

STRESS OXIDATIVO E SEUS EFEITOS NA INSULINO-RESISTÊNCIA E DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS β -PANCREÁTICAS

Relação com as Complicações da Diabetes *Mellitus* Tipo 2

J. Pedro LOPES, Sílvia M. OLIVEIRA, J. SOARES FORTUNATO

RESUMO

A diabetes *mellitus* tipo 2, a mais prevalente e grave doença metabólica a nível mundial, resulta da interacção entre factores genéticos e ambientais. Em indivíduos geneticamente predispostos a combinação de uma ingestão hipercalórica e reduzida actividade física é responsável pelo aparecimento de um estado de insulino-resistência, o qual pode ser compensado até certo ponto pelo incremento na secreção insulínica (hiperinsulinemia). Contudo, uma compensação insuficiente conduz a um estado de intolerância à glicose, que se pensa, actualmente, possa evoluir para diabetes. Os efeitos nocivos da hiperglicemia, aliados ao possível aumento dos ácidos gordos livres, são mediados pela acção de moléculas altamente reactivas, os radicais livres de oxigénio e azoto (ROS e RNS). Dados actuais revelam que estas espécies reactivas funcionam como moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação da função celular, sendo que o aumento da sua produção ou a sua reduzida eliminação causa stress oxidativo. Os radicais livres actuam directamente, por dano oxidativo sobre macromoléculas (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos) ou indirectamente, activando vias de sinalização celulares sensíveis a mecanismos de stress oxidativo. Neste trabalho serão abordadas as vias reconhecidas como sendo as mais influentes nos mecanismos de stress, nomeadamente: NF- κ B, JNK/SAPK, p38 MAPK, PKC, AGE/RAGE, hexosaminas e poliols. Acredita-se que estas cascatas sinalizadoras sejam responsáveis pela insulino-resistência e secreção insulínica diminuída, pelo que o uso de antioxidantes como a vitamina C, E e o ácido α -lipóico seja visto como um passo possível para a abordagem das complicações da diabetes tipo 2. São igualmente discutidas potencialidades do ácido acetilsalicílico nas patologias supracitadas.

J.P.L., S.M.O., J.S.F.: Serviço de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto

© 2008 CELOM

SUMMARY

OXIDATIVE STRESS AND ITS EFFECTS ON INSULIN RESISTANCE AND PANCREATIC β -CELLS DYSFUNCTION

Relationship with Type 2 Diabetes *Mellitus* Complications

Type 2 diabetes *mellitus*, the most prevalent and serious metabolic disease worldwide, is believed to result from the interaction between genetical and lifestyle factors. In genetically predisposed people, the combination of a hypercaloric ingestion and reduced physical activity is responsible for the appearance of insulin resistance. This state can be overcome, until a certain point, with increments of insulin secretion (hyperinsulinemia). However, an insufficient compensation leads to a state of glucose intolerance, which can evolve to diabetes, according to actual knowledge. The noxious effects of the

hyperglycemia, allied with the possible increase of free fatty acids, are mediated by highly reactive molecules, oxygen and nitrogen free radicals species (ROS and RNS). Recent data suggests that these reactive species are signalling molecules and are involved in the regulation of the cellular function, being its increased production or reduced elimination a cause of oxidative stress. Indeed, those free radicals act directly through oxidative damage on macromolecules (proteins, lipids, DNA) or indirectly, activating single transduction pathways sensible to stress mechanisms. In this review, we will consider the pathways recognized as the more significant in stress mechanisms, namely: NF- κ B, JNK/SAPK, p38 MAPK, PKC, AGE/RAGE, hexosamines and poliol. These signalling cascades are believed to be responsible for the insulin resistance and reduced insulin secretion, therefore the use of innocuous antioxidant substances such as vitamin C, E and the α -lipoic acid, is seen as a possible step for type 2 diabetic complications management. We will also discuss acetylsalicylic acid potentialities in the above-mentioned pathologies.

INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* tipo 2 (e suas complicações), é uma das principais patologias a nível mundial, sendo que se estima que a sua prevalência possa aumentar de 6% para mais de 10% na próxima década¹.

Uma das consequências deste facto prende-se com a repercussão que a diabetes tipo 2 tem em termos económicos na gestão dos cuidados e recursos de saúde. Assim sendo, torna-se fundamental conhecer os mecanismos envolvidos na sua patogénese, a fim de se poder explorar possíveis novos alvos terapêuticos¹.

Tanto a diabetes tipo 1 como a tipo 2, possuem como denominador comum um forte componente genético². Contudo, no que diz respeito à diabetes tipo 2, factores ambientais adjuvantes, como por exemplo de ordem hormonal, consumo calórico excessivo, sedentarismo e obesidade, têm uma influência significativa na sua patogénese².

É reconhecido hoje em dia que o desenvolvimento da diabetes tipo 2 está associado a uma combinação de disfunção das células β -pancreáticas e insulino-resistência. As células β conseguem compensar a resistência à insulina através de um incremento na secreção de insulina (hiperinsulinemia) mas, com o tempo, uma compensação insuficiente pode levar à instalação de um estado de intolerância à glicose^{3,4}. Actualmente, é igualmente aceite que a hiperglicemia está na base de muitas complicações da diabetes, como sejam a nefropatia, neuropatia, retinopatia diabéticas¹. Este estado de hiperglicemia crónica contribui, também, para a disfunção progressiva das células β , com agravamento da resistência insulínica, originando-se um estado conhecido como glicotoxicidade³⁻⁶.

Paralelamente, é demonstrado na literatura científica que, níveis excessivos de ácidos gordos livres, se tornam

igualmente tóxicos quando presentes de forma crónica, sendo este estado conhecido como lipotoxicidade⁶.

Subjacentes a todas estas condições estão fenómenos de stress oxidativo, devidos a um desequilíbrio entre a produção de espécies altamente reactivas (normalmente dependentes do oxigénio – ROS e do nitrogénio – RNS), e defesas antioxidantes, o que conduz frequentemente a lesão tecidual¹. É devido à sua capacidade para oxidar directamente lipídeos, proteínas e DNA, que se crê que as ROS desempenham um papel fulcral na patogénese das complicações diabéticas mais tardias^{1,7}. Para além desta capacidade de infligir dano macromolecular, as ROS podem funcionar como moléculas sinalizadoras que activam vários processos bioquímicos sensíveis ao stress, podendo gerar alterações celulares que, em último caso, são igualmente responsáveis pelo aparecimento das complicações da diabetes. Estes processos fisiológicos intracelulares apresentam habitualmente como consequência a insulino-resistência e a diminuição da secreção de insulina⁸.

Neste artigo de revisão salienta-se o papel que o stress oxidativo induzido pela hiperglicemia desempenha no agravamento da insulino-resistência, disfunção das células β e mais tardiamente no aparecimento da diabetes tipo 2. Consequentemente, o desenvolvimento de novos agentes que reduzam o grau de stress oxidativo e/ou a activação de mecanismos de sinalização sensíveis ao stress, poderá ser considerado uma nova e potencial abordagem terapêutica.

Agentes Envolvidos no Stress Oxidativo e sua Contra-Regulação

Os *radicais livres* e outras *espécies reactivas* estão envolvidos em muitas doenças humanas na medida em que uma formação aumentada destes se traduz frequentemente em lesão tecidual. Também na progressão da dia-

betes e suas complicações, os radicais livres parecem desempenhar um contributo significativo^{9,10}.

O termo *stress oxidativo* é largamente usado na literatura referindo-se à situação na qual existe um desequilíbrio significativo entre a produção de radicais livres e defesas antioxidantes, levando a uma potencial lesão tecidual^{1,11}.

Por sua vez a designação *espécies radicais livres* reúne uma variedade de moléculas altamente reactivas que podem ser divididas em categorias diferentes, nomeadamente as ROS, as RNS e RCS (espécies reactivas ao oxigénio, azoto e cloro, respectivamente), sendo as últimas menos frequentes. Os compostos biologicamente mais relevantes dentro de tais categorias incluem o anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o radical peróxil ($\cdot\text{RO}_2$), pertencentes ao grupo das ROS. Dentro do grupo das RNS há a considerar o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e o peróxido de nitrito (ONOO^-)^{1,11,12}. As reacções que envolvem radicais livres são essenciais em mecanismos de defesa como ocorre, por exemplo, com as células do sistema imune (sobretudo neutrófilos e macrófagos). Contudo, se estes radicais livres são produzidos em excesso, ou a sua eliminação se encontra comprometida, podem causar morte celular e lesão tecidual^{10,13}.

Quando no organismo humano a ingestão calórica excede o gasto energético, o substrato no ciclo do ácido cítrico aumenta e, conseqüentemente, gera-se um excesso de NADH mitocondrial (mNADH), bem como espécies reactivas ao oxigénio (ROS)¹⁴. Para se protegerem contra os efeitos nocivos das ROS, as células podem reduzir a formação destas e/ou optar pela remoção das mesmas¹⁴. A prevenção de formação das ROS é acompanhada pela incapacidade de criação de mais mNADH através da inibição do «uptake» de nutrientes estimulado pela insulina, bem como pela menor entrada de substratos energéticos (piruvato, ácidos gordos) na mitocôndria.

A entrada de substratos no ciclo de Krebs gera como produtos acetil-CoA e mNADH. A acetil-CoA, derivada tanto da glicose (via piruvato), como dos ácidos gordos

livres (via β -oxidação), combina-se com o oxaloacetato para formar citrato, o qual entra no ciclo de Krebs, sendo prontamente convertido a isocitrato. A isocitrato desidrogenase, enzima dependente do NAD^+ , gera NADH que, quando se encontra em excesso não pode ser consumido através da fosforilação oxidativa (ou outros mecanismos), pelo que o gradiente de protões aumenta e os electrões são transferidos para a molécula de O_2 , formando-se radicais livres, sobretudo o anião superóxido¹⁴⁻¹⁷ (Figura 1). Em seguida, os aniões superóxido podem ser convertidos em outros ROS e RNS.

Para contrabalançar uma superprodução de radicais livres aquando deste processo de fosforilação oxidativa, os tecidos encontram-se munidos com uma rede endógena antioxidante^{10,11,13} (Figura 2). Neste contexto é importante esclarecer a definição de antioxidante, que se refere a qualquer substância que, quando presente em pequenas concentrações comparado com as do substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse mesmo substrato¹. Estão descritos na literatura inúmeros compostos antioxidantes embora apenas alguns se encontram estudados em razoável detalhe, nomeadamente a vitamina E (RRR- α -tocoferol), a vitamina C (ascorbato), os flavonóides, o ácido α -lipóico, o glutationa (GSH) e algumas enzimas como sejam a

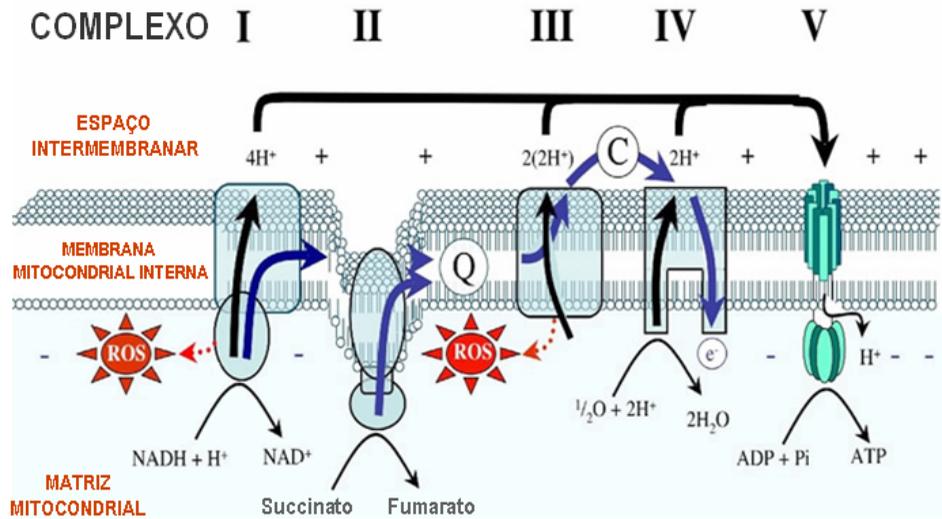


Fig. 1 – Mecanismo possível de produção aumentada de superóxidos, na cadeia mitocondrial transportadora electrões, durante o influxo celular de glicose. Este influxo contribui para uma maior síntese de acetil-CoA que, por sua vez, conduz à produção de dadores de electrões (NADH) ao nível do ciclo de Krebs. Este fenómeno aumenta o potencial de membrana ($\Delta\mu\text{H}^+$), uma vez que os protões são bombeados ao longo da membrana mitocondrial interna, na proporção do fluxo de electrões através da cadeia transportadora de electrões. A inibição do transporte de electrões no complexo III devido ao aumento do $\Delta\mu\text{H}^+$ leva a um incremento da semi-vida dos radicais livres intermediários da coenzima Q, que desta forma reduz o O_2 a $\cdot\text{O}_2^-$; ADP (Adenosina Difosfato); ATP (Adenosina Trifosfato); C (citocromo c); Complexo I, II, III, IV, V (complexos enzimáticos mitocondriais); H^+ (protão); NAD^+ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada); NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida); Q (coenzima Q); ROS (reactive oxygen species).

dismútase do superóxido (MnSOD), a catalase e a peroxidase do glutatião^{1,11}.

A rede antioxidante é habitualmente activada pela vitamina E, a qual é convertida a radical vitamina E, depois de sofrer oxidação pelos radicais livres. Este radical vitamina E reage subsequentemente com a vitamina C, numa reacção não-enzimática, pela qual se regenera a vitamina E. Por sua vez, o radical vitamina C formado pode ser reduzido a vitamina C pela acção do glutatião.

Dados recentes documentam igualmente o grande poder antioxidante do ácido α -lipóico, uma vez que apresenta um potencial redox da ordem dos -320 mV, potencial que é ainda menor que o do sistema glutatião (-280 mV), motivo pelo qual o ácido α -lipóico pode regenerar o glutatião oxidado. Além disso o ácido α -lipóico consegue induzir a síntese de glutatião, intervindo a nível dos seus precursores¹ (Figura 2).

REDE ENDÓGENA ANTIOXIDANTE

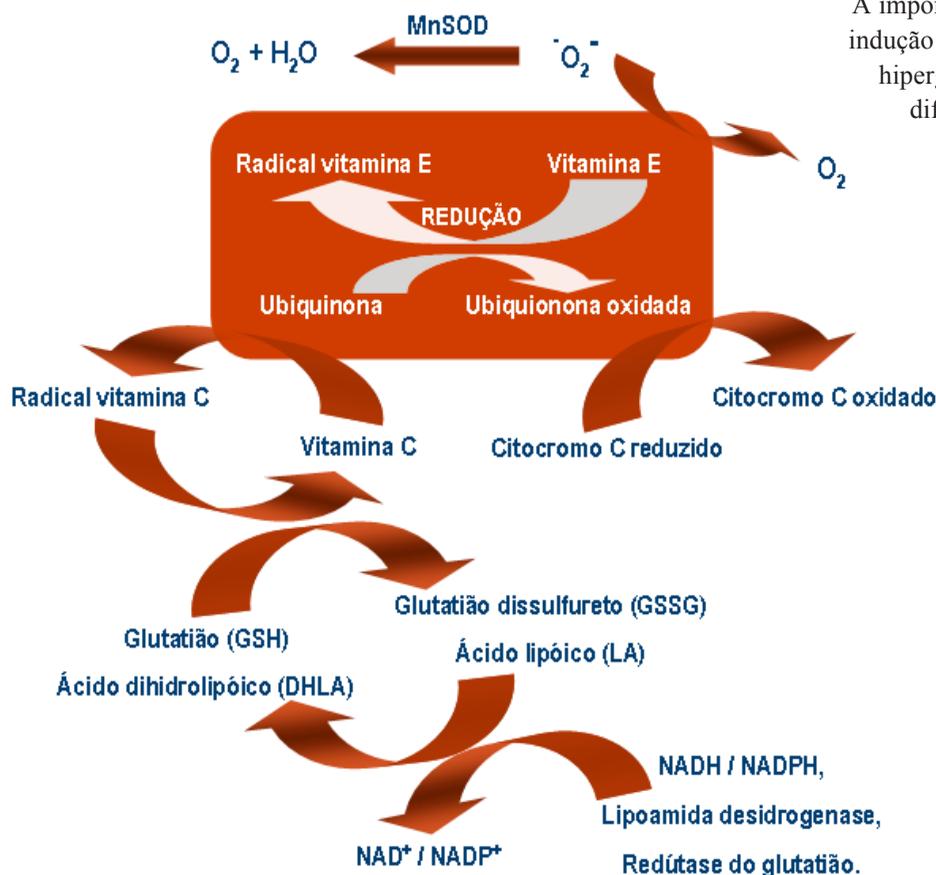


Fig.2 – Mecanismo proposto na regeneração da rede endógena antioxidante. Notar as propriedades antioxidantes do ácido α -lipóico e da dismutase do superóxido. MnSOD (Dismutase do superóxido de manganésio); NAD⁺ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada); NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida); NADP⁺ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada); NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida). Adaptado de¹.

Hiperglicemia e Cascatas de Sinalização Sensíveis ao Stress Oxidativo

Vários estudos *in vivo* revelam que o stress oxidativo, secundário à hiperglicemia (e talvez ácidos gordos livres), ocorre antes das complicações mais tardias da diabetes se manifestarem clinicamente, sugerindo que o stress oxidativo desempenha um papel particularmente relevante na patogénese desta doença^{18,19}. Uma área muito explorada tem sido a regulação de vias celulares sensíveis ao stress, que incluem o NF- κ B (factor nuclear - κ B), a p38 MAPK, as cinases Jun NH₂-terminal/cinases de proteínas activadas pelo stress (JNK/SAPK), hexosaminas, produtos finais de glicosilação avançada (AGE)/receptor para os AGE (RAGE), a proteína cinase C (PKC) e a via celular do polioli. Dados recentes demonstram que a activação destas cascatas de sinalização celular está relacionada não só com o desenvolvimento das complicações da diabetes a longo termo, bem como com a insulino-resistência e a disfunção das células β pancreáticas¹⁷.

A importância da formação de ROS na indução de dano celular induzido pela hiperglicemia tem sido apontada em diferentes estudos. Por exemplo, um estudo conduzido por Nishikawa T et al²⁰, revelou que, em células endoteliais de bovino, a exposição a um ambiente hiperglicémico levou a um aumento da produção intracelular de ROS e à activação de NF- κ B. Foram também observados níveis aumentados de AGE, de sorbitol e ainda da actividade da PKC. Estes autores desenvolveram estudos adicionais que envolveram a modulação da produção de ROS mitocondriais, usando para tal vários métodos, que incluíam: o tratamento com CCCP – carbonil m-clorofenilhidrazona (molécula desacopladora da fosforilação oxidativa), sobre-expressão de uma proteína desacopladora (UCP) e sobre-expressão da dismutase do superóxido de manganésio – MnSOD (enzima antioxidante mitocon-

drial). Cada uma destas abordagens bloqueou o aumento da produção de ROS induzido pela hiperglicemia, bem como a activação das vias subcelulares descritas (NF- κ B, AGE, PKC e sorbitol). Para além disso, os efeitos da hiperglicemia na formação de ROS e na activação do NF- κ B precederam a estimulação de outros sistemas, pelo que se pode inferir que a estimulação do NF- κ B, é o evento de sinalização celular inicial²⁰.

A extrapolação destas observações para outros tipos celulares sugere que o stress oxidativo é um processo induzido precocemente na presença de glicemia elevada, sendo seguido de activação de outras vias celulares que concorrem para o dano e disfunção celulares²¹.

• Via do NF- κ B. Alvo Inicial da Hiperglicemia

A cascata de sinalização que envolve o factor de transcrição NF- κ B é uma das vias intracelulares alvo da hiperglicemia, das ROS e do stress oxidativo mais bem estudadas. A sua activação pode ainda ser induzida por uma série de estímulos endógenos e exógenos para além dos referidos acima como por exemplo os ácidos gordos livres (FFA) em excesso, TNF- α (factor de necrose tumoral α), IL-1 β (interleucina 1 β) e outras citocinas pró-inflamatórias, AGE ligados aos RAGE, p38 MAPK, dano de DNA, infecção viral e radiação ultravioleta²².

O NF- κ B exerce uma função fulcral como intermediário das respostas imunes e inflamatórias, bem como na apoptose. Este factor nuclear é responsável pela regulação da expressão de um grande número de genes, incluindo os ligados às complicações da diabetes (como é o caso do factor de crescimento vascular endotelial – VEGF)²¹. Por sua vez, muitos dos produtos de gene regulados pelo NF- κ B activam por sua vez o próprio NF- κ B.

A activação do NF- κ B ocorre através de uma via comum que envolve tanto a indução de fosforilação da I κ B, como a sua degradação via proteassoma. Esta subunidade inibidora (I κ B) sofre fosforilação por uma cínase de serina, I κ B cínase β (IKK- β), que é depois fosforilada e activada por cínases de serina adicionais²².

• Via Celular das JNKs/SAPKs

As JNKs/SAPKs são membros de uma superfamília complexa de cínases de proteínas serina/treonina. Esta família inclui também as cínases do p38 MAP (p38 MAPKs)²¹. Estas cínases são activadas pelo stress, respondendo a uma variedade de estímulos indutores de stress, quer endógenos como exógenos, dos quais se destacam a hiperglicemia, as ROS, o stress osmótico, a radiação UV e o choque térmico.

As JNKs/SAPKs activadas ligam-se ao factor de transcrição *cJun*, fosforilando-o, sendo que este integra o *complexo factor de transcrição activador de proteínas (AP)-1*. A transactivação do *cjun* pelas JNKs/SAPKs fortalece a expressão de determinados genes com locais de reconhecimento pela AP-1, inclusivamente o próprio gene *cjun*, iniciando uma ansa de *feedback* positiva.

Estas cínases encontram-se envolvidas na apoptose, por exemplo ao nível da célula endotelial humana, sendo que o bloqueio desta via celular leva a um aumento da sobrevivência celular, efeito também conseguido recorrendo-se ao uso de certos antioxidantes, como o ascorbato (vitamina C)^{21,23}.

• Via Celular da p38 MAPK

À semelhança dos factores atrás descritos, uma série de estímulos endógenos e exógenos precede a activação desta via de sinalização intracelular. A estimulação desta cascata influencia um grande número de processos celulares envolvidos na inflamação, imunidade, crescimento celular, apoptose, respostas tecidulares específicas ao stress, através de regulação da expressão génica e pela modulação de outras vias subcelulares (como sejam as mediadas pelo NF- κ B, insulina, citocinas, araquidonato). É de realçar que a p38 MAPK regula rapidamente outras cínases de serina⁸. No caso da diabetes tipo 2, é frequente esta via celular ser activada por episódios de hiperglicemia. Begum et al²⁴ observaram que, células musculares lisas vasculares tratadas com insulina (100 nM) e glicemia elevada (25 mM) durante 12-24h, apresentavam indução da activação da via p38 MAPK²⁴.

Tendo em conta toda a informação acerca destas três vias intracelulares de sinalização, poder-se-á considerar que o NF- κ B, a JNK/SAPK e a p38 MAPK são sistemas de sinalização sensíveis ao stress que, quando apresentam características de cronicidade, podem levar às complicações mais tardias da diabetes *mellitus* tipo 2⁸. Esta é uma área merecedora de investigação, já que poderá devolver novos conhecimentos acerca da patogénese molecular da hiperglicemia, bem como identificar alvos farmacológicos para o tratamento e/ou prevenção das complicações diabéticas, a longo termo⁸.

• Via Celular da PKC

A concentração de diacilglicerol (um activador alostérico da PKC) encontra-se aumentada nos tecidos sujeitos a patologia e complicações diabéticas. Após o aumento da concentração de diacilglicerol, verifica-se que várias isoformas da PKC são rapidamente activadas, sendo a PKC- β a principal isoforma presente a nível renal, vascula-

tura e retina. Estados de hiperglicemia crónica relacionam-se com um aumento na actividade da PKC e parecem estar associados a muitos processos envolvidos na patologia diabética, incluindo permeabilidade vascular e neovascularização²⁵.

É importante referir que a activação da via da PKC, induzida pela hiperglicemia, surge associada a outras cascatas de sinalização celulares. A interacção entre esta via de sinalização e outras vias activadas pelo stress, parece desempenhar um papel fulcral na determinação dos efeitos a longo termo da hiperglicemia^{19,21}.

• Via Celular dos AGE/RAGE

Os AGE (produtos finais de glicosilação avançada), referem-se a um grupo heterogéneo de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que se formam por glicosilação não enzimática, sendo que a sua formação é estimulada na presença de hiperglicemia e stress oxidativo. Estes AGEs ligam-se a receptores específicos na membrana citoplasmática das células (RAGE), gerando intracelularmente na cascata de transdução do sinal radicais livres de oxigénio e promovendo a activação da expressão génica. Por exemplo, a expressão do VEGF na retina, um mediador da retinopatia, uma das complicações diabéticas a longo termo, está aumentado após a ligação dos AGEs aos RAGEs^{8,21}.

• Via Celular das Hexosaminas

A activação da via biossintética das hexosaminas é despoletada pelo influxo excessivo de glicose ou ácidos gordos para vários tipos de células⁸, o que leva, por sua vez, a insulino-resistência e ao desenvolvimento das complicações tardias da diabetes. De facto, foi demonstrada a activação da via das hexosaminas na presença de moléculas reactivas (ex. ROS, cuja formação fora induzida por estados hiperglicémicos)⁸.

• Via Celular do Poli-ol

Esta via é iniciada a partir do momento em que os níveis glicémicos aumentam. A hiperglicemia condiciona uma estimulação da enzima aldose redúctase, com formação subsequente de sorbitol, o qual pode ser oxidado pela sorbitol desidrogenase originando frutose. A acumulação intracelular de sorbitol é factor motivador de dano celular, já que quando acumulado é responsável pela activação da JNK/SAPK e p38 MAPK, ou seja, vias sensíveis a stress oxidativo. Assim sendo, os próprios efeitos do sorbitol são exacerbados, podendo manifestar-se sob a forma de retinopatia, nefropatia, neuropatia, bem como contribuir para o desenvolvimento de cataratas^{19,21}.

Stress Oxidativo e sua Influência nos Mecanismos de Insulino-Resistência

A insulino-resistência é um estado que se caracteriza por uma resposta glicémica abaixo do esperado tendo em conta a concentração sérica de insulina. Este termo só começou a ser utilizado em 1922, vários anos após a introdução da terapia insulínica, para descrever doentes diabéticos que necessitavam de um incremento nas doses de insulina para um melhor controlo do seu perfil glicémico²⁶.

Actualmente, a insulino-resistência é parte integrante de várias disfunções, para além da diabetes tipo 2, como sejam a hipertensão, a doença coronária, a obesidade, a gravidez. Inclusivamente, a resistência à insulina pode ser vista, à luz de novos conhecimentos, como o índice que melhor prevê o aparecimento de diabetes tipo 2²⁶. No período de instalação da diabetes, vários tecidos alvo da insulina (tecido muscular, adiposo e hepático) começam a tornar-se resistentes a esta hormona⁵.

Sabe-se hoje que, vários factores contribuem para o aparecimento da insulino-resistência, por exemplo a predisposição genética. De facto, constatou-se que esta é uma característica da descendência de pais portadores de diabetes tipo 2 e agregados familiares, tendo-se verificado, em estudos longitudinais envolvendo certas famílias, que a insulino-resistência está descrita como factor de risco para o desenvolvimento da diabetes tipo 2. No entanto, causas adquiridas também são importantes para o seu desenvolvimento, como a obesidade, a gravidez ou um estilo de vida sedentário^{2,8,26}.

Inicialmente a insulino-resistência é compensada por hiperinsulinemia, durante a qual a tolerância à glicose é preservada. A progressão para uma tolerância à glicose diminuída ocorre sempre que a resistência à insulina aumenta ou os mecanismos compensatórios de secreção insulínica se encontram reduzidos. A patofisiologia da insulino-resistência envolve uma rede complexa de vias de sinalização intracelulares. Esta cascata de sinalização oferece um número de alvos (substratos) potenciais de cínases activadas, incluindo o próprio receptor da insulina (IR) e a família das proteínas dos substratos receptores de insulina (IRS). Para os IRS -1 e -2, especificamente, um aumento na fosforilação da serina diminui a extensão de fosforilação da tirosina, sendo este aspecto consistente com a atenuação da acção insulínica. As formas fosforiladas serina/treonina das moléculas de IRS são menos capazes de se associar com o receptor da insulina e com as moléculas alvo subsequentes, nomeadamente a cínase do fosfatidilinositol 3 (PI 3-K), o que resulta numa acção insulínica diminuída, incluindo a activação da proteína cínase de tipo

B (PKB) e o transporte membranar de glicose. Além disso, as formas fosforiladas de serina-treonina são mais susceptíveis à degradação proteossômica.

Está demonstrado que o stress oxidativo está envolvido nesse processo de insulino-resistência⁵. Existe uma grande variedade de cínases sensíveis ao stress que, quando são activadas, são responsáveis pela atenuação dos efeitos da cascata de insulina, nas proteínas IRS e, por esse motivo, conclui-se que a presença de stress oxidativo, gerado das mais diversas formas (*vide supra*), está associado não só às complicações diabéticas, mas também à resistência à insulina^{5,21} (Figura 3). Em contrapartida, um ensaio experimental demonstrou *in vitro*¹³, que o uso de antioxidantes, especialmente o ácido α -lipóico, melhora a sensibilidade à insulina, já que contraria os efeitos do stress oxidativo nas vias descritas anteriormente.

Os estudos experimentais, embora forneçam uma base para os estudos clínicos, devem ser interpretados com prudência, pois os modelos experimentais de diabetes, a duração e o tipo de tratamento antioxidante, bem como os marcadores de stress oxidativo investigados, exibem uma ampla diversidade. Por conseguinte, ensaios clínicos randomizados em larga escala, com antioxidantes convencionais, falharam em demonstrar algum benefício para os doentes diabéticos¹⁰.

No actual estado da arte, parece portanto razoável fazer uma abordagem mais orientada no sentido de evitar a formação de espécies reactivas, bem como a sua eliminação, recorrendo-se ao uso de clássicos ou novos antioxidantes¹⁰.

Stress Oxidativo e sua Influência na Disfunção das Células β -Pancreáticas

A insulina é uma hormona peptídica composta por 51 aminoácidos que é sintetizada, armazenada e secretada nas células β do pâncreas²⁶. Estas células β encontram-se localizadas no seio dos ilhéus de Langerhans, grupos especializados de centenas a milhares de células endócrinas que estão anatómica e funcionalmente separadas do tecido pancreático exócrino²⁶. Elas funcionam como sensores que, em resposta a determinados estímulos glicémicos, segregam uma quantidade apropriada de insulina para o sangue. Estes estímulos são conseguidos através de vários mecanismos: GLUT2 (transportador de glicose), a glicocinase (um sensor de glicose) e o próprio metabolismo da glicose. Todavia, todo este processo, percepção de estímulo – secreção, é bastante complexo e envolve uma série de acontecimentos, tendo o metabolismo mitocondrial da glicose um papel crucial, já que funciona como um elo de ligação entre aqueles dois fenómenos^{8,26}.

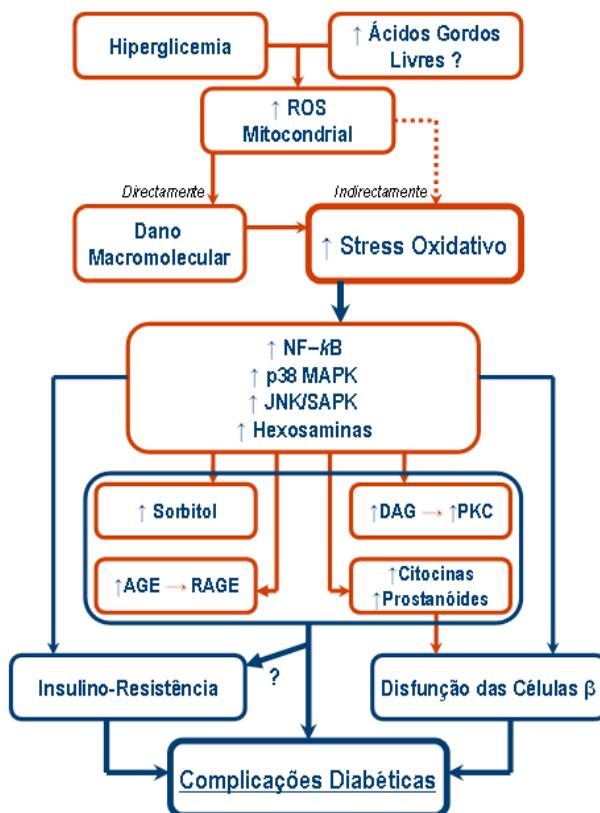


Fig. 3 – Teoria geral proposta de como a hiperglicemia e os ácidos gordos livres elevados (FFA) resultam na fisiopatologia da diabetes através da formação de ROS e na activação de numerosas vias celulares sensíveis ao stress. As ROS (e RNS), através do dano molecular que infligem, podem desempenhar um papel directo na patogénese da diabetes. As ROS também funcionam como moléculas sinalizadoras (análogas a segundos mensageiros), para activarem várias vias celulares sensíveis ao stress, (papel indirecto). Além disso, na diabetes tipo 2, existe uma evidência crescente de que vias sensíveis ao stress como o NF- κ B, o p38MAPK, e JNK/SAPK, pelo aumento na concentração da glicose e possivelmente nos níveis de FFA, leva a um estado de insulino-resistência, bem como secreção de insulina reduzida. Assim as ROS e o stress oxidativo, induzidos pela hiperglicemia e níveis de ácidos gordos aumentados, podem desempenhar um papel importante na activação de cascatas de sinalização intracelular sensíveis ao stress oxidativo. Esta sequência proposta pode incluir outras vias celulares de sinalização sensíveis ao stress, como por exemplo: produção elevada de AGE, sorbitol, citocinas e prostanóides, bem como a activação da proteína cinase de tipo C (PKC). Adaptado de².

Como já foi sendo referido ao longo deste artigo, é na mitocôndria que se formam radicais livres responsáveis pelo processo oxidativo (Figura 1), mas este organelo celular acaba por ser também um alvo fácil dessas mesmas moléculas altamente reactivas, pelo que, a capacidade das ROS e RNS causarem lesão mitocondrial e subsequentemente atenuarem a secreção de insulina ao nível das células β , não será de admirar⁵. Lenzen et al²⁷ constataram igualmente que os níveis de expressão das enzimas antioxi-

dantes como a catalase e o glutationo (GSH), eram muito baixos nas células β do pâncreas, comparativamente com os dos outros tecidos, confirmando que estas células são facilmente afectadas por um ambiente oxidativo nocivo, conferido pela presença de radicais livres²⁷. Por conseguinte, a hipótese de que os fenómenos de stress oxidativo estão relacionados com a deterioração progressiva das células β do pâncreas parece ganhar força. Vários estudos^{1,5,8,16,21} referem que a disfunção β -pancreática, resulta essencialmente de três factores:

- 1) Exposição crónica à hiperglicemia.
- 2) Exposição crónica a níveis elevados de ácidos gordos livres
- 3) Exposição a uma combinação de ambos os efeitos referidos em 1) e 2).

Nos doentes portadores de diabetes tipo 2, a hiperglicemia crónica parece ser uma das principais causas de dano celular β , aliada a uma activação de mecanismos de stress oxidativo, nomeadamente a via do NF- κ B, havendo actualmente dados científicos que apontam para a capacidade pró-apoptótica desta cascata de sinalização intracelular nas células produtoras de insulina^{21,28}. Por estes motivos, não será de estranhar que informação recente sugira a utilidade potencial do uso de antioxidantes na prevenção desta disfunção pancreática (Figura 3).

Potencialidades do Ácido Acetilsalicílico no Tratamento da Diabetes Mellitus Tipo 2

O ácido acetilsalicílico parece ser responsável, pelo menos em parte, por uma atenuação dos mecanismos de insulino-resistência e formação de radicais livres. Estudos recentes envolvem a activação, dependente de ácidos gordos, da cinase da serina IKK- β (a qual desempenha um papel chave na inflamação dos tecidos), na patogénese da insulino-resistência. Demonstrou-se recentemente que altas doses de salicilatos inibem a actividade da IKK- β , podendo assim melhorar a resistência à insulina e aumentar a tolerância à glicose em doentes portadores de diabetes tipo 2^{29,30}. Hundal et al²⁹ verificaram, num ensaio realizado com doentes diabéticos tipo 2 que, quando submetidos a tratamento com doses elevadas de ácido acetilsalicílico (na ordem dos 7g/dia, durante duas semanas), observavam uma melhoria tanto da glicemia em jejum como pós-prandial, um efeito que poderá ser atribuído a um decréscimo nas taxas basais de produção de glicose hepática, a um incremento da sensibilidade à insulina periférica e a uma redução do *clearance* da insulina. Contudo, tendo em vista a toxicidade potencial associada com doses elevadas deste fármaco, estes investigadores revelam-se contra a sua prescrição para o tratamento da diabetes tipo 2²⁹.

Estudos na mesma área sugerem igualmente que o ácido acetilsalicílico pode ser responsável pela inibição da absorção intestinal de glicose, o que pode de certa forma limitar o estímulo de formação de ROS, traduzindo-se numa atenuação dos efeitos oxidativos³⁰.

Através desta informação emergente, os investigadores poderão no futuro desenhar novas armas terapêuticas para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2.

CONCLUSÕES

Perspectivas Futuras

As moléculas reactivas desempenham um papel fundamental como segundos mensageiros intracelulares. Contudo, quando as suas concentrações excedem a capacidade de eliminação, através da rede antioxidante endógena, verifica-se um estado de stress oxidativo. A literatura científica revela-nos actualmente que a formação de radicais livres (ROS, RNS e RCS), é um factor importante no início e no desenvolvimento da diabetes e suas complicações. Investigação realizada nos últimos anos sugere que o stress oxidativo funciona como um elo de ligação entre um estado hiperglicémico e as características patofisiológicas típicas associadas ao início e à progressão das complicações mais tardias da diabetes tipo 2. Desta forma, verifica-se, numa multiplicidade de tecidos, que uma glicemia elevada e ácidos gordos livres em excesso, resultam na formação de espécies ROS e RNS, os quais criam um ambiente oxidativo. Na ausência de respostas compensatórias apropriadas da rede antioxidante endógena, gera-se um desequilíbrio redox, que se traduz numa activação de cascatas celulares sensíveis ao stress, como por exemplo as vias envolvendo o NF- κ B, JNK/SAPK, p38 MAPK, AGE, RAGE, PKC, poliols. A activação destas vias celulares tem como consequência a formação de *produtos de genes*, que causam lesão celular, sendo em última instância as responsáveis pelas complicações diabéticas a longo termo. É de destacar que a activação destas cascatas de sinalização, ou semelhantes, parece interferir na resistência à insulina e na secreção desta mesma hormona, tendo assim um efeito directo na função das células β do pâncreas.

Desta forma, o uso de antioxidantes pode revelar-se relevante no que concerne à prevenção da activação destas vias de sinalização. Além disso, a identificação da base molecular para a protecção conferida por uma variedade de antioxidantes, contra o dano oxidativo, poderá levar à descoberta de alvos farmacológicos para novas terapias permitindo a prevenção, reversão ou atraso do início desta patologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de reconhecer a gentileza e disponibilidade de Joseph Evans, do Medical Research Institute, da Universidade da Califórnia (EUA), pela cedência de material de grande relevância para este trabalho.

ABREVIATURAS

Todas estas abreviaturas referem-se a palavras de origem inglesa, pelo que não corresponderão à respectiva tradução portuguesa, ao longo do texto.

AGE, advanced glycosilation end-products; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine; CoA, coenzyme A; DHLA, dihidrolipoic acid; FFA, free fatty acids; GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide; IKK, I κ B kinase; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; JNK/SAPK, c-Jun N-terminal kinases/stress activated protein kinases; LA, lipoic acid; MnSOD, manganese superoxide dismutase; NF- κ B, Nuclear factor- κ B; PKB/PKC, protein kinase B/C; RAGE, receptor for AGE; RCS/RNS/ROS, reactive chlorine/nitrogen/oxygen species; UCP, uncoupling protein; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

BIBLIOGRAFIA

1. RÖSEN P, NAWROTH PP, KING G, MÖLLER W, TRITSCHLER HJ, PACKER L: The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2001;17:189-212
2. KAHN CR, VICENT D, DORIA A: Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1996;47:509-531
3. POITOUT V, ROBERTSON RP: Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002;143:339-42
4. WEIR, GC, LAYBUTT, DR, KANETO, H, BONNER-WEIR, S, SHARMA, A: Cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 2001;50:154-9
5. KANETO, H, NAKATANI Y, KAWAMORI D et al: Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. *Intl J Biochemistry Cell Biol* 2005;37:1595-1608
6. UNGER RH: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity dependent NIDDM: Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995;44:863-870
7. BROWNLEE M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-820
8. EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM: Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52:1-8
9. HALLIWELL B, CROSS CE, GUTTERIDGE JMC: Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620
10. JOHANSEN JS, HARRIS AK, RYCHLY DJ, ERGUL A: Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005;4:5
11. VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSNER J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84
12. HALLIWELL B: Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1341-8
13. HALLIWELL B: Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr.* 1996;16:33-50
14. MADDUX BA, SEE W, LAWRENCE JC JR., GOLDFINE AL, GOLDFINE ID, EVANS JL: Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of α -lipoic acid. *Diabetes* 2001;50:404-410
15. MAECHLER P, JORNOT L, WOLHEIM CB: Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 1999;274:27905-13
16. BERG J, TYMOCZKO J, STRYER L: Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004;443-546
17. CERIELLO A, MOTZ E: Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-823
18. GIUGLIANO D, CERIELLO A, PAOLISSO G: Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 1995;44:363-8
19. HAMILTON SJ, CHEW GT, WATTS GF: Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4:89-102
20. NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL et al: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-790
21. EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM: Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 2002;23:599-622
22. BARNES PJ, KARIN M: Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71
23. HO FM, LIU SH, LIAU CS, HUANG PJ, LIN-SHIAU SY: High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 2000;101:2618-24
24. BEGUM N, RAGOLIA L: High glucose and insulin inhibit VSMC MKP-1 expression by blocking iNOS via p38 MAPK activation. *Am J Physiol* 2000;278:81-91
25. KOYA D, KING GL: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47:859-866

26. KAHN CR: Banting Lecture: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 1994;43:1066
27. LENZEN S, DRINKGERN J, TIEDGE M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Rad Biol Med.* 1996;20:463-6
28. CARDOZO AK, HEIMBERG H, HEREMANS Y et al: A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor- κ B-dependent genes in primary rat pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 2001;276:48879-86
29. HUNDAL RS, PETERSEN KF, MAYERSON AB et al: Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:1321-6
30. QUILLEY J: Insulin resistance, oxidative stress and aspirin: therapeutic implications? *J Hypertens* 2002;20:1279-81