão de genes envolvidos na neoglicogénese (PEPCK e G6Pase) pelos ácidos biliares. B: O SHP é necessário para suprimir a expressão de genes da neoglicogénese em resposta aos ácidos biliares.	57

Figura 6.5 - O tratamento com GW4064 em ratinhos db/db.....	59
Figura 6.6 - Diminuição da sensibilidade à insulina em ratinhos <i>FXR</i> ^{-/-}	60
Figura 6.7 - A ativação do FXR pelo GW4064 em ratinhos ob/ob <i>in vivo</i>	60
Figura 7.1 - Efeito do GW3965 nos níveis de glicose em ratinhos obesos e com resistência à insulina (A) e em ratinhos magros (B).....	63
Figura 7.2 - Efeito do GW3965 na expressão relativa dos genes <i>PEPCK</i> , <i>G6Pase</i> e <i>PGC-1α</i> em fígados de ratinho <i>wt</i> , <i>LXR1α</i> ^{-/-} e <i>LXR1β</i> ^{-/-}	64
Figura 7.3 - Efeito do GW3965 na expressão relativa de GLUT4 em adipócitos de ratos obesos.	65
Figura 8.1 - Efeito do cisTPD na expressão dos genes <i>PEPCK</i> (A) e <i>G6Pase</i> (B) e nos níveis das respectivas proteínas (C e D) em fígados de rato.	69
Figura 8.2 - Recrutamento de CAR, HNF4α e FOXO1, para o promotor dos genes <i>PEPCK</i> (A) e <i>G6Pase</i> (B), no fígado de ratos em resposta ao tratamento com cisTPD.	70
Figura 8.3 - Em ratinhos ob/ob a ativação do CAR melhora a tolerância à glicose (A) e a sensibilidade à insulina (B) e regula a expressão de genes relacionados com a metabolização da glicose (C).....	71

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Óbitos por diabetes em Portugal: dados do Relatório Anual de 2011, do Observatório Nacional da Diabetes, em 2010.20

Tabela 3.1 - Critérios de diagnóstico para a diabetes *mellitus* (DM) e hiperglicemias intermédias.28

Lista de Siglas e Abreviaturas

- AB – Ácidos biliares
- ACC – Acetil-CoA carboxilase
- ASC-2 - *Activating signal cointegrator-2*
- AF-1 - *Activation function 1*
- AF-2 - *Activation function 2*
- AGJ - Anomalia da glicemia em jejum
- AMP – Monofosfato de adenosina
- AMPK – Proteína cinase ativada pelo AMP (*AMP-activated protein Kinase*)
- ATG - Anomalia da tolerância à glicose
- ATP – Trifosfato de adenosina
- cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico
- CAR - Recetor constitutivo de androstanos (*Constitutive Androstane Receptor*)
- CBP - *CREB-binding protein*
- CREB - Proteína de ligação aos elementos de resposta do cAMP (*cAMP response element-binding protein*)
- CDK5 – Cinase dependente de ciclinas (cyclin-dependent kinase) 5
- cisTPD - cis 2,4,6-trifenildioxano-1,3
- CYP450 – Citocromo P450
- DBD – Domínio de ligação ao DNA (*DNA-binding domain*)
- DM- Diabetes mellitus
- DMT1 - Diabetes mellitus tipo 1
- DMT2 - Diabetes mellitus tipo 2
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- ER - Recetor dos estrogénios (*Estrogen receptor*)
- ERR - Recetor relacionado com o receptor dos estrogénios (*Estrogen related receptor*)
- FBP1 – Frutose-1,6-bifosfatase
- FDA - Food and Drugs Administration
- FOXO1 – *Forkhead box protein O1*
- FXR – Recetor X de farnesóides (*Farnesoid X Receptor*)
- FXRE - Elementos de resposta específicos do FXR (*FXR response elements*)
- G6Pase – Glicose-6-fosfatase

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

GIP - Polipéptido insulínotropico dependente de glicose (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*)

GLP-1 - *Glucagon-like peptide 1*

GLUT – Transportador de glicose (*Glucose transporter*)

GPS2 – *G protein pathway suppressor 2*

GR - Recetor de glucocorticóides (*Glucocorticoid receptor*)

HAT - Histona acetiltransferase

HDAC - Histona desacetilase

HbA1c – Hemoglobina Glicosilada

HDL - Lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

HNF4 α – Fator Nuclear 4 α do Hepatócito (*Hepatocyte Nuclear Factor-4 α*)

HRE - Elementos de resposta hormonal (*Hormone response elements*)

HSP - *Heat shock protein*

IDF - Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*)

IL-6 – Interleucina-6

IMC- Índice de Massa Corporal

IRS - Substrato do Recetor de Insulina (*Insulin Receptor Substrate*)

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

LBD – Dominio de ligação do ligando (*Ligand binding domain*)

LBP - *Ligand-binding pocket*

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)

LXR - Recetor X do Fígado (*Liver X Receptor*)

MODY - *Maturity Onset Diabetes in Youth*

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)

NCoR - Correpresor de recetores nucleares (*Nuclear receptor corepressor*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAI-1 - Inibidor do ativador de plasminogénio-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)

PKA – Proteína cinase A

PB – Fenobarbital (*Phenobarbital*)

PCN – Pregnenolona-16 α -carbonitrilo

PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxicinase (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

PGC1 α – Coativador 1- α do recetor ativado por proliferadores de peroxissomas gamma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma coactivator 1- α*)

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

PGC-1 β – Coativador 1- β do recetor ativado por proliferadores de peroxissomas gamma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma coactivator 1- β*)

PI3K - Fosfatidil-inositol 3 cinase

PKC – Proteína cinase C (*Protein Kinase C*)

PPAR - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

PPRE - Elementos de resposta do PPAR

PTGO - Prova de Tolerância à Glicose Oral

PXR - Recetor X de pregnanos (*Pregnane X Receptor*)

RIP140 – *Receptor-Interacting Protein-140*

RN - Recetores Nucleares

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RXR – Recetor X de retinóides (*Retinoid X Receptor*)

SHP – *Small heterodimer partner*

SMRT - *Silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*

SNP – Polimorfismo pontual (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SPPAR γ M – Modulador seletivo do PPAR γ (*Selective PPAR γ modulator*)

SRC - *Steroid receptor coactivator*

TG -Triglicérido

TNF - Fator de Necrose Tumoral (*Tumoral necrosis factor*)

TZD - Tiazolidinedionas

USF - Unidades de Saúde Familiar

WT – *Wild type*

XR – Recetor X (*X receptor*)

ZF1 - *zinc finger 1*

ZF2 - *zinc finger 2*

1. História

A diabetes é uma doença já reconhecida desde a antiguidade. Datado do séc. XV a.C., o chamado “papiro de Ebers” descoberto no Egito, descreve já um estado poliúrico semelhante ao da diabetes.

No século VI a.C., Sushrut (Susruta) identifica a diabetes e especifica que o seu diagnóstico é feito através do sabor doce da urina. O mesmo aspeto é referido por outros estudiosos asiáticos.

No século II d.C., esta doença é descrita clinicamente por Areteus da Capadócia, que no seu relato, salienta o aumento do fluxo de urina (poliúria), a sede (polidipsia), a perda de peso e fraqueza. É designada como “Diabetes”, termo de origem grega, que indica o aumento do fluxo de urina e conseqüente eliminação exagerada de água pelos rins, expressando que a água entrava e saía do organismo do diabético sem se fixar nele. Esta doença é considerada na Antiguidade uma “sentença de morte” e Areteus refere que a vida com esta doença é curta e dolorosa.

Durante a Idade Média, no ocidente, não se deu atenção a esta doença nem existem registos sobre ela, contudo, Avicena, físico (médico) muçulmano do século XI, apresenta estudos sobre esta doença no seu livro “Cânone da Medicina”. Nestes estudos são referidos, um apetite anormal, uma diminuição das funções sexuais e também um sabor adocicado da urina. Também é descrita a gangrena diabética e são indicadas algumas formas de tratamento.

No ocidente, só no século XVII é que a diabetes volta a ser estudada, quando o médico inglês Thomas Willis redescobre o sabor doce da urina dos diabéticos e conseqüentemente, adiciona-lhe então a palavra *mellitus*, do latim “mel”. Este médico descreve também os sintomas associados a esta patologia.

Quase um século depois, o médico de Liverpool, Mathew Dobson, identifica o açúcar como o responsável pelo sabor doce da urina, sendo John Rollo mais tarde, o primeiro a tentar delinear uma dieta pobre em glícidos, adequada a esta doença.

O século XIX é marcado por grandes descobertas conseguidas por estudos experimentais. Os primeiros estudos experimentais relacionados com a diabetes, foram realizados pelo médico francês, Claude Bernard, em 1848. Entre estes está, por exemplo, a descoberta de que o açúcar, que aparece na urina é armazenado no fígado na forma de glicogénio. Outra descoberta importante, foi a associação da doença à

obesidade e à vida sedentária, pelo médico Bouchardat, indicando um tratamento baseado na restrição de glícidos e numa dieta de baixo valor calórico. É também neste século, em 1869, que Paul Langerhans descreve pela primeira vez, na sua tese de doutoramento, pequenos grupos de células, em preparações de pâncreas, apesar de especular sobre a sua função. Foi Edouard Laguesse que, em 1893, classificou estas células como “células de Langerhans” e sugeriu que as mesmas formariam tecido endócrino do pâncreas, que produziria uma hormona que reduzia a glicose.

No final do séc. XIX, em 1889, Oskar Mering e Joseph von Mikowski de Estrasburgo, desenvolvem experiências de pancreatectomia em cães e chegam à conclusão que uma desordem pancreática causa diabetes, uma vez que os cães manifestavam os sinais típicos desta doença (poliúria, polidipsia, polifagia) associados com glicosúria e hiperglicemia.

No início do século XX Sir Edward Albert Sharpey-Schafer sugere que os doentes com diabetes são deficitários de um químico produzido pelo pâncreas, a insulina. Este século é então marcado pela tentativa de descobrir a insulina. Apesar de vários cientistas terem conseguido isolar extratos impuros do pâncreas com capacidade hipoglicémica, a insulina só foi descoberta em 1921, na universidade de Toronto, fruto de uma colaboração entre o cirurgião Frederick Banting, o seu aluno e assistente Charles Best, o bioquímico James Collip e o fisiologista John Macleod. Em janeiro de 1922 é tratado com insulina o primeiro doente diabético, Leonard Thompson de 14 anos.

Este grupo de cientistas disponibilizou a patente gratuitamente e com a colaboração com a empresa Eli Lilly & Co. dos EUA, conseguiu tornar a extração e purificação da insulina viável a nível comercial, ficando esta molécula amplamente disponível na América do Norte e Europa a partir de 1923 e rapidamente também em todo o mundo, salvando a vida a milhares de pacientes.

A descoberta da extração e purificação da insulina, permitiu melhorar a vida de muitas pessoas com diabetes e foi responsável pela atribuição do Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina em 1923 a Banting e Macleod que decidiram partilhar o prémio com Best e Collip. Foi também uma das maiores conquistas médicas do século XX neste campo, não só porque transformou as expectativas e melhorou a qualidade de vida dos diabéticos, mas também porque aumentou as hipóteses de trabalho no campo experimental e biológico, para o estudo da diabetes e do metabolismo dos glícidos.

Apesar de a insulina ter ajudado no tratamento da diabetes não representava a sua cura e esta doença mantinha-se entre as principais causas de morte por doença. Intensificaram-se, por isso, as pesquisas neste campo, que levaram à descoberta de outras terapias farmacológicas como os antidiabéticos orais.

Foi durante a II Guerra Mundial que o farmacologista francês Marcel Janbon descobriu o poder hipoglicémico das sulfonilureias quando tentava encontrar uma cura para a febre tifoide. A primeira sulfonilureia para a terapia da diabetes tipo 2 foi posta no mercado em 1958, porém muitas pessoas não respondiam da melhor forma a este tratamento e houve a necessidade de se procurar outros fármacos para este tipo de diabetes.

Em 1940 o médico Jean Sterne, curioso com o aparecimento de hipoglicémia em doentes tratados com biguanidas, utilizadas na altura, para tratar a malária, começou a estudar a metformina, e foi em 1959 que este fármaco começou a ser utilizado como antidiabético.

Desde então estudos científicos, permitiram desenvolver novas classes de fármacos para o tratamento da diabetes, como os inibidores da α -glicosidase (disponíveis desde 1990), sulfonilureias (disponíveis desde 1998) e tiazolidinedionas (disponíveis desde 2000). Estudos nesta área continuam a ser realizados e novos fármacos com novos alvos terapêuticos irão surgir.

2. Epidemiologia da Diabetes

No século passado assistiram-se a grandes alterações demográficas e nutricionais que determinaram um aumento crescente e preocupante do risco de desenvolvimento de algumas doenças crónicas entre elas a diabetes.

A diabetes *mellitus* é uma doença de grande incidência a nível mundial e é uma das principais doenças crónicas que atinge as nossas sociedades. É muito comum e, embora com uma distribuição não uniforme, afeta todos os países do mundo, todas as etnias e todas as classes sociais (Pinto A., 2007), representando uma importante causa de morbidade e mortalidade precoce.

De entre os tipos de diabetes, a de tipo 2 é a mais comum, correspondendo a cerca de 90% dos casos. A incidência e a prevalência deste tipo de diabetes aumentam

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

com a idade, estando também associados a este tipo de diabetes fatores genéticos e ambientais (Nunes J., 2010).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), estima-se que em 2011, cerca de 366 milhões de pessoas a nível mundial seriam afetadas pela diabetes, correspondendo a uma prevalência de 8,3%. Em relação à Europa, para uma população entre os 20 e os 79 anos, estima-se que no mesmo ano, cerca de 52,8 milhões de pessoas seriam afetadas pela mesma doença, o que corresponde a uma prevalência de 8,1% (Fig. 2.1).

Ainda segundo a IDF, até 2030, a manter-se esta tendência, o número de doentes atingidos pela diabetes, rondará os 552 milhões, aumentando a prevalência desta doença para os 9,9%. Este número corresponde a um aumento de 3 novos casos por segundo, ou 10 milhões por cada ano. A Europa e a América do Norte tendem a apresentar uma ocorrência mais elevada em relação a outros continentes, por apresentarem populações cada vez mais idosas (Nunes J., 2010).

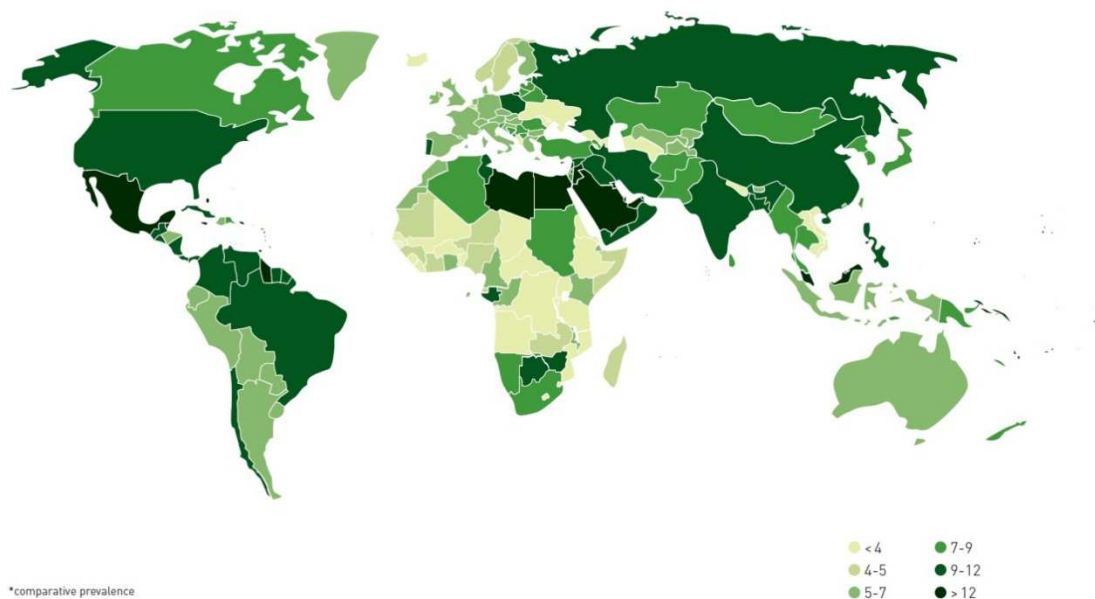


Fig. 2.1 - Percentagem da incidência da diabetes em 2011 numa população entre os 20 e 70 anos. Figura adaptada de Diabetes Atlas (5ªed.).

O aumento da prevalência previsto para os próximos anos a nível da diabetes, deve-se ao novo estilo de vida que muitas populações começaram a adotar, caracterizado por um lado pelo aumento de sedentarismo, pelo aumento do *stress* e por um estilo de vida modernizado e, por outro, a nível nutricional, pelo aumento de consumo de alimentos com elevado valor calórico (ricos em açúcares e gorduras), pelo

aumento de consumo de glícidos de absorção rápida e pela redução da ingestão de fibras (Nunes J., 2010). A tudo isto junta-se o aumento de esperança de vida dos doentes diabéticos devido aos avanços da medicina.

Em Portugal, de acordo com o Relatório Anual de 2011 do Observatório Nacional da Diabetes, em 2010 nas Unidades de Saúde Familiar (USF) de Portugal Continental encontravam-se registados 203 913 utentes com diabetes, num universo de 3 509 354 utentes. De acordo com a mesma fonte, em 2010, a prevalência desta doença nas idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos foi de 12,4% (7% diagnosticada e 5,4% não diagnosticada), o que corresponde a cerca de 991 mil doentes.

Estatisticamente assiste-se a uma diferença significativa na prevalência da diabetes entre os homens e as mulheres. A partir dos dados apresentados na Fig. 2.2, verifica-se que a ocorrência de diabetes é maior nos indivíduos do sexo masculino (8% diagnosticada e 6,7% não diagnosticada) do que nos indivíduos do sexo feminino (6% diagnosticada e 4,2% não diagnosticada).

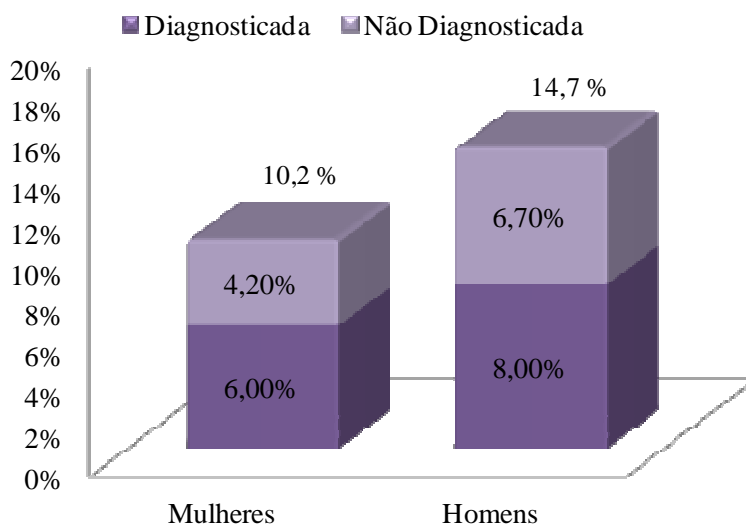


Fig 2.2 - Percentagem da incidência da diabetes em Portugal por sexo, no ano de 2010: dados do Relatório Anual de 2011 do Observatório Nacional da Diabetes, em 2010.

Mais de um quarto da população portuguesa entre os 60 e os 79 anos tem diabetes e pelos dados apresentados na Fig. 2.3, verifica-se que existe uma correlação direta entre o aumento da prevalência da diabetes e o envelhecimento dos indivíduos.

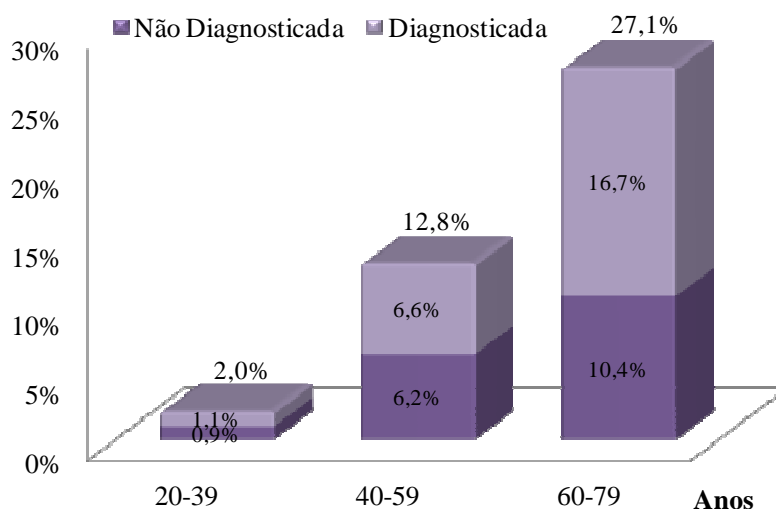


Fig. 2.3 - Percentagem da incidência da diabetes em Portugal por faixa etária, no ano de 2010: dados do Relatório Anual de 2011 do Observatório Nacional da Diabetes, em 2010.

No estudo de comparação do índice de massa corporal (IMC) da população face à percentagem da população com diabetes, verifica-se que também existe uma correlação direta entre estes dois fatores, uma vez que aproximadamente 90% da população com diabetes apresenta excesso de peso ou obesidade (Fig. 2.4). Segundo o mesmo estudo uma pessoa obesa apresenta um risco três vezes superior de desenvolver diabetes do que uma pessoa com IMC normal.

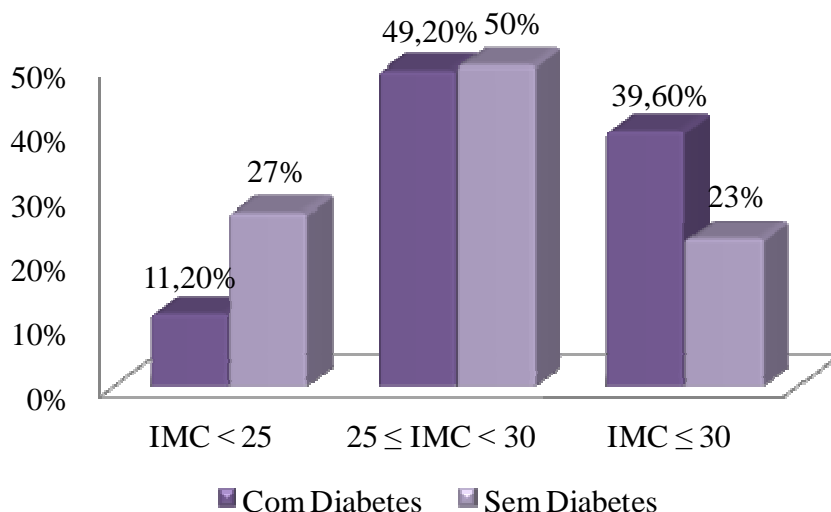


Fig. 2.4 - Distribuição da população com e sem diabetes por IMC em Portugal, no ano de 2010: dados do Relatório Anual de 2011, do Observatório Nacional da Diabetes, em 2010.

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

A diabetes em Portugal tem uma importância significativa nas causas de morte, que tem vindo a aumentar ligeiramente nos últimos anos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Óbitos por diabetes em Portugal: dados do Relatório Anual de 2011, do Observatório Nacional da Diabetes, em 2010.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Nº Óbitos por DM	3133	3956	4443	4546	4482	4569	3729	4392	4267	4603	4744
% da DM no nº Total de Óbitos	3,0	3,8	4,2	4,2	4,4	4,3	3,7	4,2	4,1	4,4	4,5

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a diabetes, sendo uma doença crónica com complicações subsequentes (que atingem todos os órgãos e sistemas, sendo considerada a principal causa de cegueira e insuficiência renal nos países desenvolvidos e um dos motivos por um grande número de amputações dos membros inferiores) e com grande exigência de controlo e cuidados, põe em causa a qualidade de vida dos indivíduos, a sua longevidade e a sua produtividade enquanto pessoas/cidadãos. Para além disso, é uma doença que comporta grandes custos para os doentes e suas famílias, mas também para o sistema de saúde de cada país, dependendo esses custos do tipo de tratamentos disponíveis.

3. A Diabetes

3.1. Classificação Etiológica

A diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crónica de etiologia variada, caracterizada por uma hiperglicemia provocada por distúrbios do metabolismo dos glúcidos, lípidos e proteínas devido a deficiência na secreção da insulina, à falta de efetividade desta nos tecidos, ou a ambas.

A classificação, atualmente aceite e aconselhada pela OMS e pela American Diabetes Association (ADA), apoia-se e reflete os diferentes estádios e os tipos etiológicos da diabetes, contemplando também outras categorias de intolerância à glicose. Assim, a diabetes é classificada de quatro formas diferentes: Diabetes *Mellitus* tipo 1, Diabetes *Mellitus* tipo 2, outros tipos específicos de Diabetes *Mellitus* e Diabetes *Mellitus* Gestacional.

Para além destes vários tipos de diabetes *mellitus* é de referir também a existência de dois tipos de intolerância à glicose, que frequentemente são estádios intermédios de hiperglicemia anteriores à diabetes: a Anomalia da Tolerância à Glicose (ATG) e a Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ).

3.1.1. Diabetes *Mellitus* Tipo 1

A diabetes mellitus do tipo 1 (DMT1) representa cerca de 5-10% de todos os casos de diabetes. Apesar de ser mais frequente em faixas etárias mais jovens, pode todavia, manifestar-se em todas as faixas etárias.

A DMT1 é consequência de uma progressiva destruição autoimune das células β do pâncreas, que conduzem a uma produção deficitária de insulina ou à sua inexistência. Por este motivo, os pacientes poderão desenvolver cetoacidose e são dependentes da terapia com insulina para sobreviver.

Geralmente, considera-se que existe uma predisposição genética para esta destruição autoimune das células β , associada a fatores ambientais precipitantes. Neste tipo de diabetes são identificados marcadores de destruição imunológica como, por exemplo, os anticorpos que atacam as células dos ilhéus de Langerhans, anticorpos que atacam a insulina e a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD).

Existe também a forma idiopática de DMT1, que se caracteriza por não ter etiologia conhecida e não apresentar evidências de processos autoimunes, apesar de manifestar insulinopenia e tendência para cetoacidose. Este tipo de diabetes, apesar de ser rara, manifesta-se principalmente em populações africanas e asiáticas, o que sugere uma forma de diabetes hereditária.

3.1.2. Diabetes *Mellitus* Tipo 2

Cerca de 90-95% dos casos de diabetes *mellitus* são do tipo 2 (DMT2) e ocorrem com mais frequência em adultos.

Neste tipo de diabetes existe insulina no corpo, porém esta é secretada de forma insuficiente ou tem um efeito reduzido e está normalmente associada a uma resistência à insulina devido à sua não efetividade. É uma doença que resulta de uma combinação de fatores genéticos, ambientais e metabólicos que levam principalmente à insulinoresistência e à incapacidade de secreção compensatória de insulina pelas células β pancreáticas. Esta insulinoresistência é na maior parte das vezes, a causa

etiopatogénica primária deste tipo de diabetes, estando muitas vezes associada à obesidade, frequentemente presente nos doentes.

A insulinoresistência pode ser provocada por vários mecanismos moleculares entre os quais, uma deficiente síntese do glicogénio, com origem no transporte de glicose (pelo transportador GLUT4), na atividade da hexocinase II ou na própria síntese do glicogénio, e ainda pode ser provocada pela circulação de ácidos gordos livres que induzem resistência. Nos últimos anos, também se tem verificado que as hormonas intestinais, mais precisamente as incretinas (GLP-1 e GIP), presentes em menor concentração na DMT2, podem estar envolvidas em mecanismos de insulinoresistência, uma vez que são capazes de aumentar a resposta de secreção de insulina após a ingestão de glicose e têm atividade antiglucagon e antiapoptóticas a nível pancreático em situações fisiológicas normais.

A DMT2 tem uma evolução lenta, podendo os doentes, numa primeira fase, apresentar níveis de insulina no sangue muito elevados, de forma a compensar a insulinoresistência. Este facto leva a que, no início da doença, seja comum os doentes não manifestarem sintomas característicos da diabetes, o que torna mais difícil o seu diagnóstico. Com o tempo e com o desenvolvimento da DMT2, a insulinemia elevada deixa de compensar a insulinoresistência e começam então, a surgir os primeiros sintomas.

Devido à referida resistência à insulina, a evolução desta doença pode levar à falência das células β do pâncreas, iniciando-se uma paragem progressiva, ao longo dos anos, da secreção compensatória de insulina por parte destas células. Esta falência progressiva, leva a que a evolução desta doença passe, numa primeira fase, por estádios de hiperglicemia intermédia (ATG e AGJ) e passe posteriormente a DMT2. Com o tempo, para além da falência secretora cada vez mais evidente, a DMT2 é também acompanhada por uma diminuição da massa das células β , possivelmente devido a processos de apoptose.

A predisposição genética, apesar de ser complexa e não estar ainda completamente esclarecida, a obesidade, o sedentarismo e a idade são fatores de risco para desenvolver DMT2 e quando estes existem em simultâneo o risco é acrescido.

3.1.3. Outros Tipos Específicos de Diabetes *Mellitus*

Existem outros tipos de diabetes *mellitus* mais específicos, mas menos comuns, em que a causa patogénica é identificável, nomeadamente:

- Infeções - a diabetes relacionada com infeções, deve-se à capacidade de alguns vírus, como por exemplo os citomegalovírus, os adenovírus, o sarampo e a rubéola, serem capazes de causar lesões ou até mesmo destruir as células β , desencadeando a doença.

- Endocrinopatias - algumas doenças endócrinas, como a síndrome de Cushing, a presença de glucagonoma ou feocromocitoma, podem provocar diabetes devido à hipersecreção de outras hormonas que antagonizam a ação da insulina. Outras doenças, como a presença de somatostatina e o hiperaldosteronismo podem originar perturbações e desequilíbrio na secreção dessa mesma substância.

- Patologias do pâncreas exócrino - qualquer patologia que afete o pâncreas de forma difusa, como uma pancreatite, traumatismos, fibrose quística, pode vir a provocar diabetes se causar lesões nas células β . Um carcinoma neste órgão pode também provocar diabetes, mesmo que não afete o pâncreas de forma difusa.

- Diabetes induzida por químicos ou fármacos - há compostos químicos, como os glucocorticoides que podem induzir diabetes, por aumentarem a resistência das células β pancreáticas à ação da insulina ou, no caso da pentamidina, por destruírem essas células.

- Formas específicas de diabetes *mellitus* imunomediada – quando a diabetes tem origem numa causa imunológica, por associação a outras doenças autoimunes que têm uma etiologia diferente da DMT1, como acontece no caso de lúpus.

- Deficiência genética na ação da insulina – quando existem anomalias genéticas que afetam os recetores de insulina, causando hiperglicemia e hiperinsulinemia variada.

- Deficiência genética da função das células β - um tipo de diabetes específico, causado por esta deficiência que origina um défice de secreção de insulina e consequentemente, pode provocar anomalias na sua ação. Este tipo de diabetes apresenta uma leve hiperglicemia na juventude e por isso, era anteriormente chamado de “diabetes tipo adulto do jovem”. É normalmente uma doença genética herdada autossomicamente de forma dominante, estando já descritos alguns cromossomas responsáveis por este efeito.

- Outras síndromes genéticas associadas à diabetes - síndromes genéticas, como as síndromes de Down, Klinefelter e Turner, em que a incidência de diabetes está aumentada.

3.1.4. Diabetes *Mellitus* Gestacional

A diabetes *mellitus* gestacional é normalmente um tipo de diabetes transitório que é diagnosticado durante a gravidez e que se deve ao facto de a mulher não conseguir produzir a insulina suficiente para o seu estado gestacional.

Nestes casos, é importante que a mulher controle os níveis de glicemia para minimizar os riscos associados. Normalmente a diabetes desaparece depois do nascimento da criança, no entanto, estas mulheres apresentam um maior risco de vir a desenvolver DMT2 no futuro, e os seus bebés também apresentam um risco acrescido de vir a desenvolver obesidade e DMT2 em adultos.

3.2. Anomalia da Tolerância à Glicose (ATG) e Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ)

A Anomalia da Tolerância à Glicose (ATG) e a Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ) são estádios intermédios entre a homeostasia normal da glicose e a diabetes, que caracterizam diferentes anomalias da regulação da glicose.

Enquanto a ATG é uma anomalia da glicose pós-prandial, ou seja, uma glicemia elevada após a ingestão de alimentos, a AGJ é uma anomalia durante um período de jejum, em que o valor de glicemia se apresenta superior ao de referência, mas inferior ao valor que é considerado para o diagnóstico da diabetes.

As pessoas com ATG têm um risco maior de desenvolver DMT2, apresentando muitas características comuns com esta doença e por isso, muitas vezes associadas à obesidade, à idade e à incapacidade do organismo utilizar a insulina que produz. Tanto a ATG como a AGJ são distúrbios propícios ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* e de doenças cardiovasculares.

3.3. Resistência à insulina

A resistência à insulina está na origem de muitas patologias como a DMT2, muitas vezes associada à obesidade. Caracteriza-se por hiperinsulinemia, diminuição da absorção de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético e diminuição da capacidade da insulina para inibir a neoglicogénese hepática e a lipólise no tecido adiposo (Wang, 2010).

A resistência à insulina é característica dos estádios que antecedem a DMT2, que se começa a manifestar quando as células β do pâncreas deixam de conseguir secretar insulina suficiente para compensar a resistência a esta substância (Wang, 2010).

Segundo Wang, no seu artigo de revisão de 2010, existem duas teorias com bastantes seguidores na comunidade científica, que explicam a patogénese da resistência à insulina. Uma das teorias defende que a desregulação do metabolismo dos ácidos gordos, que leva ao anormal armazenamento de triglicéridos (TG) no músculo esquelético e no fígado (normalmente o armazenamento dos ácidos gordos sob a forma de TG, dá-se no tecido adiposo) é a causa da resistência à insulina. Neste caso, não é o aumento específico dos TG que é responsável pela resistência à insulina, mas sim o aumento dos metabolitos intermediários dos TG. Pensa-se, por exemplo, que o diacilglicerol é responsável por ativar membros da família de proteínas PKC, que levam à fosforilação da serina do substrato do recetor da insulina-1 (IRS-1) e do recetor da insulina-2 (IRS-2) no músculo esquelético e no fígado respetivamente, interferindo assim com a ação da insulina (Wang, 2010).

A outra teoria defende que a causa da resistência à insulina associada à obesidade está relacionada com a inflamação, uma vez que a obesidade é considerada um estado crónico de baixo grau inflamatório, sendo o tecido adiposo o principal responsável por esta resposta inflamatória. Neste caso, a obesidade é responsável por aumentar no tecido adiposo, no fígado e nos macrófagos a produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF e a IL-6, que inibem a sinalização da insulina (Wang, 2010).

Os dois mecanismos referidos nas teorias expostas anteriormente podem estar presentes e atuar em simultâneo. Existem alguns RN que parecem interferir num destes mecanismos isoladamente ou nos dois ao mesmo tempo, por essa razão podem ser uma mais valia como alvos terapêuticos (Wang, 2010).

3.4. Sintomatologia e Complicações

Os níveis elevados de glicose na corrente sanguínea, característicos de todos os tipos de diabetes *mellitus* têm, como consequência direta, a necessidade de compensar a falta de energia por parte das células e como consequência indireta e a longo prazo, o desenvolvimento de problemas a nível renal, neurológico, oftalmológico e cardíaco (Fig. 3.1).

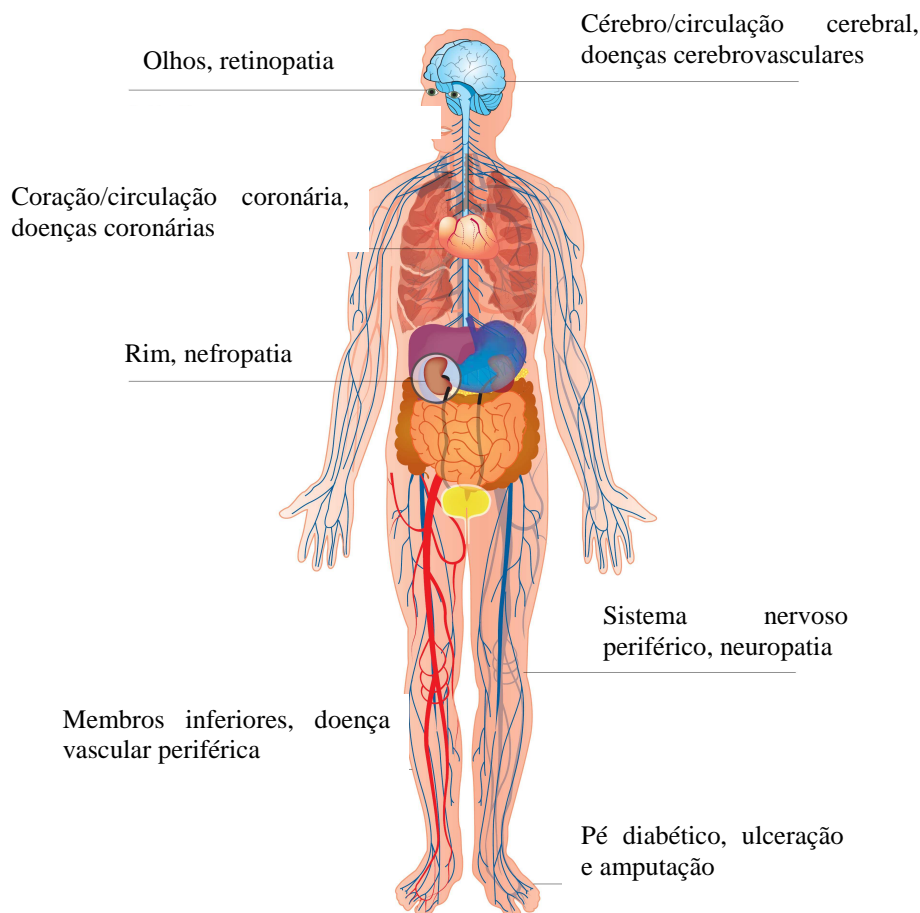


Fig. 3.1 - Complicações mais significativas associadas à diabetes e órgãos mais afetados por esta doença. Figura adaptada de IDF, Diabetes Atlas, 5ªed.,2010.

Os sintomas mais comuns da diabetes são: hiperglicemia, poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso, fadiga/falta de energia e irritabilidade.

É a falta de insulina ou a sua ineficácia, que está na origem de todos os sintomas, pois, sem esta, a glicose não é absorvida pelas células, mantendo-se no sangue e causando hiperglicemia. Para além disso, o défice de insulina, leva ao aumento da neoglicogénese e da glicogenólise que por sua vez, fazem aumentar ainda mais a glicemia. Devido a esta hiperglicemia há um aumento de osmolaridade que obriga a glicose a passar para a urina, arrastando consigo grande quantidade de água provocando poliúria e também polidipsia para compensar a perda de água.

A não existência de glicose nas células conduz a uma procura de energia alternativa a nível celular, através de processos em que se utilizam proteínas e lípidos, armazenados no organismo, como fontes energéticas. A utilização de proteínas,

presentes nos músculos, vai provocar fraqueza muscular e a degradação de lípidos (lipólise) e originar um excesso de corpos cetónicos, ácidos gordos (produtos da lipólise) que irão conduzir a uma cetoacidose, caracterizada por náuseas, vómitos e um hálito de acetona. A reduzida utilização de nutrientes e a desidratação celular provocam, consequentemente, letargia, fadiga e períodos de irritabilidade, bem como uma fome constante e difícil de saciar (polifagia).

Os diabéticos, devido ao elevado teor de glicose no sangue que favorece o desenvolvimento de microrganismos, são também mais propensos a desenvolver infeções recorrentes, a ter dificuldade de cicatrização e a desenvolver neuropatias periféricas com sensação dolorosa de formigueiro ou dormência nos membros.

A longo prazo, os elevados níveis de glicose do sangue danificam várias estruturas como os vasos sanguíneos, nervos e outros órgãos. É por este motivo que a diabetes está associada a diversas morbilidades: nefropatias, lesões a nível renal; neuropatia, lesões a nível neurológico, com possíveis ulcerações nos pés e amputações; retinopatias, a nível oftalmológico com possível cegueira; artropatia de Charcot e sinais de disfunção autonómica; doença cardiovascular, vascular periférica e vascular cerebral, principalmente se a hiperglicemia não for devidamente controlada. A DM é considerada a principal causa de cegueira e insuficiência renal nos países desenvolvidos e é também uma das principais causas de amputação dos membros inferiores.

Estes motivos, obrigam e tornam prioritário, um rigoroso controlo dos níveis de glicemia, recorrendo à terapêutica farmacológica e não farmacológica (dieta saudável e exercício físico regular), para prevenir ou retardar o desenvolvimento dos problemas que irão surgir a longo prazo.

Frequentemente os sintomas clássicos de diabetes são pouco explícitos conduzindo a um diagnóstico tardio e apenas quando as complicações crónicas se começam a manifestar. É, sem dúvida, muito importante que a diabetes seja diagnosticada o mais cedo possível, a fim de diminuir o risco de desenvolvimento de outras complicações associadas a esta doença.

3.5. Diagnóstico

É crucial que o diagnóstico da DM seja correto, uma vez que cada tipo de diabetes tem necessidade de terapêuticas diferentes e o resultado de um mau diagnóstico irá ter consequências para o resto da vida do doente.

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

Tendo em conta os sintomas que o doente apresenta, a confirmação do diagnóstico assume diferentes procedimentos, conforme se trate de uma pessoa com sintomatologia grave e grande hiperglicemia ou uma pessoa assintomática com valores de glicemia apenas ligeiramente acima do valor limite para o diagnóstico. Uma hiperglicemia grave pode ser transitória, se detetada em condições específicas também transitórias (*stress* agudo infeccioso, traumático, circulatório,...) e não é condição suficiente como diagnóstico de diabetes. Numa pessoa assintomática o diagnóstico nunca deve ser feito com base num único valor anormal de glicemia, sendo importante pelo menos um teste à glicose no sangue/plasma com resultado positivo, quer em jejum, ao acaso, ou numa prova de tolerância à glicose oral (PTGO). Quando os testes não permitirem confirmação do diagnóstico de diabetes *mellitus*, é necessário manter uma rotina de vigilância e fazer novos testes periodicamente até ter um diagnóstico claro.

Muitas vezes, o diagnóstico é feito após o aparecimento dos sintomas mais comuns: poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso, fadiga. Normalmente, após a apresentação destes sintomas, o médico recorre a análises à glicemia para fazer um despiste e diagnóstico adequado da doença. Para esse diagnóstico são considerados os critérios abaixo indicados (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Critérios de diagnóstico para a diabetes *mellitus* (DM) e hiperglicemias intermédias.

Tabela adaptada de Pinto A., 2007.

	Glicemia plasmática em jejum	Glicemia plasmática às 2h ¹
DM	≥126 mg/dl (7,0 mmol/l)	≥200 mg/dl (11,1 mmol/l)
ATG	<126 mg/dl (7,0 mmol/l)	≥140 mg/dl (7,8 mmol/l) <200 mg/dl (11,1 mmol/l)
AGJ	≥110 (6,1 mmol/l) <126 mg/dl (7,0 mmol/l)	≥140 mg/dl (7,8 mmol/l) ²

1- Determinada com uma prova de tolerância à glicose oral (PTGO), teste em que se mede a glicemia passado 2h após a ingestão de 75g de glicose.

2- Se for medida.

Para se fazer um correto diagnóstico de DM, por vezes é necessário ter em atenção não só os valores de análises à glicemia e a sintomatologia, mas também alguns fatores adicionais, como etnia, história familiar, idade, obesidade e patologias concomitantes.

4. Recetores Nucleares

Os Recetores Nucleares (RN) constituem uma superfamília de proteínas que actuam como fatores de transcrição. A sua atividade está dependente de ligandos e por isso atuam como ativadores/repressores de transcrição que respondem a sinais, como as hormonas, as vitaminas e os lípidos (Germain *et al.*, 2006; Sonoda *et al.*, 2008).

Nos anos 60, Jensen identificou bioquimicamente o primeiro RN, muito antes do gene que o codifica ter sido clonado, ao descobrir que a atividade das células alvo do estradiol era mediada por um recetor com grande e específica afinidade (Germain *et al.*, 2006).

Só vinte anos mais tarde é que os primeiros recetores nucleares humanos foram clonados. Em 1985, Evans e os seus colaboradores clonaram o primeiro gene que codifica o recetor dos glucocorticoides (GR), e em 1986 foi clonado o recetor dos estrogénios (ER) por Greene e Chambon. Desde então, outros recetores nucleares foram identificados e foram reconhecidos como uma superfamília de fatores de transcrição (Germain *et al.*, 2006).

Os recetores nucleares regulam a transcrição de genes alvo, ativando-a ou reprimindo-a, em geral através da ligação de ligandos. Quando os agonistas endógenos (entidades hidrofóbicas) se ligam aos RN, provocam uma alteração na conformação dos recetores, permitindo que estes se liguem, sob forma de monodímero, homo ou heterodímero, a sequências específicas do DNA, os chamados elementos de resposta hormonal (HRE) localizados na região promotora, de um determinado gene alvo. (Alexander *et al.*, 2009). A ligação dos ligandos e as consequentes alterações na conformação, levam também, ao recrutamento ou dissociação de outras proteínas, originando um grande complexo multiproteico que irá promover a transcrição do gene (Alexander *et al.*, 2009).

Estudos filogenéticos dos RN mostram que estes surgiram com os primeiros metazoários, muito antes da divergência entre vertebrados e invertebrados. A construção da árvore filogenética permitiu a classificação dos RN por grupos evolutivos, havendo assim seis subfamílias. A nomenclatura de cada RN é determinada pela subfamília a que pertence, pelo grupo e pelo número de membro, que corresponde à sua posição no grupo a que pertence (ex. NR1C3 subfamília de recetores nucleares 1, do grupo C, membro 3,

cujo nome comum é recetor ativado por proliferadores de peroxissoma γ – PPAR γ) (Germain et al., 2006).

4.1. Estrutura

Estruturalmente, os RN são constituídos por seis domínios comuns, classificados de A a F, que no geral se mantiveram, ao longo do tempo, com sequências e funções semelhantes. As regiões mais importantes são os domínios denominados *DNA-binding domain* (DBD) e *ligand binding domain* (LBD) e são estes domínios os mais conservados ao longo da evolução. Na figura abaixo (Fig. 4.1) está representada, esquematicamente, a estrutura base dos RN (Germain et al., 2006; Sonoda et al., 2008).

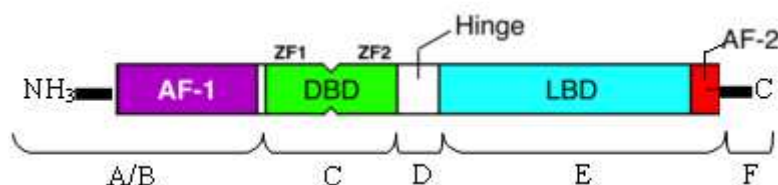


Fig. 4.1 - Esquema da estrutura/domínios comuns dos RN. Seis domínios (A a F): A/B contém o N-terminal e o domínio de ativação AF-1 (*activation function 1*); C é o domínio de ligação ao DNA (DBD - *DNA-binding domain*), constituído por dois *zinc fingers* (ZF1 e ZF2); D é a região *hinge*; E é a região constituída pelo domínio de ligação ao ligando (LBD - *Ligand binding domain*) e pelo domínio de ativação AF-2 (*activation function 2*); F é o domínio final C-terminal. Figura adaptada de Germain et al., 2006 e Sonoda et al., 2008.

A região N-terminal (A/B), altamente variável, é constituída pelo domínio de ativação independente do ligando, chamado de AF-1 (*activation function 1*). Esta região pode também interagir com cofatores, como coativadores ou outros fatores de transcrição (Germain et al., 2006; Sonoda et al., 2008).

O domínio (C) de ligação ao DNA (DBD) é a região mais conservada, constituída por dois *zinc fingers* de cisteína, que se ligam a genes alvo em sequências específicas, chamadas de elementos de resposta hormonal (HRE). As HRE são constituídas normalmente por duas pequenas áreas (*motifs*) de seis nucleótidos AGGTCA ou variantes, separadas por alguns nucleótidos. A especificidade de ligação de cada RN deve-se à orientação destas sequências (Fig. 4.2) e à distância entre elas (normalmente entre 3 e 5 nucleótidos) (Germain et al., 2006; Sonoda et al., 2008).

A região *hinge* (D), é flexível e faz a ligação entre a região DBD e a LBD, permitindo que estas adotem conformações diferentes. Este domínio tem a capacidade

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

conferir flexibilidade à estrutura dimerizada dos RN, permitindo-lhes interagir com várias sequências de HRE (Germain *et al.*, 2006; Sonoda *et al.*, 2008).

O domínio (E) de ligação ao ligando (LBD) é menos conservado que o DBD e funcionalmente é único para os RN, uma vez que é responsável pelo reconhecimento do ligando e pela sua ligação, pela dimerização do recetor e pela interação com cofatores. É constituído por 12 hélices sendo a última denominada AF-2 (*activation function 2*), cuja função, dependendo do ligando, é ativar a transcrição (Germain *et al.*, 2006; Sonoda *et al.*, 2008).

O domínio final C-terminal (F), cuja função ainda é pouco compreendida, não está presente em todos os recetores e apresenta sequências muito variáveis (Germain *et al.*, 2006; Sonoda *et al.*, 2008).

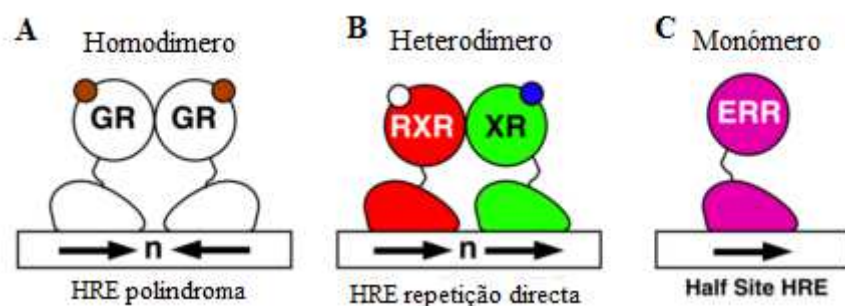


Fig. 4.2 - Esquemas representando exemplos dos vários tipos de dimerização dos RN e da respetiva ligação aos HRE do DNA. A: Homodimerização do GR e ligação deste ao HRE palíndromo; **B:** Heterodímero do RXR com XR (ex: FXR, PXR) e ligação deste a um HRE constituído por uma repetição directa; **C:** Recetor monomérico ERR ligado a um HRE *half site*. As setas representam a região de reconhecimento do RN, constituída pela sequência AGGTCA ou variantes. Figura adaptada de Sonoda *et al.*, 2008.

Os RN podem ser classificados, conforme o tipo de agonistas endógenos que se lhes ligam, em duas subclasses principais: recetores de hormonas esteroides e recetores de hormonas não-esteroides (Alexander *et al.*, 2009).

A atividade dos RN e as suas vias de sinalização são extremamente complexas. Estas podem ser genómicas ou não, dependentes ou independentes de ligandos e podem mediar a repressão do gene, a libertação de repressão do gene, a ativação do gene ou a transrepressão do gene (Germain *et al.*, 2006). Os dois principais mecanismos das vias de sinalização, e também os mais estudados, são:

a) Alguns recetores, como os recetores de hormonas esteroides, estão presentes no citoplasma no estado inativado (e sem ligando), associados a um complexo de proteínas *chaperone* e *heat shock* (HSP). Quando o ligando atravessa a membrana celular e se liga ao LBD do RN, induz mudanças conformacionais neste (no AF-2) que

levam à dissociação do complexo proteico e do RN. Após a dissociação os RN, normalmente, formam um dímero entre si ou com outros RN. Este dímero entra no núcleo, onde se liga ao gene alvo nas sequências específicas de DNA (HRE) e interage com outros fatores reguladores da transcrição, como as acetiltransferases e as desacetilases, e com a RNA-polimerase, regulando assim a transcrição do gene alvo (Alexander *et al.*, 2009; Sonoda *et al.*, 2008).

b) Outros recetores, como os recetores de hormonas não-esteroides, estão presentes no núcleo (sob a forma de dímero ou não) ligado ao gene alvo no HRE e também a um complexo correpressor, como por exemplo ao complexo SMRT / NCOR (SMRT - *silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*; NCOR - *nuclear recetor correpressor*) e HDAC (histona desacetilase). Depois da hormona/agonista passar o invólucro nuclear, esta liga-se ao RN no LBD e induz mudanças conformacionais neste (no AF-2), que facilitam a libertação dos complexos correpressores e da HDAC e o recrutamento de coativadores e complexos HAT (histona acetiltransferase), resultando na transcrição do gene a que o RN está ligado (Alexander *et al.*, 2009; Sonoda *et al.*, 2008).

O facto da atividade dos RN depender de ligandos, torna-os no elo de ligação entre os sinais do organismo e das células, e o genoma do organismo (Sonoda *et al.*, 2008). Os RN regulam vários processos fisiológicos importantes, como o crescimento de tecidos e formação de tumores, a reprodução, a resposta imunológica, a função cardíaca e vascular, a eliminação de toxinas, e a homeostasia do metabolismo de lípidos e de glícidos (Germain *et al.*, 2006; Sonoda *et al.*, 2008).

É por este motivo que a disfunção das vias de sinalização controladas por estes recetores está associada a várias doenças reprodutivas, proliferativas e metabólicas e, conseqüentemente, os recetores nucleares podem ser potenciais alvos terapêuticos, através da utilização de ligandos que irão modular a ação/sinalização destes recetores (Germain *et al.*, 2006; Sonoda *et al.*, 2008).

Atualmente existem muitos estudos, que demonstram que os RN controlam uma grande variedade de processos metabólicos, através da regulação da expressão de genes que codificam enzimas-chaves, transportadores e outras proteínas envolvidas na homeostasia metabólica.

Mais à frente, neste trabalho, apresentam-se os RN que interferem com as vias metabólicas energéticas, principalmente as relacionadas com o metabolismo dos glícidos, que podem vir a ser ou já são alvos terapêuticos para diabetes *mellitus* tipo 2.

4.2. Conceitos importantes relacionados com a sinalização dos RN

Correguladores – macromoléculas como proteínas, que associadas aos RN modulam a sua atividade transcricional. Os coativadores promovem positivamente esta atividade, por recrutarem histona acetiltransferases (HAT) que tornam o DNA mais disponível para transcrição ao enfraquecerem a ligação das histonas com o DNA. Os correpressores promovem negativamente a atividade do RN, por recrutarem histona desacetilases (HDAC), que reforça a ligação das histonas com o DNA, reprimindo assim a transcrição do gene.

Agonista – ligando que induz a conformação ativa do RN à qual os coativadores se ligam, levando ao aumento da expressão do gene.

Antagonista – ligando sem efeito regulador, mas que se liga ao RN e impede a ligação de agonistas.

Agonista inverso – ligando que estabiliza o recetor na sua conformação inativa e consegue recrutar correpressores.

Agonista parcial – ligando que apenas é parcialmente eficaz como agonista, independentemente da dose disponível.

Modulador seletivo do recetor – ligando seletivo cuja ação e função é específica e varia com o tipo de célula/tecidos e/ou promotor ou seja, podem ter uma ação agonista num tipo de tecido e antagonista noutra. Por exemplo em tecidos onde a concentração de proteínas coativadoras seja superior às correpressoras, o ligando irá deslocar o equilíbrio na direção do agonista, enquanto que em tecidos onde correpressores dominam, o ligando irá comportar-se como um antagonista.

5. PPAR

Os recetores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são um grupo formado por três proteínas, PPAR α (NH1C1), PPAR β/δ (NH1C2) e PPAR γ (NH1C3), membros da subfamília *Thyroid Hormone Receptor-like* e do grupo *Peroxisome proliferator-activated receptor* (subfamília de recetores nucleares 1, do grupo C) (Armoni *et al.*, 2007; Wang, 2010).

O PPAR α foi o primeiro recetor deste grupo a ser identificado nos anos 90, durante a pesquisa do alvo molecular dos agentes proliferadores de peroxissoma em roedores, tendo sido os outros dois membros, PPAR β/δ e PPAR γ clonados em 1992 (Lalloyer & Staels, 2010).

Estes recetores apresentam uma estrutura semelhante aos outros RN: região N-terminal com os domínios A/B (pouco conservado entre os três tipos de PPAR); a região DBD (domínio C) que tem a sequência de nucleótidos que se ligam aos elementos de resposta do PPAR (PPRE) presentes na região reguladora dos genes alvo dos PPAR; a região *hinge* (domínio D); o domínio E onde está presente o LDL e o AF-2 e por último o domínio F do C-terminal. Como era de esperar os domínios DBD e LBD são as regiões mais conservadas de todos os PPAR (Berger *et al.*, 2002; Luconi *et al.*, 2010).

Na célula, depois de ser ativado por um ligando, os PPAR ligam-se a genes alvo específicos nos PPRE, situados na zona promotora. Ligam-se sob forma de heterodímero com o recetor X de retinóides - RXR, ativando ou reprimindo a transcrição destes genes. A ligação de ligandos agonistas, altera a conformação dos PPAR e estabiliza-a, de modo a que os correpressores se libertem e que sejam recrutados coativadores, o que resulta num aumento da transcrição dos genes alvo. É importante também referir que os PPAR são incapazes de se ligarem ao DNA como monómeros (Guo & Tabrizchi, 2006; Higgins & Depaoli, 2010; Sugii & Evans, 2011; Wang, 2010).

A sequência característica dos PPRE é formada por dois hexanucleótidos e separada por um nucleótido (AGGTCA N AGGTCA) (Berger *et al.*, 2002; Sugii & Evans, 2011; Wang, 2010).

Os RN desta subfamília diferem de outros RN, na medida em que o seu LBP (*ligand-binding pocket*), cavidade onde os ligandos se ligam, tem uma grande dimensão e por isso conseguem acondicionar uma considerável variedade de lípidos endógenos e seus derivados (Wang, 2010).

As atividades e os níveis de expressão dos PPAR são modulados pela dieta, pelo estado nutricional e pelos estados metabólicos (Wang, 2010).

Em conjunto, os membros da subfamília PPAR através das suas funções e da sua distribuição em tecidos distintos, atuam como sensores de ácidos gordos e desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico e glicídico, essenciais para a homeostasia energética. Estão também implicados no processo

fisiológico da inflamação, ou seja, estes RN estão implicados nos dois mecanismos da patogénese da resistência à insulina e por isso têm um grande impacto na sensibilidade à insulina e na homeostasia da glicose. (Higgins & Depaoli, 2010; Lalloyer & Staels, 2010; Wang, 2010).

Estes RN são, por isso, importantes alvos terapêuticos em doenças como a obesidade, doenças com manifestações de resistência à insulina, como a DMT2 e a síndrome metabólica. As TZD (tiazolidinedionas) são fármacos, que já são utilizados para o tratamento da diabetes e têm o PPAR γ como alvo terapêutico para a DMT2. Estes fármacos apresentam, no entanto, vários efeitos indesejáveis associados, pelo que esta subfamília de RN tem sido objeto de vários estudos, no intuito de encontrar novas moléculas terapêuticas com o mesmo efeito de sensibilização à insulina e com menos efeitos adversos (Wang, 2010).

Mecanismos de ação dos PPAR

O PPAR regula a transcrição de genes através de vários mecanismos, entre eles a transativação dependente de ligando, transrepressão dependente de ligando e repressão independente de ligando (Fig.5.1) (Ricote & Glass, 2007).

Na transativação dependente de ligando, a ativação da transcrição ocorre pela ligação direta do heterodímero PPAR-RXR aos PPRE nos genes alvo. A ligação de um ligando agonista leva ao recrutamento de complexos coativadores, como a família p300/CBP e a SRC/p160, que modificam a estrutura da cromatina e facilitam a montagem da maquinaria de transcrição. (Ricote & Glass, 2007; Sugii & Evans, 2011).

Na transrepressão dependente de ligando, após a ligação do agonista aos PPAR, estes reprimem a transcrição ao antagonizar as ações de outros fatores de transcrição, como o NF κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1). Neste mecanismo estes RN não se ligam diretamente ao DNA (Ricote & Glass, 2007).

Na repressão independente de ligando, o heterodímero PPAR-RXR liga-se aos PPRE e na ausência de ligando, recrutam complexos correpressores que medeiam a repressão ativa, antagonizando a ação de coativadores e mantendo os genes em estado reprimido. Alguns desses complexos correpressores são o NCoR e o SMRT que estão associados a uma HDAC (Ricote & Glass, 2007).

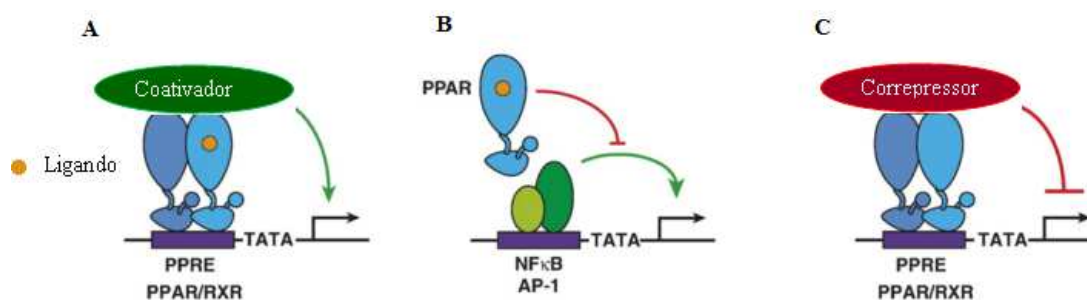


Fig. 5.1 – Mecanismos de regulação da transcrição de genes pelo PPAR. A: Transativação dependente de ligando; B: Transrepressão dependente de ligando; C: Repressão independente de ligando. Figura adaptada de Ricote & Glass, 2007.

5.1. PPAR α

O PPAR α é expresso principalmente no fígado, a um nível moderado nos rins e no tecido adiposo castanho, e num nível relativamente baixo no coração e no intestino (Guo & Tabrizchi, 2006; Armoni *et al.*, 2007; Wang, 2010).

Este RN tem um papel muito importante na regulação do metabolismo dos ácidos gordos e a sua principal função é promover a sua utilização (Guo & Tabrizchi, 2006; Wang, 2010).

A ação deste RN na homeostasia da glicose ainda não é bem clara, contudo existem estudos que demonstram que a sobreexpressão do PPAR α aumenta os níveis de glicose e de insulina em circulação, apresentando uma diminuição da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina. Revelam também uma diminuição da expressão de GLUT4 no músculo esquelético e no coração o que pode ser uma das causas dos efeitos que este RN tem na homeostasia da glicose. O PPAR α tem também a capacidade de diminuir os TG em circulação e de aumentar o HDL, no entanto também aumenta os lípidos no tecido cardíaco e está associado a cardiomiopatia (Wang, 2010).

5.2. PPAR β/δ

O PPAR β/δ é expresso de forma ubíqua por todo o organismo, todavia é o membro desta subfamília menos estudado e menos caracterizado. Alguns estudos mostraram que este recetor desempenha várias ações importantes na regulação do metabolismo lipídico e da homeostasia da energia, designadamente que os agonistas do PPAR β/δ parecem ser úteis no tratamento de doenças relacionadas com o metabolismo, como a obesidade, a dislipidemia e a resistência à insulina. Os estudos efetuados até

agora são, no entanto, insuficientes e este recetor carece de mais atenção. (Armoni *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2012; Guo & Tabrizchi, 2006; Lee *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm apresentado evidências de que a ativação deste RN aumenta o colesterol HDL e diminui o LDL e os TG, e reduz os fatores de risco cardiovascular, dislipidemia, obesidade e inflamação e não está associado a aumento de peso (Gross & Staels, 2007; Wang, 2010).

Um estudo de Lee e colaboradores (2006), concluiu que o PPAR β/δ aumenta a lipogénese e a glicólise no fígado, enquanto ativa o consumo de gordura no músculo. Sugere que a ativação do PPAR β/δ promove uma mudança metabólica de modo a reduzir a produção hepática de glicose, permitindo um aumento da sensibilidade à insulina. Este autor diz também que é provável que o PPAR β/δ exerça um efeito mais profundo no músculo e nos adipócitos com o tratamento prolongado do ligando agonista. É sugerido que este RN seja um futuro alvo terapêutico para o tratamento da resistência à insulina e de doenças relacionadas com esta, como a DMT2.

A ativação do PPAR β/δ tem também mostrado um aumento da expressão de GLUT4, uma diminuição dos níveis de glicose sanguínea, e atua na prevenção da hiperinsulinemia, da esteatose dos tecidos, da intolerância à glicose e da resistência à insulina (Wang, 2010).

Um estudo recente de Cao (2012) demonstrou que a ativação do PPAR β/δ melhora a secreção de insulina, provavelmente através da via JNK–MafA–GLUT2.

A ativação deste RN promove ainda benefícios metabólicos associados ao exercício físico. Existe uma forte relação entre a expressão induzida do PPAR δ , pelo exercício físico, e a melhoria dos parâmetros clínicos em doentes com DMT2, sugerindo que o PPAR δ pode mediar alguns efeitos benéficos do exercício físico na DMT2 (Wang, 2010).

5.3. PPAR γ

O gene do PPAR γ está presente no cromossoma 3, na região 3p25. A sua transcrição dá origem a duas proteínas variantes, PPAR γ 1 e PPAR γ 2, que diferem apenas na sequência da extremidade N-terminal, devido à existência de promotores diferentes e de *splicing* alternativo, mas apresentam uma atividade transcricional semelhante (Armoni *et al.*, 2007; Luconi *et al.*, 2010; Sugii & Evans, 2011).

O PPAR γ (nas suas duas isoformas) é expresso maioritariamente no tecido adiposo. Também é expresso em menor extensão noutros tipos de células, como os macrófagos onde a sua ativação, aqui em resposta a estímulos inflamatórios, leva à transrepressão de genes ativados. Além disso é expresso de forma moderada nos rins, no fígado e no intestino e de forma muito limitada no músculo. Em todos os tecidos o PPAR γ 2 é menos abundante que o PPAR γ 1. A isoforma PPAR γ 1 é expressa de forma ubíqua nos tecidos, enquanto que a isoforma PPAR γ 2 é especificamente expressa no tecido adiposo (Luconi *et al.*, 2010; Sugii & Evans, 2011; Whitehead, 2011).

A ligação de um ligando ao PPAR γ provoca uma alteração de conformação específica, capaz de recrutar um complexo proteico corregulador (coativador ou correpressor). As diferentes formas dos ligandos interagirem com o recetor e com os correguladores explica a existência de variadas respostas obtidas para diferentes ligandos (Armoni *et al.*, 2007; Whitehead, 2011).

O PPAR γ , assim como os outros PPAR, possui um LBP grande, permitindo que se liguem uma grande variedade de ligandos. (Whitehead, 2011) Alguns ligandos naturais deste recetor são os ácidos gordos e seus derivados, como lipoproteínas e eicosanoides. Alterações fisiológicas como o jejum, a dieta alimentar e o exercício físico afetam a concentração destes ligandos naturais e a consequente ativação do PPAR γ , que é também afetada por alterações fisiopatológicas como a inflamação crónica, a diabetes e a aterosclerose (Higgins & DePaoli, 2010).

O facto de muitos ácidos gordos e seus derivados terem a capacidade de se ligar ao recetor PPAR γ , permite que este funcione como sensor fisiológico daqueles, coordenando assim o metabolismo dos lípidos, o que por sua vez influencia também o metabolismo da glicose (por interferir na sensibilização à insulina), por regular a expressão dos genes envolvidos na captação dos lípidos, na adipogénese e inflamação (Armoni *et al.*, 2007; Sugii & Evans, 2011; Wang, 2010; Whitehead, 2011).

O PPAR γ está associado geneticamente à DMT2, à obesidade e à síndrome metabólica conforme a mutação ou polimorfismo (Higgins & DePaoli, 2010). Esta associação deve-se ao facto do PPAR γ regular uma panóplia de genes que codificam proteínas ou péptidos que intervêm na patogénese da resistência à insulina (Guo & Tabrizchi, 2006).

É devido ao facto do PPAR γ apresentar um papel muito importante na sensibilização à insulina e consequentemente na resistência a esta, que é um alvo terapêutico muito promissor. A classe de fármacos tiazolidinedionas (TZD), também

conhecidas por glitazonas e já utilizadas no tratamento da DMT2, têm como alvo terapêutico este recetor e já demonstraram deter a capacidade de melhorar a sensibilidade à insulina (Higgins & DePaoli, 2010).

A DMT2 apresenta a característica de resistência à insulina o que é possivelmente um fator que contribui para o aparecimento desta patologia (Higgins & Depaoli, 2010).

Para melhorar a resistência à insulina são utilizadas atualmente medidas não farmacológicas como o exercício físico, a dieta equilibrada e saudável e a perda de peso, e existem também dois fármacos da classe das TZD utilizados para este fim, a rosiglitazona (Avandia[®]) e a pioglitazona (Actos[®]). Estes fármacos têm o recetor nuclear PPAR γ como alvo terapêutico, para o qual são agonistas totais (Higgins & DePaoli, 2010).

5.3.1. Tiazolidinedionas

São uma classe de fármacos antidiabéticos que atuam como sensibilizadores de insulina, por atuarem como ligandos específicos do recetor PPAR γ (Sugii & Evans, 2011).

A rosiglitazona e a pioglitazona são os dois fármacos desta classe mais utilizados em monoterapia ou em terapia combinada com outros fármacos antidiabéticos.

A existência de estudos que indicavam o aumento do risco cardiovascular associada à utilização da rosiglitazona, levou à sua suspensão em Portugal e na União Europeia, em 2011, pela Agência Europeia do Medicamento e à restrição do seu uso nos Estados Unidos da América, pela *Food and Drugs Administration* (FDA). A segurança da pioglitazona está, atualmente, a ser posta em causa, por existirem estudos que evidenciam que a sua utilização a longo prazo pode estar associada a um risco aumentado de cancro de bexiga (Whitehead, 2011).

Estes factos realçam a importância do desenvolvimento de novos fármacos que tenham também como alvo terapêutico o PPAR γ , mas que não tenham os efeitos adversos associados à classe utilizada atualmente.

A troglitazona, a primeira TZD a ser comercializada em 1997, foi retirada do mercado em 2000 por conduzir a grave hepatotoxicidade (insuficiência hepática). A rosiglitazona e a pioglitazona também têm alguma hepatotoxicidade, mas ocorre de forma menos grave e muito menos frequente. Apesar disso deve-se monitorizar as

enzimas hepáticas ao longo do tratamento. Alguns estudos propõem a metabolização destes fármacos como causa desta toxicidade e não a ativação do PPAR γ (Guo & Tabrizchi, 2006; Whitehead, 2011).

Os efeitos das TZD

Em doentes com DM2, as TZD já provaram a sua eficácia na melhoria da sensibilidade à insulina e do metabolismo da glicose, demonstrando uma eficaz redução da glicemia e da HbA_{1c}. Para além dos efeitos antidiabéticos, as TZD também já demonstraram que melhoram os níveis de colesterol HDL, reduzem os níveis de insulina (associada à hiperinsulinemia), dos triglicéridos e dos ácidos gordos livres (Sugii & Evans, 2011; Whitehead, 2011).

As TZD, em relação a outros fármacos antidiabéticos, têm a vantagem de terem uma ação potente e duradora na redução da glicemia, sem os riscos de hipoglicemia e os efeitos tóxicos gastrointestinais associados a outros antidiabéticos. (Higgins & DePaoli, 2010). Além disso as TZD apresentam a vantagem de reprimirem a expressão dos genes de fatores proinflamatórios (Whitehead, 2011).

Estudos em animais e em humanos com aplicação de TZD mostram que esta classe de fármacos é capaz de baixar os níveis de glicose e de insulina, por aumentar a glicose disponível para o músculo esquelético e também por ter alguma influência na neoglicogénese hepática ao inibi-la. As TZD são assim, capazes de melhorar a ação da insulina no músculo esquelético e no fígado e são, por isso, consideradas uma classe de antidiabéticos sensibilizadora de insulina (Wang, 2010).

Todavia estes fármacos apresentam uma série de efeitos indesejáveis, como o aumento de peso, devido ao aumento da massa do tecido adiposo e à retenção de líquidos, edema, insuficiência cardíaca, diminuição da densidade óssea com consequente aumento de possibilidade de fratura óssea (Higgins & Depaoli, 2010; Whitehead, 2011).

O aumento de peso está relacionado com a dose do fármaco e o tempo de utilização, é normalmente estabilizado após 6 meses de tratamento e é evitável com dieta e exercício físico. Deve-se possivelmente à retenção de líquidos e à acumulação de gordura, uma vez que o PPAR γ aumenta o armazenamento de ácidos gordos em novos adipócitos (Guo & Tabrizchi, 2006).

A retenção de líquidos e edema devem-se provavelmente a causas diversas que não estão ainda bem esclarecidas. Uma das causas apontadas por alguns autores, é a

ativação do PPAR γ , presente no tubo coletor do nefrônio, que estimula a reabsorção de sódio e conseqüentemente a reabsorção de água.

Quanto à insuficiência cardíaca, estudos referem que os efeitos das TZD estão dependentes da especificidade da ativação do PPAR. As TZD estão assim associadas a um maior risco de falha cardíaca em doentes com e sem história prévia de insuficiência cardíaca. A retenção de líquidos também é uma causa apontada para a ocorrência de insuficiência cardíaca (Guo & Tabrizchi, 2006).

No geral há evidências de que as TZD utilizadas atualmente, provocam danos no esqueleto por inibição direta da formação de osso, diminuindo a densidade óssea e aumentando o risco de fratura óssea, principalmente em mulheres. Ainda não estão bem esclarecidas a questão da quantidade de perda de osso produzida pela TZD e se é reversível ou se pode prevenir.

Antes da utilização das TZD deverão ser avaliados os fatores de risco de cada doente que possam despoletar reações adversas. Em doentes diabéticos que utilizam as TZD como terapêutica farmacológica antidiabética, é aconselhável fazer uma monitorização dos parâmetros referidos, para evitar o desenvolvimento de efeitos adversos, de modo a que estes tenham um menor impacto na sua saúde.

Estes fármacos antidiabéticos e o PPAR γ foram descobertos de forma independente, e foram só relacionados mais tarde, quando se descobriu que as TZD são agonistas do PPAR γ e que os efeitos benéficos sensibilizadores da insulina são provocados pela ativação deste RN por estes fármacos (Wang, 2010).

5.3.2. Consequências da ativação do PPAR γ

Uma das funções do tecido adiposo é o armazenamento da energia em excesso, a fim de evitar a acumulação de lípidos noutros tecidos, e a libertação dessa energia quando outros tecidos necessitam. Tem também função endócrina, produzindo as adipocinas que sinalizam o metabolismo de todo o corpo. O tecido adiposo é muito importante para a homeostasia da energia de todo o corpo (Wang, 2010).

O PPAR γ é um regulador primordial da adipogénese, sendo o único fator conhecido, necessário e suficiente para induzir a diferenciação de adipócitos e para manter as funções características destas células (Armoni *et al.*, 2007; Sugii & Evans, 2011; Wang, 2010).

No tecido adiposo, a ativação do PPAR γ induz a expressão de genes adipogénicos que codificam proteínas responsáveis pelo transporte de ácidos gordos e

pelo seu armazenamento, e pela promoção da adipogénese (Wang, 2010). Em adipócitos, a ativação do PPAR γ tem mostrado um aumento da regulação de proteínas envolvidas no metabolismo dos lípidos. Estas ações promovem a utilização dos ácidos gordos livres disponíveis no organismo, baixando os seus níveis na circulação, obtendo-se assim um efeito benéfico no estado de resistência à insulina (Guo & Tabrizchi, 2006).

Além disso, a ativação do PPAR γ no tecido adiposo regula a produção de adipocinas, como a adiponectina e a resistina, que já demonstraram ter impacto na sensibilidade à insulina no músculo esquelético e no fígado (Wang, 2010).

Nestas células a ativação deste RN tem também a capacidade de reprimir a expressão dos genes envolvidos na resistência à insulina nomeadamente o TNF- α , a leptina, a resistina, IL-6 (interleucina-6) (Guo & Tabrizchi, 2006).

Se por um lado o PPAR γ , ao ser ativado, vai reprimir a expressão dos genes envolvidos na resistência à insulina, por outro lado, a sua ativação induz a expressão de genes implicados na sensibilização à insulina, como o da adiponectina, da PEPCK, da proteína transportadora de ácidos gordos e do recetor do substrato de insulina 2 (IRS-2) (Guo & Tabrizchi, 2006).

A expressão de PPAR γ no fígado e no coração é baixa, no entanto, tem-se verificado que em alguns estados patológicos, estes tecidos podem expressar quantidades consideráveis deste recetor, o que vai ter impacto significativo na homeostasia metabólica e na função do tecido (Wang, 2010).

Estudos em modelos animais diabéticos e obesos, em que a expressão hepática do PPAR γ está aumentada, sugerem que esta pode ser responsável pela esteatose hepática. Porém pequenos estudos clínicos, em seres humanos com fígado gordo não-alcoólico, demonstraram que as TZD reduzem o nível de lípidos hepáticos, indicando que a ação da ativação do PPAR γ continua a ser predominante no tecido adiposo. No entanto, nestes indivíduos, não se conheciam os níveis de PPAR γ hepático (Wang, 2010).

Estudos em tecido ventricular humano e de ratinho, com síndrome metabólica e estenose aórtica, sugerem que quando a expressão de PPAR γ no coração está elevada, devido a determinados estados patológicos, poderá provocar uma sobrecarga lipídica que contribui para o aparecimento de cardiomiopatia e que pode levar à insuficiência cardíaca. Um dos efeitos adversos das TZD, no tratamento da diabetes, é efetivamente a insuficiência cardíaca como já foi referido anteriormente (Wang, 2010).

A concentração do PPAR γ é relativamente baixa no músculo esquelético e a sua importância fisiológica neste músculo continua pouco definida. As TZD, *in vitro*, quando em meio de cultura com células de músculo esquelético, têm sido relacionadas com o aumento da captação de glicose estimulada pela insulina, que é mediada pelo aumento da atividade estimulada pela insulina, do PI3K (fosfatidil-inositol 3 cinase) e translocação do GLUT4 (Sugii *et al.*, 2009).

Embora a função do PPAR γ no desenvolvimento do tecido adiposo esteja bem estabelecida, o seu nível reduzido nos tecidos metabolicamente importantes na homeostasia da glicose (músculo esquelético, fígado e células β pancreáticas) levanta a questão da sua possível importância fisiológica e farmacológica nesses tecidos. Além disso, a sua alta expressão em macrófagos é bem estabelecida em indivíduos obesos, cuja presença nos tecidos adiposos com função comprometida, pode ser patologicamente importante. De qualquer forma, a importância da fisiopatologia do PPAR γ nos tecidos e células não adiposas ainda não está clara.

5.3.3. A influência dos tecidos no mecanismo de sensibilização à insulina do PPAR γ

A ligação de agonistas ao PPAR γ aumenta ou diminui a transcrição de genes, que resulta no aumento da regulação de fatores de sensibilização à insulina e diminuição da regulação de fatores insulino-resistentes (Guo & Tabrizchi, 2006).

Os mecanismos moleculares subjacentes a estes efeitos não são totalmente compreendidos. Para tentar eliminar esta lacuna, têm sido realizados estudos em modelos animais (Sugii & Evans, 2011).

O *knockout* do PPAR γ , nos principais tecidos e células que interferem na homeostasia da glicose, varia conforme o tecido: pâncreas (células β), músculo, fígado (hepatócitos) e tecido adiposo (adipócitos e macrófagos) (Sugii & Evans, 2011).

O *knockout* em ratinhos, feito separadamente em tecidos específicos, adiposo (dieta rica em gordura), no músculo (dieta normal) e em macrófagos, levou ao desenvolvimento de resistência à insulina e também à intolerância à glicose sistémica para este último tipo de células. O mesmo não se verificou para os *knockout* específicos nos hepatócitos e nas células β pancreáticas, verificando-se nestas situações apenas alterações ligeiras, em todo o organismo, no metabolismo da glicose (Sugii & Evans, 2011).

Estes estudos sugerem então que, quer o tecido adiposo, quer os restantes tecidos, contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina. Todavia, os respetivos mecanismos moleculares ainda não são bem explícitos e também ainda não se compreende totalmente a ação sensibilizadora de insulina que as TZD detêm (Sugii & Evans, 2011).

Segundo o estudo de Sugii (2009), com a ativação do PPAR γ especificamente nos adipócitos, verificou-se que há uma melhoria dos perfis lipídicos e das adipocinas, baixando os níveis de insulina no soro e suprimindo a indução de citocinas pelos macrófagos. Demonstra-se então que esta ativação é suficiente para melhorar a resistência à insulina em todo o organismo, obtendo-se um resultado semelhante ao da utilização de uma TZD como tratamento.

Perante estes resultados os autores propõem então um modelo “adipocentrico”, em que há a ativação do PPAR γ , especificamente no tecido adiposo, o que explica o efeito das TZD como sensibilizador à insulina na terapia da DMT2. Os resultados obtidos em ratos obesos Zucker, num estudo também de Sugii para o composto AG035029 (agonista do PPAR γ não-TZD), vão de encontro a este modelo proposto, já que este composto exhibe maior seletividade para o tecido adiposo e apresenta melhores resultados nos efeitos de sensibilização à insulina que os fármacos já testados, incluindo as TZD.

As TZD têm vários efeitos adversos associados e já referidos anteriormente, que se devem possivelmente à ativação deste recetor em tecidos não-adiposos, como osteoclastos e cardiomiócitos (Sugii & Evans, 2011).

O desenvolvimento de moduladores do PPAR γ que sejam específicos para o tecido adiposo, poderá permitir uma terapia para a DMT2 com a máxima eficácia obtida para os agonistas totais do PPAR γ e um menor risco para os efeitos adversos associados a estes (Sugii & Evans, 2011).

5.3.4. Agonistas Totais e Parciais

Existem agonistas totais e parciais. Os agonistas totais, como as TZD, conseguem recrutar completamente todos os coativadores após a ligação ao recetor. Os agonistas parciais não têm esta capacidade, conseguindo recrutar apenas um grupo determinado de coativadores e são também capazes de antagonizar alguns efeitos do PPAR γ (Guo & Tabrizchi, 2006).

Apesar disso, é relativo o impacto de um composto na ação do PPAR γ como agonista parcial ou total. Por exemplo, algumas TZD (MCC-555, troglitazona) atuam como agonistas parciais em certos tecidos, como o músculo e o rim, quando os coativadores não estão todos disponíveis, e atuam como agonistas totais em adipócitos, quando um perfil completo de coativadores está presente. A ação de agonista total ou parcial está dependente do tipo de célula ou do sítio de ligação ao DNA (Guo & Tabrizchi, 2006).

Impõe-se assim a necessidade de, através do desenvolvimento apropriado de ligandos seletivos, chamados moduladores seletivos do PPAR γ , estimular as ações fisiológicas benéficas da ativação do PPAR γ , evitando a manifestação das ações indesejáveis também associadas à sua ativação (Guo & Tabrizchi, 2006).

5.3.5. Futuros fármacos

Uma vez que a ativação do PPAR γ tem efeitos benéficos na resistência à insulina, para além das TZD outros agonistas do PPAR γ não-TZD têm sido desenvolvidos no sentido de serem utilizados na terapia da diabetes. Estes agonistas não têm uma estrutura semelhante às TZD, porém, em modelos animais diabéticos, detêm efeitos antidiabéticos iguais ou melhores que os das TZD (Guo & Tabrizchi, 2006).

Apesar do PPAR γ ser até agora, o único RN que é alvo terapêutico na terapia da diabetes, este recetor continua a ser muito estudado, devido aos efeitos adversos associados à classe de fármacos que nele atuam. Esses estudos têm como objetivo perceber todo o mecanismo molecular em torno das vias em que o PPAR γ interfere, com o fim de desenvolver futuros fármacos cada vez mais eficazes no tratamento da resistência à insulina e mais seguros, sem os efeitos adversos associados à classe das TZD.

5.3.5.1. Agonistas duplos PPAR α/γ e pan-Agonistas

Atualmente são utilizados fármacos que ativam de forma seletiva o PPAR α (fibratos) e o PPAR γ (TZD) para o tratamento da dislipidemia e da DMT2, respetivamente.

A semelhança do LBP dos recetores PPAR α e PPAR γ , foi um dos fatores que incentivou o estudo de ligandos com a capacidade de se ligar e de ativar ambos os RN, os chamados agonistas duplos PPAR α/γ . Estes ligandos cumprem o objetivo de, com o mesmo composto, obter os efeitos de sensibilização à insulina do PPAR γ e os efeitos

antidislipidemicos do PPAR α . O muraglitazar, o tesaglitazar e o aleglitazar, são alguns dos agonistas duplos PPAR α/γ já estudados (Feldman *et al.*, 2008; Higgins & Depaoli, 2010).

Apesar desses estudos demonstrarem alguma relevância clínica na eficácia destes agonistas, o muraglitazar e o tesaglitazar não apresentaram uma melhoria de resultados quanto à segurança de utilização destes fármacos e aos seus efeitos adversos (Feldman *et al.*, 2008).

O aleglitazar, por seu lado, apresentou um bom equilíbrio entre a eficácia e o perfil de segurança na terapia de curta duração da DMT2 num estudo de fase II, o estudo SYNCHRONYA. Este trabalho teve como objetivo estabelecer os efeitos daquele agonista duplo PPAR α/γ na diminuição da glicose e na alteração do perfil lipídico, e estabelecer também o perfil de segurança como possível fármaco (Henry *et al.*, 2009).

O referido estudo, aleatório e duplamente cego, testou e comparou os efeitos do aleglitazar em doentes com DMT2, nas doses diárias de 50 μ g, 150 μ g, 300 μ g, ou 600 μ g, relativamente a um grupo placebo e à dose diária de 45mg de pioglitazona, durante 16 semanas. A eficácia do aleglitazar foi avaliada pela alteração da concentração de HbA1c ao longo do tratamento (Henry *et al.*, 2009).

Em relação ao placebo, o aleglitazar reduz, conforme a dose administrada, a HbA1c (Fig. 5.2). Manifestaram-se, também conforme a dose, alguns dos efeitos adversos associados às TZD, como edema e aumento de peso. Todavia, para doses de aleglitazar inferiores a 300 μ g, nenhum dos doentes manifestou insuficiência cardíaca, a frequência de ocorrência de edema foi semelhante à do placebo e inferior à da pioglitazona e o aumento de peso foi inferior à observada também para a pioglitazona. Neste trabalho verificou-se que este fármaco é capaz de proporcionar alterações significativas no perfil lipídico, nomeadamente na redução do colesterol LDL e dos TG e aumento do colesterol HDL (Henry *et al.*, 2009).

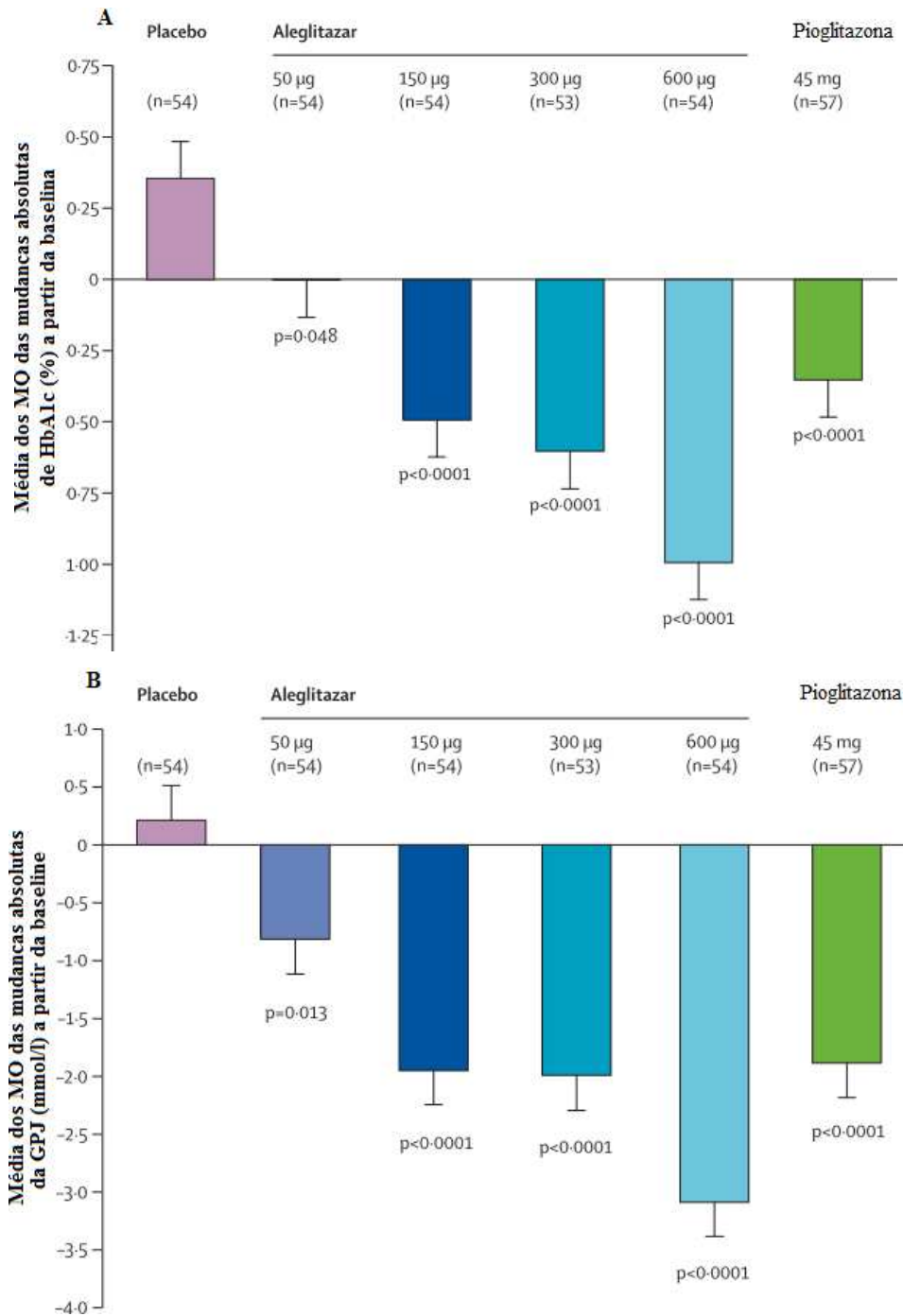


Fig. 5.2 - A: Efeito dos fármacos e respectivas doses na concentração de HbA1c; B: Efeito na glicose plasmática em jejum (GPJ). Variação absoluta desde o início até o fim do período de tratamento (semana 16), com valor de p relativo ao placebo, MQ (mínimos quadrados). Figura adaptada de Henry *et al.*, 2009.

De acordo com os autores do referido estudo (SYNCHRONYA), há um bom equilíbrio entre a eficácia e o perfil de segurança na terapia de curta duração da DMT2 com aleglitazar. Contudo, o SYNCHRONYA não pode chegar a conclusões clínicas quanto à utilização de longa duração deste fármaco. Os autores porém estão

convencidos de que os resultados clínicos obtidos são favoráveis e encorajadores para o desenvolvimento de um estudo de fase III (Henry *et al.*, 2009).

Efetivamente, desde 2010 está a ser desenvolvido um estudo de fase III, ALECARDIO, pela companhia farmacêutica Roche. Este estudo pretende testar a dose de 150µg de aleglitazar durante pelo menos dois anos e meio e compará-la com um placebo. Está a ser aplicado a doentes com DMT2 que apresentaram síndromes coronárias agudas recentemente, e tem como objetivo avaliar, para além do perfil de segurança e a eficácia associada ao tratamento de longa duração, o potencial deste fármaco na redução do risco cardiovascular.

O estudo dos agonistas duplos PPAR α/γ levou ao desenvolvimento de pan-agonistas, ligandos capazes de se ligar a todos os PPAR e de ativá-los simultaneamente. Estes agonistas ainda estão numa fase de desenvolvimento pré-clínica, contudo os estudos já realizados têm demonstrado uma boa eficácia em modelos animais com doenças metabólicas, impondo-se a avaliação do seu perfil de segurança (Cho & Momose, 2008; Feldman *et al.*, 2008; Higgins & Depaoli, 2010; Lalloyer & Staels, 2010).

5.3.5.2. SPPAR γ M

As vias de transdução de sinal do PPAR γ e as suas interações moleculares são bastante complexas e permitem o desenvolvimento de moléculas que sejam seletivas para a ação insulino-sensibilizante da ativação do PPAR γ e que não tenham os efeitos indesejáveis associados à ativação total deste recetor. Vários ligandos naturais e sintéticos têm confirmado que realmente isso é possível. Essas moléculas são chamadas moduladores seletivos do PPAR γ (SPPAR γ M) (Higgins & DePaoli, 2010).

Os SPPAR γ M poderão assim, vir a formar uma nova classe de fármacos antidiabéticos, sensibilizadores de insulina cujo alvo terapêutico será o PPAR γ . Vários estudos já têm desenvolvido novos SPPAR γ M, têm estudado os seus efeitos farmacológicos e a sua farmacocinética (Guo & Tabrizchi, 2006).

A interação do SPPAR γ M com PPAR γ difere mecanicamente da interação dos agonistas totais, donde resultam também alterações distintas de conformação no recetor, conduzindo ao recrutamento de cofatores alternativos que desencadeiam, desse modo, respostas celulares distintas (Fig. 5.3).

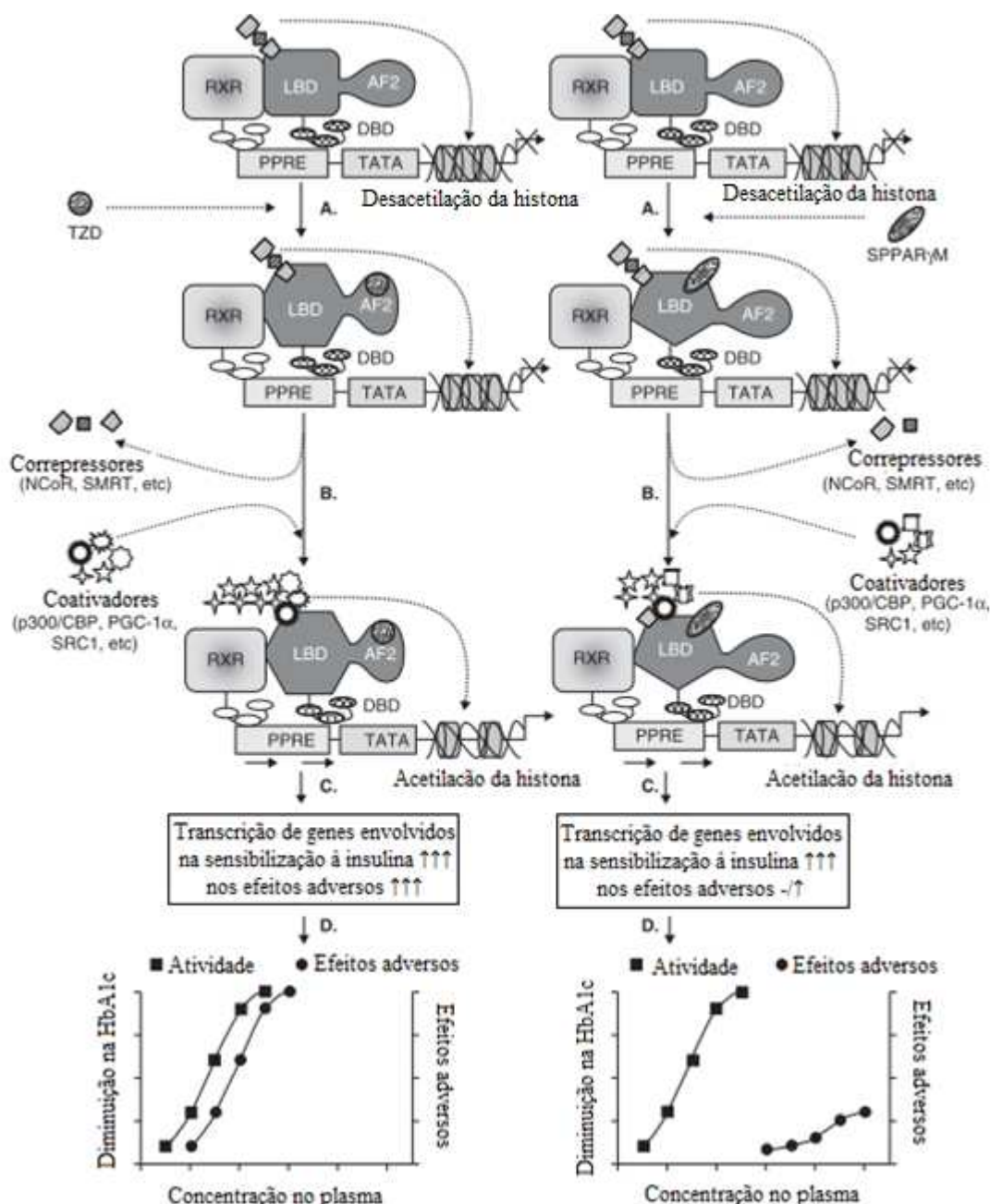


Fig. 5.3 - Modelo hipotético do mecanismo de ação dos SPPAR γ M. No estado não ligado o PPAR γ está ligado ao PPRE do gene alvo na forma de heterodímero com o RXR, ao qual está associado um complexo co-repressor com atividade de histona desacetilase que desacetila a histona e inibe a transcrição do gene. **A:** A TZD liga-se ao recetor através da hélice AF-2 que leva a uma alteração na conformação do recetor e na estabilização para o recrutamento de coativadores; enquanto que o SPPAR γ M se liga ao recetor através de epítomos diferentes, resultando na alteração conformacional do recetor com uma estabilização diminuída para o recrutamento de coativadores. **B:** A alteração conformacional pela TZD leva à dissociação do complexo co-repressor e ao recrutamento do complexo coativador. A alteração conformacional pelo SPPAR γ M leva à dissociação do complexo co-repressor e recruta seletivamente o complexo coativador. **C:** A ativação do PPAR γ pela TZD leva à transcrição de genes envolvidos na sensibilização à insulina e nos efeitos adversos, enquanto que a ativação do PPAR γ pelo SPPAR γ M leva à transcrição de genes envolvidos na sensibilização à insulina e não há, ou há pouca, transcrição de genes associados aos efeitos adversos. **D:** Gráfico que mostra a atividade/efeitos adversos *versus* a concentração de TZD e SPPAR γ M. Figura adaptada de Doshi *et al.*, 2010.

Os SPPAR γ M parecem promover a ativação do PPAR γ através da estabilização de uma região alternativa deste RN, envolvendo as regiões folhas β e hélice 3. Pensa-se que daqui resulta o recrutamento limitado de coativadores que sustentam os efeitos favoráveis dos SPPAR γ M (Doshi *et al.*, 2010). Para conseguir perceber as interações ideais que são exigidas a um SPPAR γ M ideal, será necessário compreender melhor os efeitos dos diferentes SPPAR γ M nas interações com os correguladores (Whitehead, 2011).

Conceito de Agonista total *versus* Agonista parcial *versus* SPPAR γ M

A resposta à ativação do PPAR γ é determinada pelas alterações conformacionais induzidas pelo ligando, quando este interage com múltiplos pontos de interação do LBD do recetor. É este mecanismo molecular que permite a modulação seletiva deste recetor (Higgins & DePaoli, 2010).

O estado conformacional do PPAR γ é primordial para a sua atividade, pois é este que determina a afinidade que o recetor tem para coativadores ou correpressores. Determinam-se assim padrões de transcrição diferentes, para diferentes ligandos, sendo o padrão de transcrição também determinado pelos tipos de correguladores disponíveis em cada célula (Higgins & DePaoli, 2010).

Um SPPAR γ M deve possuir a capacidade de se ligar ao PPAR γ com uma alta afinidade e seletividade e promover apenas o efeito de sensibilização à insulina, característico dos agonistas totais, mas sem acionar ou minimizando os efeitos adversos destes (Higgins & DePaoli, 2010).

Têm sido identificados alguns SPPAR γ M, tanto endógenos como sintéticos, que se encontram em fase de estudo e alguns deles a ser testados clinicamente, para aplicação como futuros fármacos (Higgins & DePaoli, 2010).

Num agonista total, a atividade associada à ativação do RN parece estar relacionada com a concentração do agonista. Agonistas parciais, são fracos ativadores do PPAR γ , apresentam o mesmo padrão de ativação e a sua ação depende da dose utilizada. A sua atividade máxima é menor comparada com a dos agonistas totais. Os SPPAR γ M são diferentes dos agonistas descritos, pois a relação dose-resposta é diferente para as suas diferentes atuações, por isso os efeitos desejáveis e indesejáveis podem ser isolados (Higgins & DePaoli, 2010).

Farmacologicamente e comparando com um agonista total, um SPPAR γ M é um ligando que induz os efeitos específicos pretendidos quando se liga ao recetor. A

especificidade desses efeitos pode obter-se pela variação da dose-resposta de maneira que o ligando seja o indutor mais potente para determinadas atividades (as benéficas), mas não o seja para outras (as prejudiciais), ou ainda, através da diferença entre a resposta máxima das diferentes atividades, de modo que o ligando seja o indutor mais eficaz de determinadas atividades e não de outras.

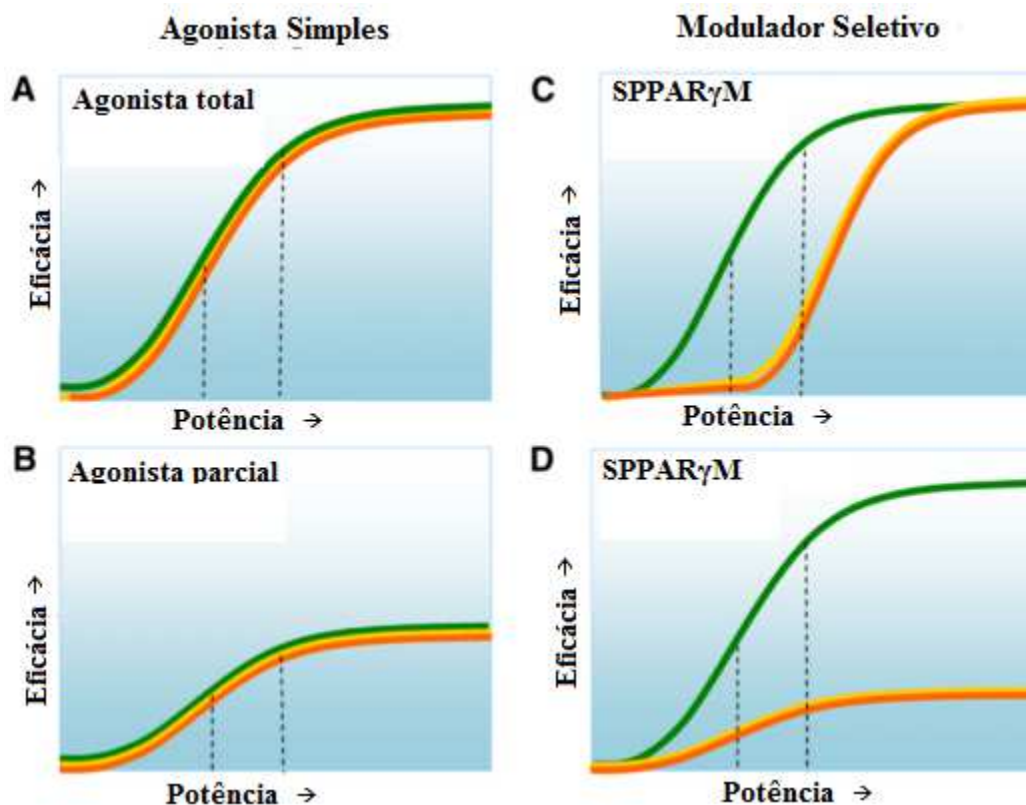


Fig. 5.4 - Curvas dose-resposta da ativação do PPAR γ por diferentes tipos de agonistas, relacionadas com a eficácia e a potência. As diferentes atividades estão sinalizadas por curvas de diferentes cores (verde, amarelo e laranja) **A:** Para o agonista total a relação dose-resposta está interligada para as diferentes atividades, de tal modo que para a mesma dose se obtém uma resposta semelhante para as diferentes atividades. **B:** Para o agonista parcial a relação dose-resposta está interligada para as diferentes atividades, de tal modo que para a mesma dose se obtém uma resposta semelhante para as diferentes atividades. No entanto observa-se uma menor eficácia de resposta relativamente à mesma dose para o agonista total. **C e D:** O SPPAR γ M difere dos agonistas simples por não ter as diferentes atividades relacionadas umas com as outras, apresentando, cada uma delas, uma curva dose-resposta diferente. **C:** O SPPAR γ M pode ter uma diferente potência para a ativação das diferentes atividades. **D:** O SPPAR γ M pode ter uma diferente eficácia para a ativação das diferentes atividades. Figura adaptada de Higgins & DePaoli, 2010.

Exemplo de SPPAR γ M: INT131

O INT131 é um potente SPPAR γ M, não-TZD, criado para melhorar a sensibilidade à insulina e o metabolismo da glicose, mas que não apresenta os efeitos adversos dos agonistas totais TZD. Os estudos em modelos animais de diabetes

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

mostraram-se de tal forma favoráveis que este SPPAR γ M já foi testado clinicamente em seres humanos (Higgins & DePaoli, 2010).

O estudo aleatório e duplamente cego, de Dunn e dos seus colaboradores (2011), determinou a eficácia e segurança do INT131 besilato num curto período de tempo, em doentes com DMT2. Neste estudo foi administrado diariamente, durante quatro semanas, 1 ou 10mg de INT131 besilato e um medicamento placebo que serviu de controlo, a pessoas com DMT2 mas que não faziam qualquer terapêutica farmacológica (Fig. 5.5) (Dunn *et al.*, 2011).

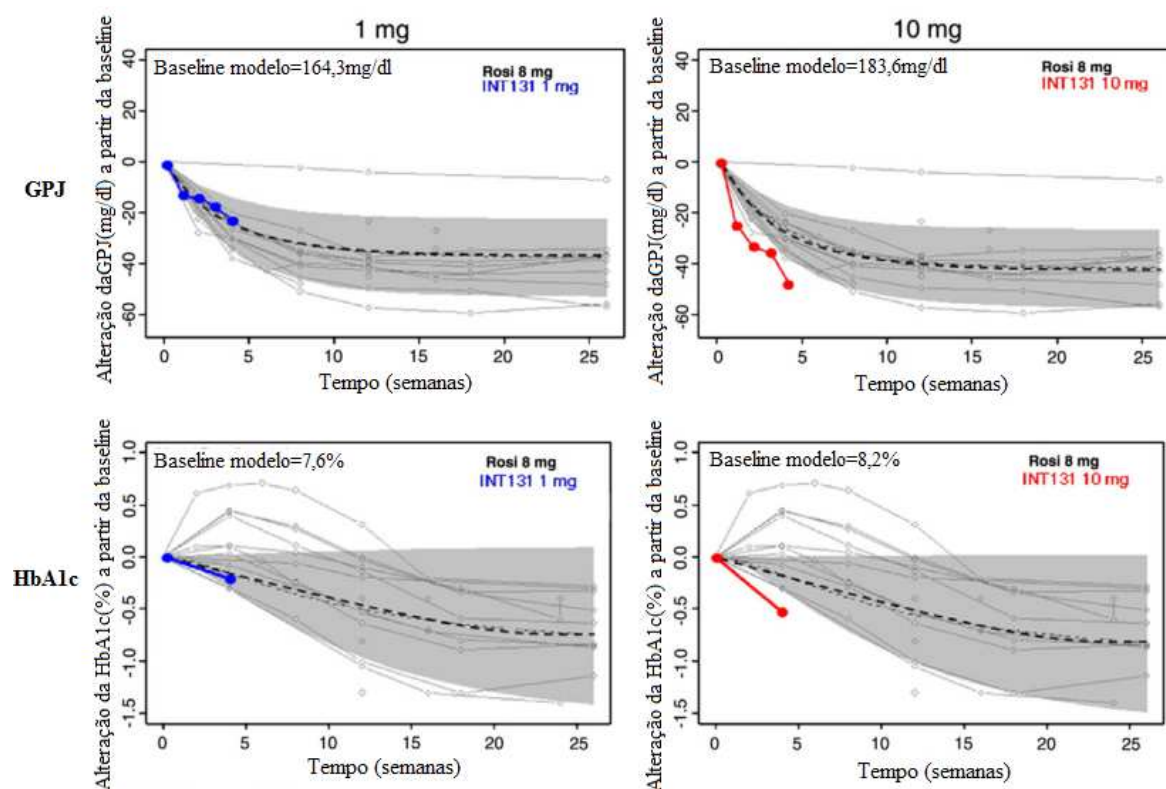


Fig. 5.5 - Comparação de dados modulados para a rosiglitazona (dose 8mg) e de dados de INT131 besilato (doses 1mg e 10mg) na alteração da *baseline* da glicose plasmática em jejum (GPJ) e da HbA1c. A área cinzenta representa a resposta da rosiglitazona na respetiva dose, num intervalo de confiança de 95% de dados recolhidos de 12 estudos, o tracejado forte corresponde à média dessas respostas. Figura adaptada de Dunn *et al.*, 2011.

A utilização do INT131 besilato demonstrou, dependendo da dose, uma redução da glicose plasmática em jejum, onde uma dose de 1mg deste composto provocava uma redução da glicose plasmática em jejum comparável com a dose de 8mg de rosiglitazona, não se observando os efeitos adversos, designadamente edema, retenção de fluidos e aumento de peso, associados a este fármaco. Estes resultados vão de encontro aos objetivos pretendidos para um SPPAR γ M, pois obteve-se uma boa

tolerância e uma melhoria significativa da glicemia e da sensibilidade à insulina (Dunn *et al.*, 2011).

Este composto está atualmente a ser testado num estudo de 24 semanas duplamente cego e com placebo como comparador ativo (o Actos[®]), que utiliza 4 doses (0.5, 1, 2 e 3 mg por dia) em doentes com DMT2, com uma glicemia pouco controlada por sulfonilureia ou sulfonilureia/metformina (Higgins & DePaoli, 2010).

5.3.5.3. Outras abordagens

Existem alguns moduladores epigenéticos que influenciam a ação do PPAR γ e os seus mecanismos de sinalização, mas só recentemente começaram a ser estudados. Alguns autores propõem como alternativa à utilização de moduladores seletivos do PPAR γ , a utilização de uma terapia com TZD concomitantemente com moduladores epigenéticos, como por exemplo inibidores de HDAC, específicos e efetivos na ativação epigenética de promotores de genes adipogénicos. A identificação de outras moléculas intervenientes na via de transcrição do PPAR γ , pode permitir a compreensão desta via e assim possibilitar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas nas doenças metabólicas, como a DMT2 (Sugii & Evans, 2011).

6. FXR (Recetor X de farnesóides)

O recetor X farnesóides é um recetor nuclear membro da subfamília *Thyroid Hormone Recetor-like* e do grupo *Liver X Receptor-like* (subfamília de recetores nucleares 1, do grupo H, membro 4). É conhecido por FXR ou NR1H4 e é codificado no Homem pelo gene *NR1H4* (Teodoro *et al.*, 2011).

Existem dois genes que codificam este recetor, o *FXRA* e o *FXRB*, mas apenas o primeiro é ativo no Homem e nos primatas, e o segundo é um pseudogene. No Homem, o FXR α é expresso a partir de um *locus* (cromossoma 12q23.1) e origina quatro isoformas distintas com atividades de transativação diferentes (Modica *et al.*, 2010; Teodoro *et al.*, 2011).

Estas isoformas formam-se devido à existência de diferentes promotores e ao processo de *splicing* alternativo do RNA. Como a maior parte dos genes regulados pelo FXR α não estão dependentes da isoforma, estas não diferem nos genes que regulam.

Apesar disso, verifica-se que alguns genes alvos respondem melhor a isoformas diferentes, porém a relevância fisiológica dessas diferenças não se encontra, até ao momento, elucidada (Teodoro *et al.*, 2011).

Tendo em atenção o que atrás foi referido e pretendendo facilitar a leitura, ao longo desta monografia, o termo FXR será utilizado sempre que se queira referir o FXR α e as suas isoformas no geral.

O FXR é expresso sobretudo no fígado, no intestino, nos rins e na glândula supra-renal, apresentando uma menor expressão no tecido adiposo e no coração.

Na célula, depois de ser ativado por um ligando, o FXR liga-se ao DNA nos elementos de resposta específicos do FXR (FXRE) em forma de monómero ou heterodímero, com o RXR, ativando ou reprimindo a transcrição de determinados genes alvo (Claudel *et al.*, 2005; Teodoro *et al.*, 2011). Os ácidos biliares são um exemplo de ligandos do FXR, por isso este recetor nuclear é também conhecido como um recetor de ácidos biliares (Teodoro *et al.*, 2011).

O FXR tem várias funções e está envolvido na regulação de várias vias relacionadas com o metabolismo energético. A sua ativação altera a transcrição de genes em vários tecidos responsáveis principalmente pelo metabolismo dos ácidos biliares, dos lípidos e também da glicose (Teodoro *et al.*, 2011).

6.1. O FXR e a sua influência na homeostasia da glicose

O fígado, órgão onde é principalmente expresso o FXR, desempenha um papel central na homeostasia da glicose em circulação. Este é o órgão principal onde ocorre a neoglicogénese (conjunto de processos bioquímicos pelos quais o organismo forma glicose a partir de substâncias não glicídicas como aminoácidos, lactato, piruvato) e glicogénese (formação de glicogénio a partir da glicose), mantendo assim, o equilíbrio entre a produção e a utilização de glicose.

Após o surgimento inicial de algumas evidências de que os ácidos biliares, e consequentemente o FXR, estavam ligados ao metabolismo da glicose, vários estudos se debruçaram sobre este tema. Sendo assim nos últimos anos foram vários os estudos publicados que mostraram a influência e os efeitos do FXR na neoglicogénese, na síntese de glicogénio e na sensibilidade à insulina, evidenciando assim, o papel fisiológico do FXR no metabolismo da glicose e consequentemente no desenvolvimento

de possíveis fármacos que tenham o FXR como possível alvo terapêutico (Modica *et al.*, 2010; Teodoro *et al.*, 2011).

6.1.1. Influência do FXR na neoglicogénese

Como foi referido anteriormente, alguns investigadores têm vindo a demonstrar que o FXR influencia a homeostasia da glicose, através de mecanismos que envolvem a neoglicogénese e da glicogénese.

Segundo Cariou *et al.* (2006), Ma *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2006), a ativação de FXR pode reduzir a neoglicogénese hepática e induzir a síntese de glicogénio. Estes estudos mostram que no fígado de modelos de ratinhos diabéticos, a ativação do FXR leva à repressão da expressão de enzimas essenciais à neoglicogénese (Fig. 6.1): fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), Glicose-6-fosfatase (GP6ase) e Frutose-1,6-bifosfatase (FBP1) (Cariou *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006; Modica *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006).

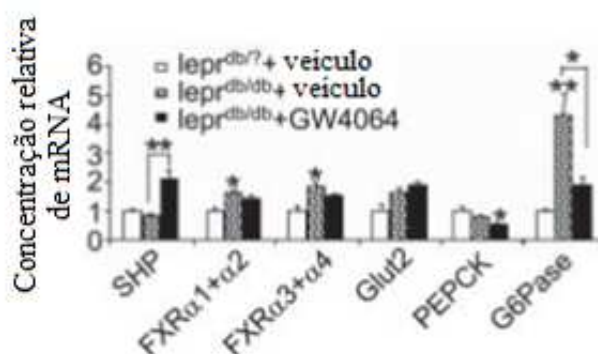


Fig. 6.1 – Tratamento de ratinho db/db com GW4064. Determinação dos níveis de mRNA, por PCR em tempo real, de SHP, Glut2, PEPCK, G6Pase. *- $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus ratinhos lepr^{db}/+ ou noutra situação específica indicada na figura. Figura de Zhang *et al.*, 2006.

Estes resultados são explicados molecularmente, pelo efeito repressivo do *Small heterodimer partner* (SHP) (induzido pelo FXR) que vai interferir a nível transcripcional com os fatores de transcrição e os coativadores: fator nuclear 4 α do hepatócito (HNF4 α), recetor glucocorticoide (GR), *forkhead box protein O1* (FOXO1) e coativador 1- α do recetor ativado por proliferadores de peroxissomas gamma (PGC1 α). Uma vez que estes fatores de transcrição e coativadores cooperam de modo a aumentar a expressão destas enzimas, no estado de jejum, quando o SHP interfere com estes fatores de transcrição e coativadores, a expressão destas três enzimas fica comprometida

(Modica *et al.*, 2010). Esta teoria é sustentada pelos estudos de Ma *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2006), que demonstram que a ativação de FXR por ácido cólico e GW4064, respetivamente, induz a expressão de SHP, que por sua vez interrompe a interação do coativador PGC1 α com os fatores de transcrição GR, HNF4 α e FOXO1 (Fig. 6.2) (Yamagata *et al.*, 2004), provocando uma diminuição final da neoglicogénese em modelos de ratinhos diabéticos db/db e KK-A (y), mas não em ratinhos FXR^{-/-} (Modica *et al.*, 2010).

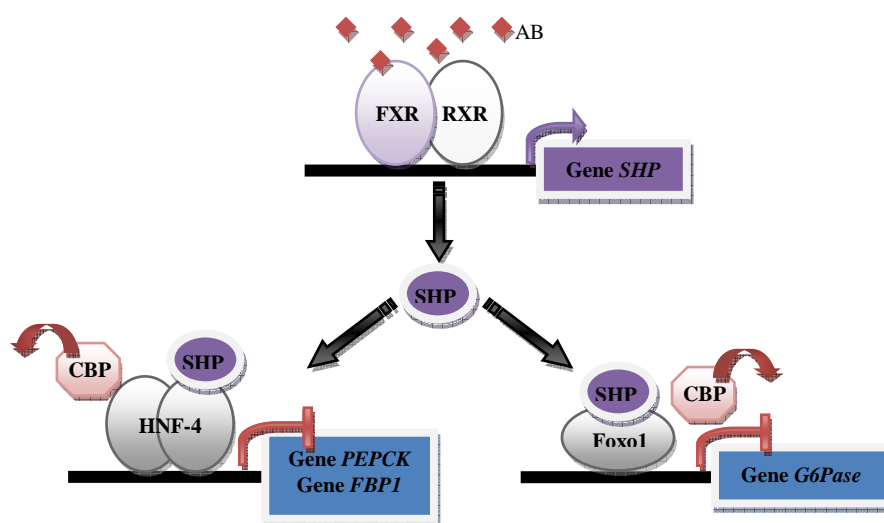


Fig. 6.2 – Modelo ilustrativo da influência, na expressão de genes, da ativação do FXR pelo agonista (ácidos biliares – AB), através da mediação do SHP na dissociação do HNF-4 ou do Foxo1 com o CBP. Figura adaptada de Yamagata *et al.*, 2004.

No entanto, para apoiar a teoria de que a ativação do FXR pelos ácidos biliares levam à redução da neoglicogénese, demonstrou-se que a sobreexpressão de SHP reduz a expressão de genes relacionados com a neoglicogénese (Yamagata *et al.*, 2004).

Estudos com ratinhos *wild type* (*wt*) e com ativação do FXR com agonistas, não mostram consenso, uma vez que nos estudos de Stayrook *et al.* (2005) e Zhang *et al.* (2006) se verificou uma estimulação da PEPCK (Fig. 6.3), mas nos de Ma *et al.* (2006) e Yamagata *et al.* (2004) verificou-se uma repressão (Fig. 6.4).

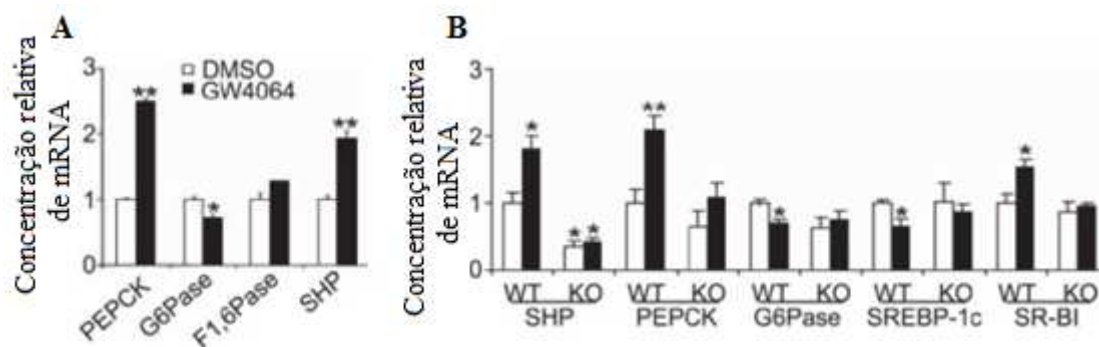


Fig. 6.3 – A: Tratamento dos hepatócitos primários de ratinhos com o veículo DMSO (grupo controle) ou com GW4064 (1 μ M) durante 24h. Os níveis de mRNA de PEPCK, G6Pase, F1,6Pase (FBP1) e SHP foram quantificados por PCR em tempo real e normalizados para a ciclofilina. **B:** Tratamento dos Ratinhos *wt* e *FXR*^{-/-} (KO) com veículo (barras brancas) ou com GW4064 (barras pretas) durante 11 dias (n = 6 por grupo). Após 6h de jejum os fígados foram removidos e os níveis de mRNA hepático foram quantificados por PCR em tempo real. *-*p*<0,05,** *p*<0,01 versus controle (A) ou ratinhos *wt* tratados com veículo (B). Figura adaptada de Zhang *et al.*, 2006.

In vitro a ativação do FXR com GW4064 provocou a indução ao invés da repressão da enzima PEPCK (Fig. 6.4), e em ratos depois de alimentados obteve-se o mesmo resultado (Modica *et al.*, 2010).

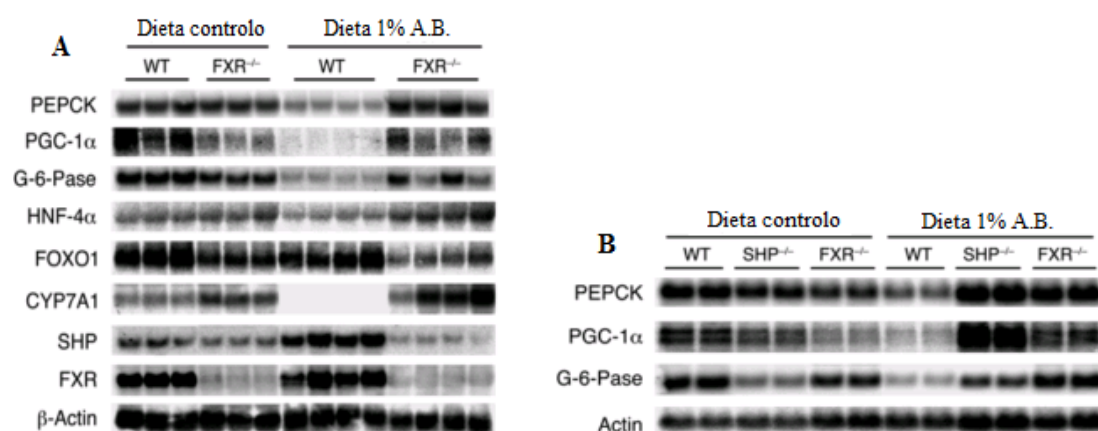


Fig. 6.4 - A: Supressão de genes envolvidos na neoglicogênese (PEPCK e G6Pase) pelos ácidos biliares (AB) foi observada para ratinhos *wt* mas não para ratinhos *FXR*^{-/-}. **B:** O SHP é necessário para suprimir a expressão de genes da neoglicogênese em resposta aos ácidos biliares (AB). (ratinhos alimentados com uma dieta com ácidos biliares a 1% durante 5 dias, RNA quantificado para n = 3-4 ratinhos por grupo após um jejum noturno) *-*p*<0,05,** *p*<0,01 versus ratinhos *wt*. Figura adaptada de Ma *et al.*, 2006.

Outro estudo demonstrou mais uma propriedade interessante do FXR na regulação do metabolismo da glicose. Esse estudo demonstrou que o FXR tem um papel importante na regulação do metabolismo da glicose no estado de transição de jejum para o estado pós-alimentação (Duran-Sandola *et al.*, 2005) e ainda, que o FXR é responsável pela redução da taxa de glicólise, conforme o estado nutricional, o que

confirma mais uma vez a função do FXR como um regulador metabólico importante (Teodoro *et al.*, 2011).

Apesar de não estar esclarecida a razão das divergências dos referidos estudos, elas podem dever-se ao facto da regulação do FXR ser diferente no estado de jejum ou no estado alimentado, ou podem estar relacionadas com o facto de se utilizar diferentes modelos animais, pelo que deverão ser feitos mais estudos para clarificar a função do FXR no metabolismo da glicose (Modica *et al.*, 2010).

Além disso, segundo Teodoro *et al.* (2011), o estado nutricional e a duração do tratamento com um agonista de FXR podem ser relevantes para as contradições dos referidos estudos. Este autor levanta a hipótese de a ativação do FXR por agonistas poder causar, numa primeira fase, alterações na expressão genética para normalizar o metabolismo da energia em situações de superabundância, e, numa segunda fase, após esta normalização, a atividade FXR poder então reduzir os níveis de energia e, finalmente, obrigar o organismo a compensar através da produção aumentada de glicose.

6.1.2. Influência do FXR na glicogénese

O FXR poderá ter alguma influência no armazenamento da glicose sob forma de glicogénio (glicogénese), uma vez que ratinhos diabéticos db/db apresentam um aumento da síntese de glicogénio, quando tratados com GW4064 (Fig. 6.5, gráficos A e B) (Zhang *et al.*, 2006). Estes ratinhos apresentam também um aumento de GSK3 β fosforilado (inativa), enzima responsável por fosforilar e conseqüentemente inativar a glicogénio sintetase (enzima determinante na glicogénese), e de Akt fosforilado (ativa). Este estudo sugere que o FXR induz a síntese de glicogénio através do aumento da fosforilação da GSK3 β pelo Akt (via de sinalização da insulina ao nível do Akt), como acontece na via de IRS-Akt sinalizada pela insulina (Fig. 6.5, gráficos C e D). Resultados obtidos com ratinhos *FXR*^{-/-} vão ao encontro dos resultados anteriores, uma vez que estes exibem hiperglicemia (devido não só à diminuição da inibição da neoglicogénese como também da inibição acentuada da glicogénese) (Cariou *et al.*, 2005; Modica *et al.*, 2010).

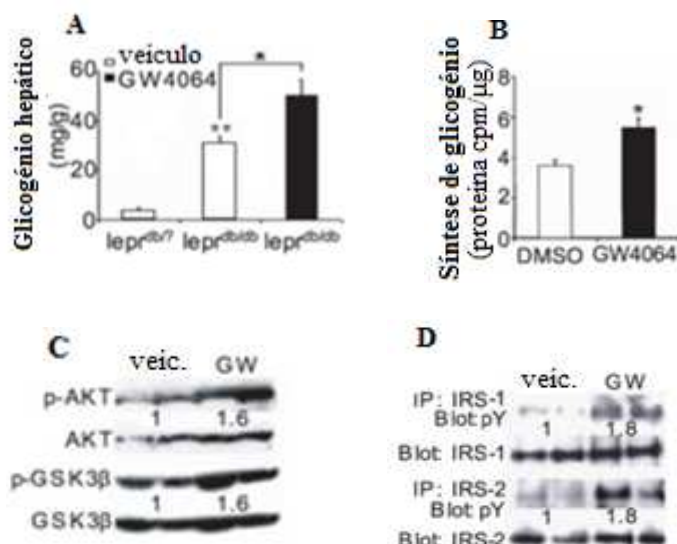


Fig. 6.5 – O tratamento com GW4064 em ratinhos db/db, aumenta a sinalização pela insulina e o armazenamento de glicogénio nos fígados. A: Níveis hepáticos de glicogénio determinados por um ensaio colorimétrico. **B:** Tratamento em triplicado dos hepatócitos primários de ratinhos com GW4064 ou DMSO (1μM) durante 24h, seguido por uma incubação em meios com ¹⁴C-D-glicose durante 2h, posteriormente a incorporação de ¹⁴C-glicose em glicogénio foi quantificada. **C:** Determinação dos níveis de fosforilação da Akt e GSK3β hepáticas em ratinhos db/db. **D:** Determinação dos níveis de fosfotirosina (pY) do IRS-1 ou IRS-2 hepáticos em ratinhos db/db. *-*p*<0,05,** *p*<0,01. Figura adaptada de Zhang *et al.*, 2006.

6.1.3. Influência do FXR na sensibilidade à insulina

A possibilidade de o FXR poder influenciar a homeostasia da glucose, ao nível da sensibilidade dos tecidos à insulina, tem também sido alvo de vários estudos.

O possível mecanismo que explica a ação sensibilizadora do FXR, tem como base os estudos de Ma *et al.* (2006), que demonstram que ratinhos *FXR*^{-/-} apresentaram elevados níveis de ácidos gordos livres e de triglicéridos e os estudos de Savage *et al.* (2007), que demonstram a existência do fenómeno de “lipotoxicidade” (causado pelos elevados níveis de ácidos gordos livres e triglicéridos no organismo) o que poderá diminuir a sensibilidade à insulina ao nível dos tecido periféricos. Estudo *in vivo*, com ratinhos *FXR*^{-/-}, vão de encontro a esta teoria uma vez que estes ratinhos exibem um fenótipo lipotrófico (Cariou *et al.*, 2006; Modica *et al.*, 2010; Rizzo *et al.*, 2006).

Os estudos em que se comparam ratinhos *wt* e *FXR*^{-/-}, (Cariou *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), mostram que estes últimos apresentam uma diminuição da sensibilidade à insulina e uma diminuição da tolerância à glucose (Fig. 6.6) (Modica *et al.*, 2010; Staels *et al.*, 2010).

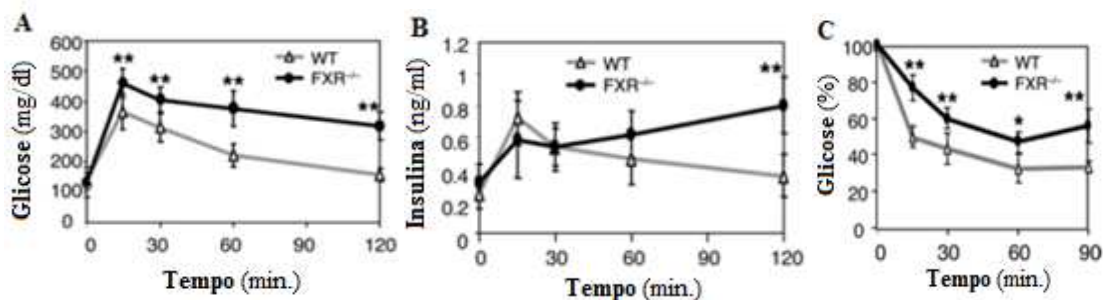


Fig. 6.6 - Diminuição da sensibilidade à insulina em ratinhos $FXR^{-/-}$ (com 8 semanas de idade e com $n = 8-10$ por grupo). **A:** Níveis de glicose após injeção intraperitoneal de 2 g/kg após jejum noturno, no teste de tolerância à glicose. **B:** Níveis de insulina após injeção intraperitoneal de 2 g/kg após jejum noturno, no teste de tolerância à glicose. **C:** Níveis de glicose após injeção intraperitoneal no teste de tolerância à insulina no estado de alimentado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ versus com ratinhos *wt type*. Figura de Ma *et al.*, 2006.

Por outro lado, em ratinhos, a ativação do FXR por agonistas (endógeno - ácido cólico, sintético - GW4064), ou através da infecção com adenovírus que expressa a forma constitutiva ativa do FXR (VP16-FXR), demonstrou uma redução acentuada dos níveis de glicose em circulação e uma melhoria da sensibilidade à insulina (Fig. 6.7) (Cariou *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006; Modica *et al.*, 2010; Staels *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006).

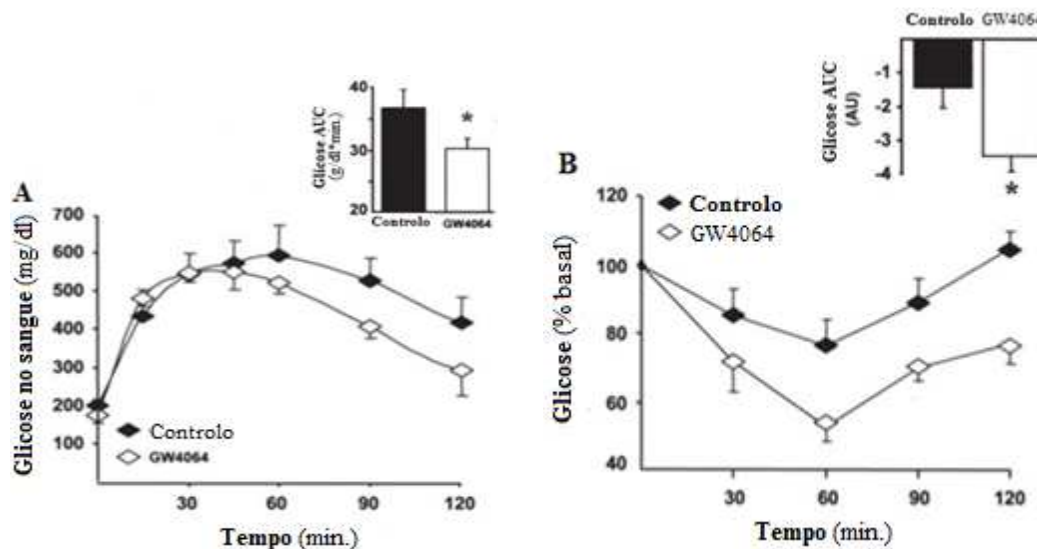


Fig. 6.7 - A ativação do FXR pelo GW4064 em ratinhos *ob/ob in vivo*, melhora a sensibilidade à insulina. Os ratinhos *ob/ob* eram machos com 20 semanas e foi dado acesso livre a comida e água. A um grupo foi administrado GW4064 (30 mg/kg) através de uma injeção intraperitoneal e ao grupo controle foi administrado o veículo (óleo de milho), durante 10 dias. **A:** Teste de tolerância à glicose, foi administrado 1,0 g/kg de glicose por via intraperitoneal após 6h de jejum. **B:** Teste de tolerância à insulina, foi administrada 2 IU/kg de insulina por via intraperitoneal após 6h de jejum. Os gráficos de barras inseridos nas imagens A e B representam a área integrada abaixo da curva. *, $p < 0,05$ versus controle ($n = 6$ ratinhos/grupo para **A**, e $n = 4$ ratinhos/grupo para **B**). Figura de Cariou *et al.*, 2006.

O mecanismo molecular por detrás desta ação sensibilizadora do FXR é provavelmente indireto, uma vez que o FXR não é expresso no músculo esquelético e apresenta níveis muito baixos no tecido adiposo.

Segundo Modica *et al.* (2010), a ativação do FXR leva à diminuição dos níveis dos triglicéridos e dos ácidos gordos livres, e assim diminui também o fenómeno de “lipotoxicidade” e restabelece-se a secreção de insulina bem como a sensibilidade dos tecidos periféricos para a insulina.

Pela observação em ratinhos *FXR*^{-/-} verificam-se dois fenómenos que estão implicados na ausência de FXR (talvez devido à diminuição da sua sensibilidade): uma diminuição da saída hepática da glicose, atenuada pela insulina, e uma diminuição da passagem da glicose para os tecidos periféricos. Estes dois fenómenos são provavelmente, a questão mais importante do desenvolvimento e manutenção da resistência à insulina e, conseqüentemente, da diabetes e confirma-se pelo facto de a expressão dos transportadores GLUT4 estar dependente do FXR. (Teodoro *et al.*, 2011).

6.2. Estudos clínicos sobre os efeitos das resinas ligadoras dos ácidos biliares (Colestiramina)

A nível clínico, já existem vários estudos com resinas, como a colestiramina, que demonstram a influência benéfica destas na homeostasia da glicose e conseqüentemente na DMT2 e síndromes de resistência à insulina.

Estas resinas são fármacos utilizados para reduzir os níveis de colesterol. Apresentam um grande peso molecular e são insolúveis na água, não são absorvidas no tubo digestivo e ligam-se aos ácidos biliares, impedindo que estes sejam absorvidos para a circulação e interrompendo assim a circulação entero-hepática. Este processo provoca um aumento da síntese de ácidos biliares (agonistas do FXR) a partir do colesterol (Guimarães *et al.*, 2006).

Os estudos referidos têm vindo a mostrar que as resinas têm um efeito benéfico no controlo da glicémia em doentes com DMT2. Estudos com colestiramina, em doentes diabéticos (DMT2) e com dislipidemia, para além de apresentarem uma diminuição dos níveis de colesterol LDL, apresentam também um controlo de glicemia, alguma redução na excreção de glicose pela urina e uma tendência para diminuir a concentração de HbA1c (Staels *et al.*, 2010).

Esta ação e modulação do controlo glicémico pelas resinas, pode ser explicada pelos mecanismos que envolvem a via dependente de FXR e que regula a expressão de PEPCK e outras enzimas envolvidas na neoglicogénese no fígado, como foi explicado em pontos anteriores. Estudos indicam também que o colesevelam (resina) pode atuar na homeostasia da glicose através da redução da resistência à insulina e/ou através de um aumento da eliminação de glicose plasmática (Staels *et al.*, 2010).

Os referidos resultados vão de encontro aos resultados anteriormente explicitados, obtidos *in vitro* e *in vivo*. Estes fármacos fazem aumentar a síntese de ácidos biliares dentro dos hepatócitos, a sua concentração e sendo agonistas do FXR também aumentam a sua ativação, levando a uma diminuição da glicemia, possivelmente através dos mecanismos explicados anteriormente, que intervêm na redução da neoglicogénese, na ativação de glicogénese e no melhoramento da sensibilidade dos tecidos à insulina.

7. LXR (Recetor X do fígado)

O recetor X do fígado (LXR – *Liver X Receptor*) é um recetor nuclear membro da subfamília *Thyroid Hormone Receptor-like* e do grupo *Liver X Receptor-like* (subfamília de recetores nucleares 1, do grupo H). Existem dois isotipos de LXR identificados, o LXR α (NR1H3) e o LXR β (NR1H2), codificados por dois genes diferentes (Oosterveer *et al.*, 2010; Pascual-García & Valledor, 2012; Schulman, 2010).

O LXR α é principalmente expresso no fígado e de forma menos extensa no tecido adiposo, no intestino e em macrófagos, entre outros. Já o LXR β é expresso de forma ubíqua. (Faulds *et al.*, 2010; Oosterveer *et al.*, 2010; Pascual-García & Valledor, 2012; Schulman, 2010).

Os LXR têm um papel importante no metabolismo. Quando ativados, por exemplo, pelos seus ligandos endógenos (oxiesteróis e os derivados do metabolismo do colesterol), estes RN formam, obrigatoriamente, um heterodímero com o RXR que se liga a uma sequência específica presente no gene alvo, chamada de elemento de resposta do LXR (LXRE). O LXRE é composto por dois conjuntos de hexanucleótidos separados por quatro nucleótidos (AGGTCA n nnnCGGTCA) (Faulds *et al.*, 2010; Oosterveer *et al.*, 2010; Schulman, 2010).

Após a ativação, o heterodímero LXR-RXR tem a capacidade de interagir e recrutar uma série de correguladores da transcrição, incluindo o PGC-1 β , RIP140, GPS2 e ASC-2, que estão também ligados a vários processos metabólicos (Faulds *et al.*, 2010; Oosterveer *et al.*, 2010). Os LXR têm assim, um papel relevante na regulação de genes envolvidos no metabolismo lipídico e glicídico e também de alguns genes associados à inflamação (Oosterveer *et al.*, 2010; Pascual-García & Valledor, 2012; Schulman, 2010).

O LXR é um sensor do metabolismo do colesterol e da biossíntese de lípidos, sendo principalmente estudado como alvo terapêutico da aterosclerose. Todavia, estes RN também regulam genes relacionados com a homeostasia dos glicídicos e alguns estudos têm mostrado que o LXR poderá vir a ser um alvo na terapia antidiabética (Oosterveer *et al.*, 2010).

7.1. LXR e a homeostasia da glicose

Alguns estudos realizados em células e em alguns modelos animais têm mostrado que ativação do LXR melhora o controlo glicémico (Fig. 7.1). Há indícios que a ativação do LXR pode influenciar a nível da neoglicogénese, na sensibilização à insulina e quiçá na secreção da insulina.

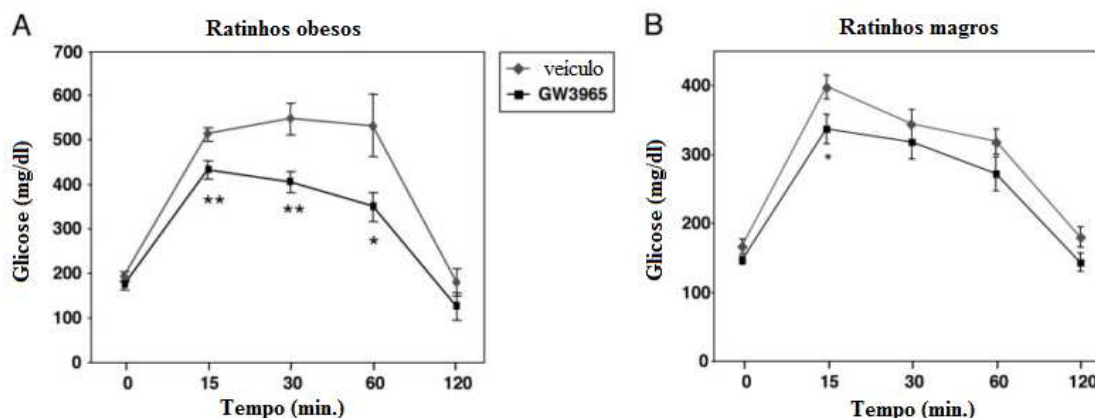


Fig. 7.1 – Efeito do GW3965 nos níveis de glicose em ratinhos obesos e com resistência à insulina (A) e em ratinhos magros (B). Os respetivos grupos de ratinhos foram tratados com GW3965 (agonista do LXR) ou com veículo (controlo) durante 1 semana, após esse período de tempo realizou-se um TTG. (*- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$). Figura adaptada de (Laffitte *et al.*, 2003).

7.1.1. Influência do LXR na neoglicogénese

Vários estudos em modelos animais, têm mostrado que a ativação do LXR no fígado reprime a expressão de genes que codificam enzimas da neoglicogénese, como a

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

PEPCK, a FBP1, a G6Pase e também o PGC-1 α que não é uma enzima, mas um coativador que influencia o processo de neoglicogénese, conforme descrito anteriormente (Fig. 7.2) (Baranowski, 2008; Oosterveer *et al.*, 2010; Schulman, 2010).

Alguns desses estudos foram efetuados em ratinhos com *knockout* de LXR α/β , em ratinhos *wt* e em ratinhos *db/db*. Quando tratados com agonistas do LXR os primeiros não mostraram uma redução da neoglicogénese, porém essa redução foi visível nos outros dois tipos de ratinhos (Faulds *et al.*, 2010).

In vitro, em experiências em hepatócitos de ratinhos e de humanos, a ação da ativação deste RN, inibição de genes que codificam enzimas da neoglicogénese, parece depender dos dois tipos de LXR, contudo *in vivo*, estudos verificaram que a repressão da expressão de PEPCK e G6Pase depende da presença de LXR α e não do LXR β (Fig. 7.2). A repressão destas duas enzimas, pela ativação do LXR, não parece ser direta mas sim através do efeito que este recetor tem sobre outras proteínas. Alguns estudos indiciam que uma dessas proteínas pode ser o PGC-1 α , pois é um regulador chave da produção de glicose a nível hepático e verificou-se que, em hepatócitos de roedores, após a ativação do LXR o nível do seu mRNA diminui. O factor de transcrição SREBP-1c é outra proteína candidata, porque, para além da sua expressão estar aumentada com a ativação do LXR, a sua sobreexpressão demonstrou reduzir a expressão da PEPCK verificando-se assim, que o SREBP-1c pode ser um mediador da inibição da expressão desta proteína pela ativação do LXR (Baranowski, 2008).

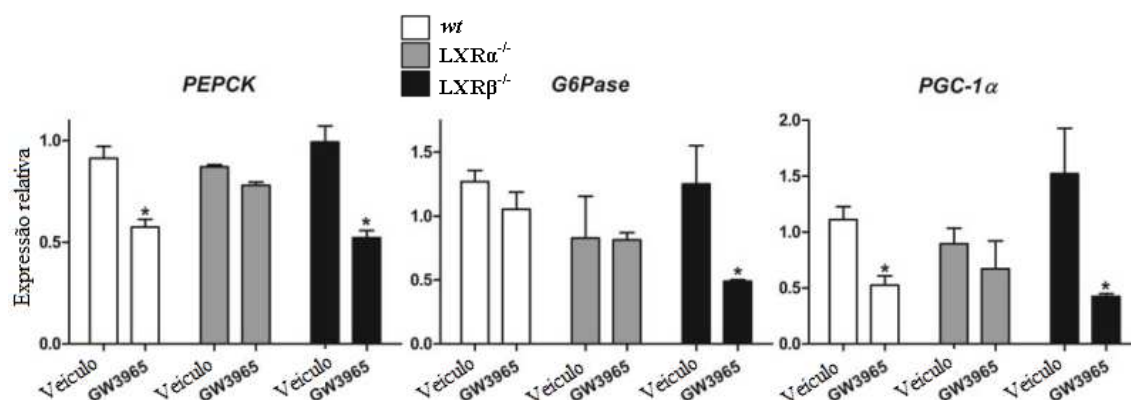


Fig. 7.2 – Efeito do GW3965 na expressão relativa dos genes *PEPCK*, *G6Pase* e *PGC-1 α* em fígados de ratinho *wt*, LXR α ^{-/-} e LXR β ^{-/-}. Os respetivos grupos de ratinhos foram tratados com GW3965 (agonista do LXR) durante 2 dias e após o jejum durante toda a noite, os fígados foram colhidos e a expressão relativa dos genes foi quantificada por RT-PCR. (*-*p*<0,05). Figura adaptada de Commerford *et al.*, 2007.

Outros estudos têm mostrado a capacidade de indução da expressão da enzima glucocinase (GK) no fígado (que intervém na glicólise na conversão de glicose em glicose-6-fosfato) pela ativação do LXR (Laffitte *et al.*, 2003; Pascual-García & Valledor, 2012).

7.1.2. Influência do LXR na sensibilidade à insulina

Vários estudos têm mostrado que a ativação do LXR por agonistas melhora a sensibilidade à insulina (Pascual-García & Valledor, 2012).

Estudos com ratinhos $LXR\alpha^{-/-}$ e $LXR\beta^{-/-}$, ratinhos magros ou normoglicémicos e com modelos de ratinhos diabéticos ou insulino-resistentes, vão ao encontro do que foi dito no parágrafo anterior, pois só no último grupo (ratinhos diabéticos) é que se verifica uma melhoria da sensibilidade à insulina, quando o LXR é ativado por agonistas. Essa sensibilização à insulina realiza-se a nível dos tecidos periféricos e não a nível hepático (Oosterveer *et al.*, 2010). Pensa-se que este efeito se deve ao facto da ativação do LXR induzir a expressão de GLUT4 no tecido adiposo (Fig. 7.3), uma vez que este transportador da glicose tem um papel crucial na absorção de glicose mediada pela insulina, tanto no tecido adiposo como no muscular, estando a modificação da sua expressão associada à DMT2. A existência de LXRE no promotor do gene que codifica o GLUT4 e o aumento da expressão desta proteína em adipócitos, por agonistas do LXR, vão de encontro a esta hipótese (Baranowski, 2008; Faulds *et al.*, 2010; Schulman, 2010).

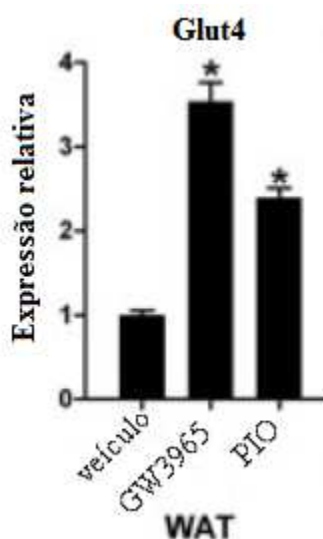


Fig. 7.3 – Efeito do GW3965 na expressão relativa de GLUT4 em adipócitos (WAT) de ratos obesos. Ratos foram tratados com veículo, GW3965 (agonista do LXR) ou pioglitazona (PIO) durante 3 semanas. (*- $p < 0,05$). Figura adaptada de Commerford *et al.*, 2007.

7.1.3. Influência do LXR na secreção de insulina

Tanto o LXR α como o LXR β são expressos no pâncreas no entanto, apenas este último é expresso nas células β onde há a secreção de insulina. A ativação do LXR nas células β tem mostrado, *in vitro*, promover a secreção de insulina (Baranowski, 2008; Faulds *et al.*, 2010; Schulman, 2010). No entanto *in vivo*, este efeito pode não ser relevante uma vez que não se têm verificado aumentos significativos da insulina com a ativação do LXR (Oosterveer *et al.*, 2010).

7.2. Efeitos indesejáveis da ativação do LXR

A ativação do LXR tem aparentemente efeitos benéficos na melhoria do controlo glicémico, mas a utilização de agonistas como fármacos antidiabéticos é posta em causa uma vez que a ativação deste RN está também associada ao aumento da lipogénese. Em alguns estudos, verificou-se que a ativação de alguns agonistas provoca um grande aumento de TG em circulação em ratinhos diabéticos e a acumulação de lípidos no fígado em ratinhos não diabéticos. Para além disso, este aumento de lipogénese nas células β pancreáticas pode induzir apoptose e conseqüentemente baixar a secreção de insulina (Baranowski, 2008; Oosterveer *et al.*, 2010).

A utilização de agonistas LXR também é posta em causa no tratamento da DMT2 por haver estudos que indiciam que a sua ativação reduz a expressão de enzimas, que intervêm no processo glicolítico em hepatócitos humanos e no tecido adiposo de ratinhos (Oosterveer *et al.*, 2010).

7.3. No futuro

Uma vez que o LXR α é expresso de forma mais abundante no fígado que o LXR β e tendo em conta que os efeitos lipogénicos se devem principalmente à ativação destes recetores neste órgão, a alternativa para utilizar este RN como alvo terapêutico será conseguir desenvolver moléculas que se liguem seletivamente ao LXR β evitando ou atenuando os efeitos indesejáveis ligados à ativação do LXR (Faulds *et al.*, 2010; Pascual-García & Villedor, 2012). Outra possibilidade de investigação será explorar os cofatores ou as vias em que a ativação do LXR intervém, como por exemplo a utilização do PGC-1 α como alvo terapêutico (Faulds *et al.*, 2010).

8. CAR (Recetor constitutivo de androstanos) e PXR (Recetor X de pregnanos)

O recetor constitutivo de androstanos (CAR) e o recetor X de pregnanos (PXR) são dois RN estreitamente interligados, expressos no fígado e com muita importância neste órgão. Estes RN pertencem à subfamília 1 (*Thyroid Hormone Receptor-like*), ao grupo grupo I, o PXR é o membro dois deste grupo (NR1I2) e o CAR o membro três (NR1I3), e estão codificados no cromossoma 3 (3q12-q13.3) e 1 (1q23.3), respetivamente. Estruturalmente são semelhantes à maioria dos RN (Gao & Xie, 2012; Ihunnah *et al.*, 2011; Kachaylo *et al.*, 2012)

Estes dois recetores apresentam alguns ligandos em comum e a sua regulação de determinados genes sobrepõe-se, porém os seus mecanismos de ativação e de regulação são diferentes (Moreau *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2009).

O PXR encontra-se no núcleo ligado ao gene alvo sob a forma de heterodímero com o RXR, apresenta uma atividade basal baixa, visto que está associado a correpressores. Após a ligação de um agonista é ativado, regulando assim a transcrição dos genes alvo (Moreau *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2009).

O CAR, ao contrário da maioria dos RN, está constitutivamente ativo na ausência de ligando, sendo contudo regulado tanto por agonistas como agonistas inversos. O CAR está presente no citoplasma associado a um complexo de proteínas *chaperon* e proteínas HS90. Quando um ligando se liga, há uma dissociação deste complexo e ocorre a translocação deste recetor do citoplasma para o núcleo, onde ativa ou reprime a transcrição dos genes alvo. A ligação a este pode ser feita sob a forma de monómero ou heterodímero com o RXR (Moreau *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2009).

Estes RN foram ambos, inicialmente, identificados como reguladores da transcrição de enzimas e transportadores responsáveis pela metabolização e eliminação de xenobióticos. Recentemente surgiram evidências de que estes recetores têm também algum impacto no metabolismo dos glúcidos e lípidos e na resposta inflamatória, e mostram também alguma influência na patologia de doenças metabólicas (Gao & Xie, 2012; Ihunnah *et al.*, 2011).

8.1. Influência na glicémia

O fígado tem um papel fundamental na manutenção dos níveis de glicose em circulação, pois é responsável por controlar a produção hepática de glicose, em resposta ao estímulo de hormonas como a insulina e as adipocinas. Na diabetes, a produção hepática de glicose está aumentada devido ao aumento da neoglicogénese e da glicogenólise, e há uma incapacidade da insulina exercer uma ação supressora nessa produção, devido à existência de resistência à insulina. Algumas terapêuticas antidiabéticas, como a metformina, atuam precisamente na neoglicogénese de modo a diminuir os níveis de glicemia (Gao & Xie, 2012).

A *PEPCK* e a *G6Pase* são as enzimas chave da neoglicogénese e são reguladas a nível transcricional no fígado. São ativadas pelo glucagon durante o jejum e suprimidas após a alimentação, pela insulina. Sabe-se que a transcrição destas proteínas é regulada por dois fatores de transcrição, o FOXO1 e o HNF4 α , pois nos promotores dos genes correspondentes foram encontrados locais de ligação para eles (o IRS e o DR1, respetivamente). O FOXO1, não fosforilado, interage no promotor com o IRS (sequência de resposta à insulina) ativando a transcrição dos genes neoglicogénicos e o HNF4 α , também um ativador destes genes, interage com o promotor no local DR1. Na presença de insulina, o FOXO1 é fosforilado por cinases através da via PI3K-Akt e inibe a transcrição destes genes e a degradação da FOXO1, interrompendo simultaneamente a interação desta proteína com o PGC1- α . O glucagon aumenta o cAMP intracelular, que ativa a PKA. Este por sua vez vai estimular a resposta da CREB (proteína de ligação aos elementos de resposta do cAMP) que se liga e regula a transcrição dos genes *PEPCK* e *G6Pase* (Ihunnah *et al.*, 2011; Kachaylo *et al.*, 2012).

Há investigadores que sugerem que, em condições fisiopatológicas, quando há um défice de energia, o PXR e o CAR intervêm na neoglicogénese de forma a criar um mecanismo de adaptação celular. Neste sentido, argumentam que a neoglicogénese é um processo bioquímico energeticamente exigente e que, quando há a necessidade de metabolizar xenobióticos, há um grande consumo de energia (ATP) para gerar NADPH suficiente, para ser utilizado pelas enzimas que intervêm nesse processo (CYP450). Ao suprimir-se a neoglicogénese, os hepatócitos são capazes de manter os níveis de NADPH necessários à metabolização dos xenobióticos (Gao & Xie, 2012).

8.1.1. CAR

A ativação do CAR reprime a expressão da PEPCK e da G6Pase, através de mecanismos variados dependentes deste RN. Vários autores demonstraram que o CAR inibe a atividade do HNF4 α , competindo com este pela ligação ao DR1, presente nos genes neoglicogénicos. A ativação do CAR também pode anular a atividade transcricional do FOXO1 por impedir a ligação deste ao IRS presente no promotor dos genes *PEPCK* e *G6Pase* (Kachaylo *et al.*, 2012)

Um estudo recente de Kachaylo (2012) investigou o mecanismo de regulação da transcrição dos genes que codificam a PEPCK e a G6Pase pelo isómero cis2,4,6-trifenildioxano-1,3 (cisTPD), um ativador do CAR no fígado de ratos. Verificou-se que a expressão destes genes neoglicogénicos estava reprimida pelo cisTPD em condições de jejum (Fig. 8.1)(Kachaylo *et al.*, 2012).

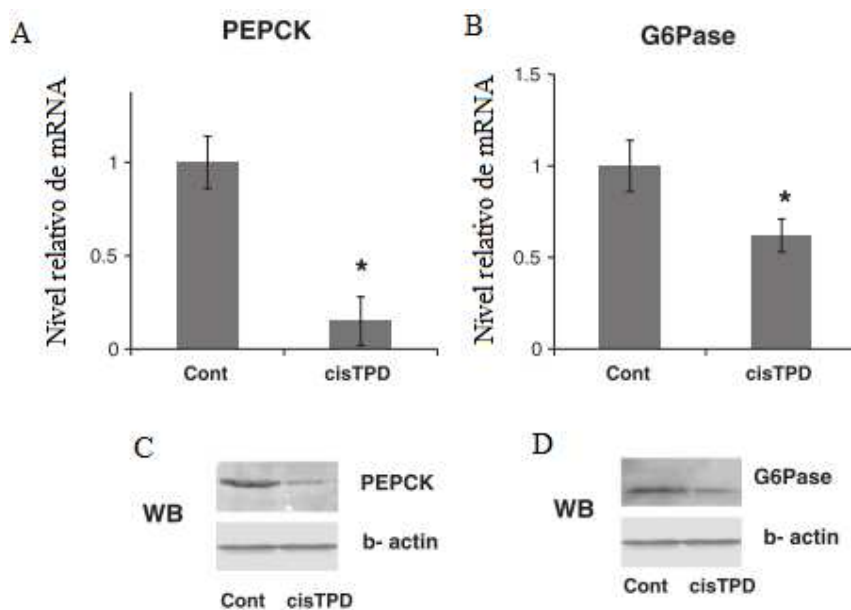


Fig. 8.1 – Efeito do cisTPD na expressão dos genes *PEPCK* (A) e *G6Pase* (B) e nos níveis das respectivas proteínas (C e D) em fígados de rato. (*- $p < 0,05$). Figura adaptada de Kachaylo *et al.*, 2012.

Também se verificou no mesmo estudo, através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina, que a ativação do CAR pelo cisTPD, em fígado de rato, impede a ligação do FOXO1 com as sequências de resposta insulínica (IRS) presentes no promotor dos genes que codificam a PEPCK e a G6Pase. Além disso, verificou-se também que a ativação do CAR pelo cisTPD, inibe a transativação do HNF4 α por competir com este

Recetores Nucleares na Terapêutica Antidiabética

para a ligação ao elemento de ligação do HNF-4 α (DR1), dos promotores dos genes neoglicogénicos. Constatou-se assim, que os resultados obtidos vão de encontro à hipótese de que a ativação do CAR pelo cisTPD inibe a transcrição dos genes neoglicogénicos (que codificam a PEPCK e a G6Pase), por interferir com a atividade transcricional do FOXO1 e do HNF4 α , o que torna o cisTPD um potencial fármaco que poderá ser utilizado para controlar a neoglicogénese, na DMT2 (Fig. 8.2) (Kachaylo *et al.*, 2012).

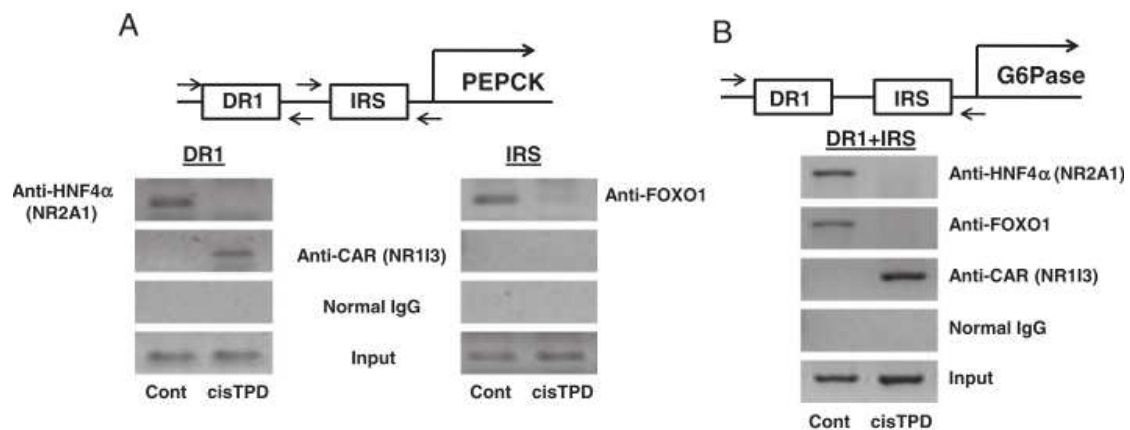


Fig. 8.2 – Recrutamento de CAR, HNF4 α e FOXO1, para o promotor dos genes *PEPCK* (A) e *G6Pase* (B), no fígado de ratos em resposta ao tratamento com cisTPD. Figura adaptada de Kachaylo *et al.*, 2012.

A supressão da neoglicogénese mediada pelo CAR já foi verificada *in vivo*. O estudo de Dong (2009) confirmou que a ativação deste RN, em ratinhos ob/ob, regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose (*PEPCK* e *G6Pase*), suprime a produção de glicose e estimula a captação de glicose no fígado, melhora a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina e previne a obesidade nestes ratinhos (Fig. 8.3). Este estudo mostrou que o CAR pode vir a ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento da DMT2 e também para prevenção da obesidade.

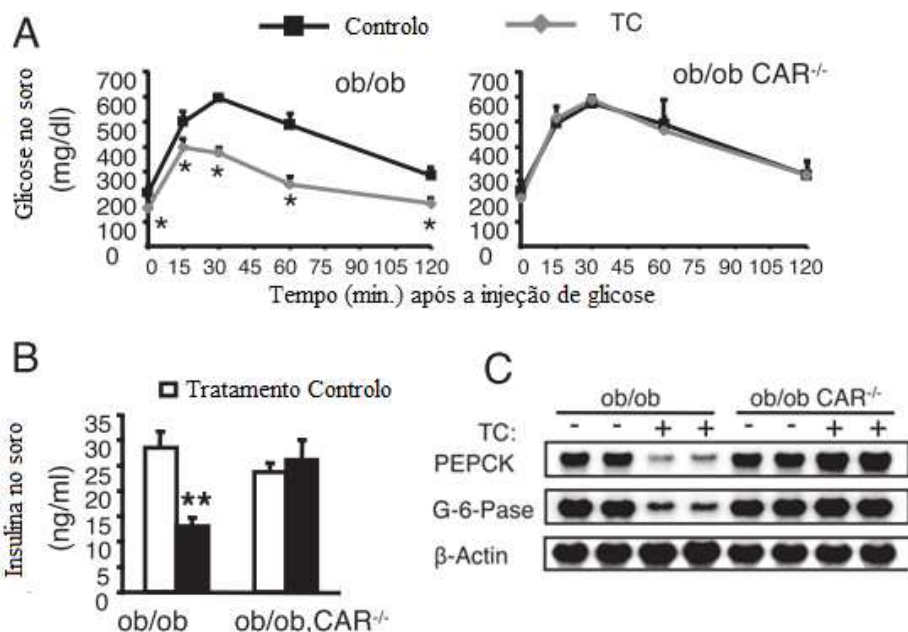


Fig. 8.3 – Em ratinhos *ob/ob* a ativação do CAR melhora a tolerância à glicose (A) e a sensibilidade à insulina (B) e regula a expressão de genes relacionados com a metabolização da glicose (C). Ratinhos *ob/ob* e *ob/ob CAR^{-/-}* foram tratados com um agonista do CAR -TCPOBOP (TC) ou com óleo de milho (controlo) durante 1 mês. **A:** Após 6 horas de jejum o TTG foi realizado e a glicose presente no soro foi quantificada. **B:** A insulina presente no soro foi quantificada após 6 horas de jejum. **C:** O RNA total hepático foi isolado e a PEPCK e a G6Pase foram quantificadas por Northern blot (*- $p < 0,01$). Figura adaptada de Dong *et al.*, 2009.

A ativação do CAR, em modelos animais obesos (*ob/ob* e *c57bl/6j*), melhorou a hiperglicemia e a sensibilidade à insulina. No ser humano, o fenobarbital (PB) mostrou a capacidade de reduzir os níveis de glicemia e melhorar a sensibilidade à insulina em doentes com DMT2. Alguns estudos já confirmaram, em hepatócitos primários de ratinhos, que esta capacidade por parte do PB se deve à supressão da expressão de enzimas fundamentais e limitativas da neoglicogénese, a PEPCK e a G6Pase, de forma dependente de CAR (Gao & Xie, 2010, 2012).

A ativação do CAR também influencia positivamente a esteatose hepática, sugerindo Dong (2009) que isso se deve à supressão de lipogénese e à indução da β-oxidação dos ácidos gordos.

Apesar dos estudos realizados indicarem uma ação benéfica na ativação do CAR, mantém-se a incerteza quanto aos efeitos adversos desta ativação, sabendo-se à partida que promove a hiperplasia e a carcinogénese do fígado (Gao & Xie, 2012).

8.1.2. PXR

Muitos estudos têm mostrado que o PXR desempenha um papel importante no metabolismo dos lípidos e da glicose, mais precisamente na regulação da neoglicogénese hepática (Gao & Xie, 2010; Ihunnah *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado, em modelos animais, que a expressão das enzimas PEPCK e G6Pase está reduzida quando o PXR está ativado (quer em ratinhos transgênicos com a expressão de PXR ativada no fígado – ratinhos VP-hPXR, quer em ratinhos *wt* tratados com o PCN, não se verificando o mesmo para ratinhos PXR^{-/-}). É sugerido por um lado, que o PXR, quando ativado, interage diretamente com o CREB, impedindo que este se ligue ao promotor do gene que codifica a enzima G6Pase, e por outro, que o PXR é também capaz de interagir diretamente com o FOXO1, inibindo a sua ligação ao IRS presente no promotor do gene *PEPCK* e *G6Pase*. Outros estudos sugerem que o PXR também poderia competir com o HNF4α e o PGC-1α e suprimir a neoglicogénese (Gao & Xie, 2010; Ihunnah *et al.*, 2011).

Os efeitos, *in vivo*, da ativação do PXR quanto aos benefícios para a DMT2 ainda continuam por provar. Em ratinhos transgênicos, com uma sobreexpressão do PXR e alguns agonistas do PXR, detetou-se a capacidade de suprimir a expressão das enzimas PEPCK e G6Pase de forma dependente do PXR. Todavia a ativação do PXR está também associada a esteatose hepática, ao aumento de corticoides, efeitos que já se provou estarem interligados com a resistência à insulina (Gao & Xie, 2012).

Contudo a ativação do PXR em hepatócitos e macrófagos pode levar a esteatose hepática, dislipidemia e aumento da aterosclerose, limitando a possível utilização de agonistas para o tratamento da DMT2. Só seria possível este RN tornar-se um alvo terapêutico se se conseguisse ativar o PXR de forma seletiva para os efeitos benéficos antidiabéticos da sua ativação (Gao & Xie, 2012).

9. Conclusão

Os principais reguladores metabólicos no nosso corpo são os três PPAR, que agindo como sensores de lípidos, controlam no seu conjunto quase todos os aspetos do metabolismo dos ácidos gordos e têm grande importância na sensibilidade à insulina e homeostasia da glicose. A desregulação destes recetores ou a sua incapacidade

funcional, estão associados à resistência à insulina, DMT2 e outras doenças metabólicas. Por outro lado a ativação destes recetores promove benefícios metabólicos.

O PPAR α é um importante regulador do metabolismo lipídico, no entanto relativamente à ação que exerce sobre a homeostasia da glicose não parece ser relevante, não sendo este RN um bom exemplo de futuro alvo terapêutico para a DMT2. Já o PPAR β/δ tem demonstrado relevância no tratamento de doenças relacionadas com o metabolismo geral, incluindo a resistência à insulina e poderá vir a ser uma mais valia como alvo terapêutico na DMT2, pois este RN é importante na regulação do metabolismo lipídico e da homeostasia da energia. Tem também demonstrado relevância na sensibilidade à insulina, na redução da produção hepática de glicose e no aumento da expressão de GLUT4. Este recetor inclusivamente, parece mediar alguns efeitos benéficos do exercício físico na DMT2, o que realça ainda mais a sua importância nesta doença, pelo que será sem dúvida um alvo terapêutico promissor.

O PPAR γ é o membro desta subfamília com mais impacto no metabolismo dos glúcidos. Depois da ligação de um agonista e consequente ativação do PPAR γ , esta aumenta a transcrição de genes implicados na sensibilização à insulina e diminui a de genes envolvidos na resistência à insulina. Um efeito benéfico na resistência à insulina é também o facto de o PPAR γ ser um regulador muito importante no metabolismo lipídico, pois ao promover a utilização dos ácidos gordos livres baixa-os a nível circulatório, diminuindo assim a lipotoxicidade associada à resistência à insulina.

Há estudos que mostram que o tecido adiposo, o músculo e os macrófagos, são os tecidos essenciais para o desenvolvimento da resistência à insulina e que a ativação do PPAR γ melhora a sensibilidade à insulina e consequentemente a sua ação no músculo esquelético e no fígado. Apesar disso, alguns autores defendem um modelo “adipocentrico”, em que a ativação do PPAR γ , especificamente no tecido adiposo, é suficiente para melhorar a sensibilidade à insulina na terapia da DMT2, devido à melhoria dos perfis lipídicos e das adipocinas, e à diminuição da produção de citocinas pelos macrófagos.

As TZD são uma classe de fármacos antidiabéticos, que atuam como agonistas totais do PPAR γ , ativando-o e obtendo os efeitos benéficos desta ativação. São por isso uma das poucas classes de antidiabéticos sensibilizadores de insulina que melhoram o estado de resistência à insulina, demonstrando uma eficaz redução da glicemia, da HbA1c e da hiperinsulinemia. Para além destas ações ainda têm a vantagem de melhorarem o perfil lipídico, ao aumentarem os níveis de colesterol HDL e reduzirem a

os de TG e ácidos gordos livres. Todavia apresentam também efeitos prejudiciais, entre os quais o aumento de peso e a insuficiência cardíaca, que limitam a utilização destes fármacos a nível clínico. Continuam contudo a ser utilizados clinicamente e frequentemente em terapia combinada com outros fármacos antidiabéticos, combinando os benefícios de todos eles e completando assim a terapêutica antidiabética. Em todas as situações estes fármacos são considerados como segunda escolha no tratamento da DMT2, por apresentarem efeitos adversos.

As questões referidas anteriormente reforçam a necessidade de desenvolver um sensibilizador de insulina mais seguro. Existem já alguns grupos de investigadores a trabalhar neste campo e a desenvolver estudos centrados nesse objetivo.

Alguns grupos têm-se debruçado sobre o estudo de agonistas duplos PPAR α/γ que se ligam e ativam a estes dois isotipos de PPAR, com o objetivo de alcançar os efeitos benéficos da ativação destes dois RN: a sensibilização à insulina (PPAR γ) e os efeitos antidislipídicos (PPAR α). No geral, estes agonistas não ofereceram uma melhoria na segurança relativamente aos fármacos já utilizados, todavia o aleglitazar exibiu bons perfis de segurança e de eficácia na terapia de curta duração da DMT2. Está atualmente a ser testado o seu perfil de segurança e a eficácia associada ao tratamento de longa duração da DMT2, e o seu potencial na redução do risco cardiovascular.

Ligandos com capacidade de ligação e ativação aos três PPAR simultaneamente, estão a ser também estudados e desenvolvidos e têm apresentado uma boa eficácia, em modelos animais com doenças metabólicas em estudos pré-clínicos, sendo necessário agora avaliar o seu perfil de segurança.

O desenvolvimento de futuros fármacos que tenham o PPAR γ como alvo terapêutico também se tem debruçado sobre a classe dos SPPAR γ M, ligandos que induzem só os efeitos benéficos associados à ativação deste RN, sem manifestar os indesejáveis. O INT131, é um desses fármacos e já obteve bons resultados num ensaio clínico de curta duração em doentes com DMT2, pois exibiu uma melhoria significativa da glicemia e da sensibilidade à insulina, associadas a um bom perfil de segurança e a uma boa tolerância. Este composto está agora a ser testado no tratamento de média duração (24 semanas).

Para o desenvolvimento de futuros fármacos é determinante aumentar o conhecimento de tudo o que envolve o PPAR γ : compreender melhor os mecanismos moleculares subjacentes da ação reguladora destes recetores, e como são estas ações coordenadas, compreender as vias de sinalização em que o PPAR γ está inserido. Só

assim será possível entender todas as variantes que atuam neste RN e desenvolver fármacos com melhores perfis de segurança.

O FXR regula não só o metabolismo dos ácidos biliares e dos lípidos, mas também o metabolismo da glicose. Embora seja expresso maioritariamente no fígado, detém um papel importante como regulador do estado metabólico de todo o organismo, uma vez que os efeitos da sua ativação não se restringem ao tecido onde está a ser expresso, afetando todo o corpo. Verificou-se também que tem efeitos benéficos sobre o metabolismo da glicose, já que diminui os níveis de glicose em circulação, através da redução da neoglicogénese e da ativação de glicogénese.

Apesar das evidências, também há estudos que relatam um efeito negativo quando o FXR é ativado. A regulação pelo FXR ainda não é por isso bem compreendida, uma vez que o seu efeito positivo ou negativo, parece variar e depender do modelo animal utilizado e do *modus operandi* do procedimento experimental.

Alguns ensaios clínicos com resinas que se ligam a ácidos biliares, já confirmaram que os agonistas do FXR, são benéficos para o controlo glicémico em doentes com DM2 e síndromes de resistência à insulina.

Considerando que não se conhecem, por exemplo, as consequências do aumento do armazenamento prolongado (mais de 2 semanas) do glicogénio, resultante da ativação deste recetor nuclear, os estudos futuros deverão, não só esclarecer os efeitos da ativação do FXR no controlo da glicemia, mas também avaliar os possíveis efeitos adversos que podem advir desta ativação.

Segundo a maioria dos estudos, a regulação de genes pela ativação do FXR é benéfica para situações de excesso, como a obesidade e a diabetes.

Este recetor nuclear é, até agora, pouco conhecido mas, uma vez que interfere em várias vias metabólicas, poderá vir a ser objeto de novos estudos com o objetivo de desenvolver possíveis fármacos. Estes fármacos deverão ter este recetor nuclear como alvo terapêutico e deverão ser dirigidos para doenças relacionadas com os metabolismos em que o FXR interfere, como a diabetes, a síndrome metabólica e síndromes de resistência à insulina. O desenvolvimento destes fármacos pode passar pela descoberta e pelo aperfeiçoamento de novos agonistas, parciais ou não, para este recetor.

Pode-se dizer que o LXR é um importante regulador de várias vias metabólicas e tem um papel importante na regulação de genes do metabolismo do colesterol e dos

lípidos, tendo também apresentado relevância no metabolismo dos glicídios. Tal como foi referido, a sua ativação pode melhorar a sensibilidade à insulina e reprimir a expressão de genes que codificam proteínas que intervêm na neoglicogénese, como a PEPCK e a G6Pase, e induzir a expressão de genes relacionados com glicólise, mais precisamente a GK. Apesar da necessidade de aprofundar os estudos e o conhecimento deste RN, ele é um possível alvo terapêutico para o tratamento da DMT2, caso se consigam desenvolver fármacos específicos para o LXR β de modo a suprimir os efeitos indesejáveis da ativação do LXR α .

Estudos recentes têm confirmado que o PXR e o CAR são reguladores, não só de proteínas envolvidas nas várias fases da metabolização de xenobióticos, como também do metabolismo energético. Estes dois RN podem vir a ser potenciais alvos terapêuticos, não só para a DMT2 como para outras doenças metabólicas.

O CAR e o PXR podem, ambos, suprimir a expressão de genes neoglicogénicos, pela interação com corre reguladores e outros fatores de transcrição, de que são exemplos o FOXO1, o HNF4 α , o PGC-1 α .

Em estudos *in vitro* e pela análise de promotores de genes, foi relatado que estes dois RN podem impedir que o FOXO1 se ligue aos elementos de resposta à insulina, presentes no promotor dos genes que codificam as enzimas neoglicogénicas, associando-se ao FOXO1 e eliminando a atividade transcricional. Foi apontada também a sua capacidade de inibir o HNF4 α por competirem com os seus coativadores (como o PGC-1 α) pela sequência de ligação presente no promotor dos genes neoglicogénicos e a capacidade do PXR interagir com o CREB e impedir a sua ligação no promotor dos genes neoglicogénicos após a estimulação pelo cAMP. Torna-se agora necessário investigar se estes resultados se transpõem para o ser humano e se têm relevância clínica, pelo que é fundamental continuar os estudos destes RN para compreender melhor os mecanismos de ativação do CAR e o PXR e a sua influência no metabolismo energético.

Relativamente ao PXR, é necessário averiguar realmente o efeito deste na homeostasia energética e o seu impacto na sensibilidade à insulina e no melhoramento da glicemia.

Quanto ao CAR, e sabendo que este é alvo do fenobarbital (PB), é necessário esclarecer se os efeitos antidiabéticos deste se devem realmente a uma via dependente

de CAR e se agonistas do CAR não-PB são capazes de obter um efeito antidiabético semelhante.

Devido aos efeitos indesejáveis da ativação destes RN, o futuro poderá passar pelo desenvolvimento de ligandos capazes de modular seletivamente estes recetores, de modo a eliminar estes efeitos associados à ativação total destes RN, e permitir a sua utilização como fármacos antidiabéticos.

Pelos estudos apresentados, conclui-se que os recetores nucleares poderão ser alvos promissores para a terapia farmacológica antidiabética. Há no entanto ainda muito a fazer, pois há vias em que os recetores atuam que ainda não estão completamente compreendidas, há novas questões que se levantam ao longo da investigação e é por isso necessário desenvolver estudos no sentido de diminuir ao máximo os riscos dessas terapias permitindo otimizar a segurança na sua possível aplicação em seres humanos.

10. Referências bibliográficas

- Alexander, S. P. H., Mathie, A., & Peters, J. A. (2009). Guide to receptors and channels (GRAC). *British journal of pharmacology*, 164(1), S175 – S188. Retirado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/sj.bjp.0707746/full>
- American Diabetes Association. (2012). *Diabetes Basics*. Consultado a 10, abril de 2012, de <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/>
- Armoni, M., Harel, C., & Karnieli, E. (2007). Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 18(3), 100–7. doi:10.1016/j.tem.2007.02.001
- Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*, 59(7), 31–55. Retirado de http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_08_s7/pdf/31_12_08_s7_article.pdf
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*, 53, 409–35. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104018
- Bilous, R., & Donnelly, R. (2010). *Handbook of Diabetes* (4^a ed.). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. K., & Buxton, I. L. (2011). *Goodman & Gilman's The Pharmacology Basis of Therapeutics* (12 ed.). United States of America: McGraw-Hill.
- Cao, M., Long, Y., Tong, Y., Wan, J., & Tong, N. (2012). Activation of PPAR δ up-regulates the expression of insulin gene transcription factor MafA and ameliorates glucose-induced insulin secretion impaired by palmitate. *Molecular and cellular biochemistry*, 366(1-2), 183–9. doi:10.1007/s11010-012-1296-9
- Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T. H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., et al. (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *The Journal of biological chemistry*, 281(16), 11039–49. doi:10.1074/jbc.M510258200
- Cho, N., & Momose, Y. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(17), 1483–507. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075761>
- Claudiel, T., Staels, B., & Kuipers, F. (2005). The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(10), 2020–30. doi:10.1161/01.ATV.0000178994.21828.a7

- Clinical Trials.gov. (2012). *A Study With Alogliptazar in Patients With a Recent Acute Coronary Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus*. Consultado a 5, outubro de 2012, de <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01042769>
- Commerford, S. R., Vargas, L., Dorfman, S. E., Mitro, N., Rocheford, E. C., Mak, P. a, Li, X., et al. (2007). Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(12), 3002–12. doi:10.1210/me.2007-0156
- dLife (2012). *Diabetes Museum*. Consultado a 1, setembro de 2012, de <http://www.dlife.com/files/Timeline>
- Dong, B., Saha, P. K., Huang, W., Chen, W., Abu-Elheiga, L. A., Wakil, S. J., Stevens, R. D., et al. (2009). Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18831–6. doi:10.1073/pnas.0909731106
- Doshi, L. S., Brahma, M. K., Bahirat, U. A., Dixit, A. V., & Nemmani, K. V. S. (2010). Discovery and development of selective PPAR gamma modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert opinion on investigational drugs*, 19(4), 489–512. doi:10.1517/13543781003640169
- Dunn, F. L., Higgins, L. S., Fredrickson, J., & DePaoli, A. M. (2011). Selective modulation of PPAR γ activity can lower plasma glucose without typical thiazolidinedione side-effects in patients with Type 2 diabetes. *Journal of diabetes and its complications*, 25(3), 151–8. doi:10.1016/j.jdiacomp.2010.06.006
- Duran-Sandoval, D., Cariou, B., Percevault, F., Hennuyer, N., Grefhorst, A., van Dijk, T. H., Gonzalez, F. J., et al. (2005). The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *The Journal of biological chemistry*, 280(33), 29971–9. doi:10.1074/jbc.M501931200
- Faulds, M. H., Zhao, C., & Dahlman-Wright, K. (2010). Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases. *Current opinion in pharmacology*, 10(6), 692–7. doi:10.1016/j.coph.2010.07.003
- Feldman, P. L., Lambert, M. H., & Henke, B. R. (2008). PPAR modulators and PPAR pan agonists for metabolic diseases: the next generation of drugs targeting peroxisome proliferator-activated receptors? *Current topics in medicinal chemistry*, 8(9), 728–49. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537685>
- Gao, J., & Xie, W. (2010). Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), 2091–2095. doi:10.1124/dmd.110.035568.the
- Gao, J., & Xie, W. (2012). Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 33(10), 552–8. doi:10.1016/j.tips.2012.07.003

- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 685–704. doi:10.1124/pr.58.4.2.1
- Gross, B., & Staels, B. (2007). PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 21(4), 687–710. doi:10.1016/j.beem.2007.09.004
- Guimarães S., M. D. (2006). *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológica: Manual de Farmacologia e Farmacoterapia* (5ª ed.). Porto: Porto Editora.
- Guo, L., & Tabrizchi, R. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacology & therapeutics*, 111(1), 145–73. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.009
- Henry, R. R., Lincoff, A. M., Mudaliar, S., Rabbia, M., Chognot, C., & Herz, M. (2009). Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet*, 374(9684), 126–35. doi:10.1016/S0140-6736(09)60870-9
- Higgins, L., & DePaoli, A. (2010). Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) modulation as a strategy for safer therapeutic PPAR γ activation. *The American journal of clinical nutrition*, 91, 267–272. doi:10.3945/ajcn.2009.28449E.2
- Ihunnah, C. a, Jiang, M., & Xie, W. (2011). Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(8), 956–63. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.014
- International Diabetes Federation. (2011). *IDF Diabetes Atlas, 5th edn*. Consultado a 16, julho de 2012, de <http://www.idf.org/diabetesatlas>
- Kachaylo, E. M., Yarushkin, A. a, & Pustylnyak, V. O. (2012). Constitutive androstane receptor activation by 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 suppresses the expression of the gluconeogenic genes. *European journal of pharmacology*, 679(1-3), 139–43. doi:10.1016/j.ejphar.2012.01.007
- Laffitte, B. a, Chao, L. C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S. B., Castrillo, A., et al. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5419–24. doi:10.1073/pnas.0830671100
- Lalloyer, F., & Staels, B. (2010). Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(5), 894–9. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179689

- Lee, C., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L., Olefsky, J. M., Gonzalez, F. J., et al. (2006). PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3444–9. doi:10.1073/pnas.0511253103
- Luconi, M., Cantini, G., & Serio, M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids*, 75(8-9), 585–94. doi:10.1016/j.steroids.2009.10.012
- Ma, K., Saha, P. K., Chan, L., & Moore, D. D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, 116(4), 1102 – 1109. doi:10.1172/JCI25604.1102
- Medina, J. (2008). *Diabetomecum*. Lisboa: Permanyer Portugal.
- Modica, S., Gadaleta, R. M., & Moschetta, A. (2010). Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear receptor signaling*, 8, e005. doi:10.1621/nrs.08005
- Moreau, A., Vilarem, M. J., Maurel, P., & Pascussi, J. M. (2007). Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Molecular pharmaceutics*, 5(1), 35–41. doi:10.1021/mp700103m
- Nobelprize.org. (2012). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1923*. Consultado a 8, junho de 2012, de http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1923/
- Nunes, J. (2010). *DIABETES: Uma Abordagem Global*. Miraflores: Euromédice, Edições Médicas, Lda.
- Oosterveer, M. H., Grefhorst, A., Groen, A. K., & Kuipers, F. (2010). The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design. *Progress in lipid research*, 49(4), 343–52. doi:10.1016/j.plipres.2010.03.002
- Organização Mundial de Saúde. (2012). *Diabetes Programme*. Consultado a 28, fevereiro de 2012, de <http://www.who.int/diabetes/en/>
- Organização Mundial de Saúde. (2006). *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia*. Consultado a 10, abril de 2012, de http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf
- Pascual-García, M., & Valledor, A. F. (2012). Biological roles of liver X receptors in immune cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 60(4), 235–49. doi:10.1007/s00005-012-0179-9
- Pinto, A. (2007). *FISIOPATOLOGIA, Fundamentos e Aplicações*. Lousã: Lidel

- Ricote, M., & Glass, C. K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(8), 926–35. doi:10.1016/j.bbali.2007.02.013
- Rizzo, G., Passeri, D., & Franco, F. D. (2010). Functional characterization of the semisynthetic bile acid derivative INT-767, a dual farnesoid X receptor and TGR5 agonist. *Molecular Pharmacology*, 78(4), 617–630. doi:10.1124/mol.110.064501.
- Savage, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2007). Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological reviews*, 87(2), 507–520. doi:10.1152/physrev.00024.2006.Disordered
- Schulman, I. G. (2010). Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. *Advanced drug delivery reviews*, 62(13), 1307–15. doi:10.1016/j.addr.2010.07.002
- Silva C, Lopes Z., Soares J.. (2010). Terapêutica não insulínica da Diabetes Mellitus: Terapêutica mais valias....*Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*, vol.17, nº2, 124-132
- Sociedade Portuguesa de Diabetologia (2012). *Diabetes: Factos e Números 2011 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes*. Consultado a 16, julho de 2012, de http://www.portugal.gov.pt/media/463407/diabetes_2011.pdf
- Sonoda, J., Pei, L., & Evans, R. M. (2008). Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS letters*, 582(1), 2–9. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.016
- Staels, B., Handelsman, Y., & Fonseca, V. (2010). Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Current diabetes reports*, 10(1), 70–7. doi:10.1007/s11892-009-0087-5
- Sugii, S., & Evans, R. M. (2011). Epigenetic codes of PPAR γ in metabolic disease. *FEBS letters*, 585(13), 2121–2128. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.007
- Sugii, S., Olson, P., Sears, D. D., Saberi, M., Atkins, A. R., Barish, G. D., Hong, S.-H., et al. (2009). PPAR γ activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22504–9. doi:10.1073/pnas.0912487106
- Teodoro, J. S., Rolo, A. P., & Palmeira, C. M. (2011). Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(11), 458–66. doi:10.1016/j.tem.2011.07.002
- Wada, T., Gao, J., & Xie, W. (2009). PXR and CAR in energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(6), 273–9. doi:10.1016/j.tem.2009.03.003
- Wang, Y.-X. (2010). PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell research*, 20(2), 124–37. doi:10.1038/cr.2010.13

- Whitehead, J. P. (2011). Diabetes: New conductors for the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) orchestra. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(8), 1071–4. doi:10.1016/j.biocel.2011.04.017
- Yamagata, K., Daitoku, H., Shimamoto, Y., Matsuzaki, H., Hirota, K., Ishida, J., & Fukamizu, A. (2004). Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *The Journal of biological chemistry*, 279(22), 23158–65. doi:10.1074/jbc.M314322200
- Zhang, Y., & Edwards, P. a. (2008). FXR signaling in metabolic disease. *FEBS letters*, 582(1), 10–8. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.015
- Zhang, Y., Lee, F. Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F. J., Willson, T. M., et al. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1006–11. doi:10.1073/pnas.0506982103