



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS

LIANA CONRADO FRANÇA

**AVALIAÇÃO DO *CLEARANCE* E DA SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM  
CAMUNDONGOS DM1 TRATADOS OU NÃO COM INSULINA NPH OU PELLET  
DE LIBERAÇÃO CONSTANTE DE INSULINA.**

Florianópolis

2021

LIANA CONRADO FRANÇA

**AVALIAÇÃO DO *CLEARANCE* E DA SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM  
CAMUNDONGOS DM1 TRATADOS OU NÃO COM INSULINA NPH OU PELLET  
DE LIBERAÇÃO CONSTANTE DE INSULINA.**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

França, Liana Conrado

Avaliação do clearance e da sinalização de insulina em camundongos DM1 tratados ou não com insulina NPH ou pellet de liberação constante de insulina / Liana Conrado França ; orientador, Gustavo Jorge dos Santos, 2021.

76 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. IDE, Diabetes Mellitus tipo1, Clearance de insulina. I. Santos, Gustavo Jorge dos.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

LIANA CONRADO FRANÇA

**Título: Avaliação do *clearance* e da sinalização de insulina em camundongos DM1 tratados ou não com insulina NPH ou *Pellet* de liberação constante de insulina.**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e **aprovado** por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>ª</sup> Dra Mirian Ayumi Kurauti (membro titular)  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Alex Rafacho (membro titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup> Dra Renata Maria Lataro (membro suplente)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Fernanda Barbosa Lima

Coordenação do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Gustavo Jorge dos Santos  
Orientador

Florianópolis, 14 de junho de 2021

Dedico este trabalho a duas grandes mulheres  
que sempre se fizeram presentes na minha vida:  
Minha mãe Elizabete e minha avó Anita (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família, em especial a minha mãe Elizabete. Minha grande fonte de inspiração! Obrigada por todo o incentivo e por me ensinar que sempre devemos trabalhar em prol do nosso melhor, seja no aspecto pessoal, seja naquilo que fazemos. Ao meu pai José Carlos que ao seu modo, sempre dizia que tudo ficaria bem. Às minhas irmãs Naíla e Ilana, que mesmo estando longe fisicamente se fazem sempre presentes na minha vida.

Ao meu orientador Dr. Gustavo Jorge dos Santos por toda a confiança, disponibilidade e pelos ensinamentos que permitiram a concretização deste trabalho. Posso dizer que aprendi muito com você como pessoa também.

À amiga Luciana Santos Costa Vieira da Silva por todas as contribuições, atenção, paciência e também agradeço pelas inúmeras, longas e produtivas conversas.

A todos os colegas do Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDOC).

Agradeço aos colegas Robsom, Francieli, Priscila e também à Cristiane por todas as contribuições nos experimentos.

Às colegas que entraram no mestrado junto comigo: Thaís, Tamires e Sara pelas conversas e contribuições ao longo desse processo.

Às amigas e colegas de trabalho que sempre se disponibilizaram a me ajudar: Camila e Michelle.

Ao Hospital Universitário HU/UFSC pela permissão em realizar algumas dosagens dessa pesquisa e à bioquímica Patrícia Casas pela disponibilidade e pelo auxílio nas dosagens.

Além disso, agradeço a todas as pessoas que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, caracterizada por um quadro de hiperglicemia crônica com destruição das células  $\beta$  secretoras de insulina que culmina em deficiência praticamente total desse hormônio. A insulina liberada fisiologicamente exerce sua ação entre 4-6 minutos e é depurada majoritariamente pelo fígado com a participação da IDE (do inglês *Insulin Degrading Enzyme*). Sabe-se que pacientes com DM1 precisam fazer reposição de insulina exógena por toda a vida e que, com o passar do tempo da instauração da doença, há necessidade de aumento na dose para se manter a normoglicemia. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações causadas em animais diabéticos tipo 1 submetidos ou não ao tratamento com insulina no *clearance* de insulina, sensibilidade à insulina, além de possíveis alterações nas funções metabólicas e/ou dano hepático após um período de 30 dias. Para isso foram utilizados camundongos machos *Swiss* de 50-60 dias, sendo os animais diabéticos tipo 1 gerados pela aplicação de 5 doses por 5 dias consecutivos de 50mg/kg de Estreptozotocina pela via intraperitoneal (IP). Os grupos foram assim divididos: saudáveis (CTL), diabéticos sem tratamento (DM), diabéticos tratados com insulina NHP pela via intraperitoneal (DM<sub>NHP</sub>) e um grupo diabético com implante subcutâneo (SC) de insulina (DM<sub>PELLET</sub>). Semanalmente, foram verificados o peso corpóreo e a glicemia sanguínea. Após um período de 30 dias foi avaliada a tolerância ao piruvato, sensibilidade à insulina, *clearance* de insulina, atividade da IDE, expressão proteica de IDE e CEACAM1 hepáticos além de AKT fosforilada hepática e muscular, concentração plasmática de colesterol (total e frações) e transaminases hepáticas, bem como o peso relativo dos órgãos. Foi observado que somente os animais DM apresentaram uma perda de peso corporal com perda da massa do tecido adiposo perigonadal, hiperglicemia persistente, redução no *clearance* de insulina que foi acompanhada por uma diminuição na expressão proteica e atividade da IDE, quadro de RI hepático e periférico, atenuação da sinalização da insulina via AKT, dislipidemia, danos hepático, bem como prováveis dano renal e pancreático. O tratamento com a insulina NPH ou com o pellet de infusão contínua de insulina foi capaz de reverter a maior parte desses desfechos deletérios. Esses resultados afirmam a relevância de um bom controle glicêmico no tratamento da hiperglicemia característica do Diabetes *Mellitus* tipo 1.

**Palavras-chave:** IDE, Insulina, Diabetes *Mellitus* tipo 1, *Clearance* de Insulina.

## ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) is an autoimmune disease characterized by chronic hyperglycemia with destruction of insulin-secreting  $\beta$  cells, which culminates in an almost total deficiency of this hormone. Physiologically, the released insulin exerts its action within 4-6 minutes and is mostly cleared by the liver with the participation of IDE (Insulin Degrading Enzyme). It is known that DM1 patients need to undergo exogenous insulin replacement for life and that, as the disease starts, there is a need to increase the dose to maintain normoglycemia. Thus, the aim of this study was to investigate the changes caused in type 1 diabetic animals submitted or not to insulin treatment in insulin clearance, insulin sensitivity, in addition to possible changes in metabolic functions and/or liver damage after a period of 30 days. For this, male Swiss mice aged 50-60 days were used, and type 1 diabetic animals were generated by the administration of 5 doses for 5 consecutive days of 50mg/kg of Streptozotocin via the intraperitoneal (IP) route. The groups were divided as follows: control (CTL), untreated diabetics (DM), diabetics treated with insulin NHP intraperitoneally (DMNHP) and a diabetic group with subcutaneous implant (SC) of insulin (DMPELLET). Weekly, body weight and blood glucose were checked. After a period of 30 days, tolerance to pyruvate, insulin sensitivity, insulin clearance, IDE activity, protein expression of hepatic IDE and CEACAM1 in addition to hepatic and muscular phosphorylated AKT, plasma cholesterol concentration (total and fractions) and liver transaminases, as well as the relative weight of the organs. It was observed that only the DM animals showed a loss of body weight with loss of the dangernadal adipose tissue mass, persistent hyperglycemia, reduction in insulin clearance which was accompanied by a decrease in protein expression and IDE activity, hepatic and peripheral IR, attenuation of insulin signaling via AKT, dyslipidemia, liver damage, as well as probable renal and pancreatic damage. Treatment with NPH insulin or with the continuous insulin infusion pellet was able to reverse most of these deleterious outcomes. These results affirm the relevance of good glycaemic control in the treatment of the hyperglycemia characteristic of type 1 Diabetes Mellitus.

**Keywords:** IDE, Insulin, Type 1 Diabetes Mellitus, Insulin Clearance.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização da insulina .....	23
Figura 2 – Degradação da Insulina no hepatócito com a participação da CEACAM1 .....	26
Figura 3 – Modelo de Eisenbarth da história natural do Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1 .....	29
Figura 4 – Delineamento Experimental .....	40
Figura 5 – Avaliação do peso e da glicemia .....	45
Figura 6 – Glicemia durante o ipPTT e ipITT .....	47
Figura 7 – Insulina plasmática durante o ipITT e atividade cinética da IDE .....	48
Figura 8 – Conteúdo proteico hepático de IDE e CEACAM.....	49
Figura 9 – Expressão proteica de AKT fosforilada no fígado e no músculo .....	50
Figura 10 – Concentração plasmática de Colesterol Total (e frações), ALT e AST .....	51
Figura 11 – Massa relativa dos órgãos dos animais.....	52

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Modelos experimentais de DM1 .....	36
Quadro 2 – Anticorpos primário utilizados na técnica de <i>Western Blott</i> .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para diagnóstico de Diabetes <i>Mellitus</i> e sintomas clínicos do DM1 ....	31
Tabela 2 – Tipos de Insulina disponíveis no Brasil .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FAM : 5-Carboxyfluorescein

aa – Aminoácidos

ADA - Associação Americana de Diabetes

ADH – Hormônio antidiurético

ADP – Difosfato de adenosina

AGL - Ácidos graxos livres

Akt - Proteína cinase B

ALT - Alanina aminotransferase

ALX - Aloxana

AST - Aspartato aminotransferase

ATP – Trifosfato de adenosina

AUC - Do inglês *area under the curve*

Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio

CEACAM1 - Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

ChREBP - Proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos / Carbohydrate-response element-binding protein

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CTL - Grupo Controle

DM – Diabetes *Mellitus*

DM1 – Diabetes *Mellitus* do Tipo 1

DM2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EPM - Erro padrão da média

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FASN - Enzima ácido graxo sintase

FOXO1 – Do inglês *Forkhead box protein O1*

GAD65 - Ácido glutâmico

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase/ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GLUT-2 – Transportador de glicose tipo 2  
GLUT4 - Transportador de glicose tipo 4  
GS3-K - Enzima glicogênio sintase quinase 3  
HbA1c – Hemoglobina glicada  
HDL - Lipoproteína de alta densidade  
HE – Corante Hematoxilina e Eosina  
HLA –DQ e HLA-DR - Genes HLA classe II  
HSL - Enzima lipase sensível ao homônio  
IA-2- Proteína semelhante à tirosina fosfatase  
IAA - Proteína semelhante a insulina  
IDE – do inglês *Insulin-degrading enzyme*  
IDE-KO - Animais Knockout para a enzima IDE  
IDF - International Federation Diabetes  
IFN-  $\gamma$  – Interferon gama  
I-IR - Complexo Insulina-Receptor de insulina  
I-IR-CEACAM1 – Complexo com o receptor de insulina e com a CEACAM1  
IL-1 – Interleucina 1  
IL-6 – Interleucina 6  
Insulina NPH - do inglês *Neutral Protamine Hagedorn*  
IP - Intraperitoneal  
ipITT - Teste intraperitoneal de tolerância à insulina  
ipPTT – Teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato  
IR - Receptor de insulina  
IRS - Substratos dos receptores de insulina  
JNK- Do termo inglês *c-Jun N-terminal kinases*  
K<sup>+</sup> - Íon potássio  
K<sub>ITT</sub> - Taxa de constante de decaimento da glicose  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
L-IDE-KO - camundongos Knocout para IDE no fígado  
mRNA – RNA mensageiro  
NF $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B  
NOD - Camundongos diabéticos não obesos

p-Akt- Akt fosforilada

PBS - Tampão fosfato / (Phosphate Buffered Saline)

PEPCK - Fosfoenolpirvato carboxilase

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC - Proteína quinase C

RI – Resistência à insulina

SC - Subcutâneo

SHP-1 e SHP- 2 - Tirosinas fosfatases

SIC I - Sistema de bomba de infusão contínua de insulina

Src-quinase – Proteína tirosina-quinase

SREBP1c – Proteína ligada ao elemento regulador de esteroides 1 / *Sterol regulatory element binding proteins*

STZ - Estreptozotocina

SUS - Sistema Único de Saúde

TMB - Substrato 3,3',5,5', tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

Tyr 488 – Resíduo tirosina 488

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

ZnT8- Transportador de zinco 8

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>20</b>
2.1 INSULINA, VIAS DE SINALIZAÇÃO E <i>CLEARANCE</i> DE INSULINA .....	20
2.1.1 INSULINA.....	20
2.1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA.....	21
2.1.3 <i>CLEARANCE</i> DE INSULINA.....	24
2.2 DIABETES <i>MELLITUS</i> , DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO DM1 .....	27
2.2.1 DIABETES <i>MELLITUS</i> .....	27
2.2.2 DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1 .....	28
2.2.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO DM1 .....	31
2.3 DIABETES <i>MELLITUS</i> , <i>CLEARANCE</i> E RESISTÊNCIA À INSULINA .....	33
2.4 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 ANIMAIS.....	39
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	39
4.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA .....	41
4.4 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (IPPTT).....	41
4.5 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA (IPITT).....	41
4.6 <i>CLEARANCE</i> DE INSULINA <i>IN VIVO</i> .....	41
4.7 DOSAGEM DE INSULINA.....	41
4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA IDE .....	42

4.9 COLETA DE TECIDOS.....	42
4.10 <i>WESTERN BLOT</i> .....	43
4.11 PERFIL LIPÍDICO E ENZIMAS HEPÁTICAS - ALANINA AMINO TRANSFERASE (ALT) E ASPARTATO AMINO TRANSFERASE (AST). .....	43
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA E GLICEMIA.....	45
5.2 TOLERÂNCIA AO PIRUVATO E TOLERÂNCIA À INSULINA .....	46
5.3 <i>CLEARANCE</i> DE INSULINA E ATIVIDADE DA IDE .....	48
5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA IDE E DA CEACAM EM FRAGMENTO HEPÁTICO.....	49
5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE AKT FOSFORILADA.....	49
5.6 AVALIAÇÃO DAS TRANSAMINASES HEPÁTICAS E COLESTEROL (TOTAL E FRAÇÕES). .....	50
5.7 AVALIAÇÃO DA MASSA RELATIVA DOS ÓRGÃOS.....	41
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 01 – CERTIFICADO CEUA .....</b>	<b>76</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença de etiologia múltipla, autoimune, que resulta em um quadro de hiperglicemia crônica decorrente da perda específica da massa funcional de células  $\beta$  pancreáticas (BACH, 1994; NORRIS; JOHNSON; STENE, 2020; WASHBURN et al., 2021).

As células  $\beta$  fazem parte de microórgãos endócrinos altamente vascularizado e localizado no pâncreas, denominado ilhotas de Langerhans. Essas células são responsáveis por secretar a insulina, um hormônio essencial que atua na homeostase glicêmica (DA SILVA XAVIER, 2018; RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2018). No entanto, enquanto o organismo das pessoas saudáveis consegue manter seus valores glicêmicos sob estreitas faixas de variações, essa regulação apresenta-se prejudicada em pacientes portadores de DM1 (HWANG et al., 2019). Como esses pacientes praticamente não produzem esse crucial agente hipoglicemiante, necessitam verificar e monitorar frequentemente sua glicemia e fazer o uso de injeções de insulina exógena para a reposição hormonal (GIRARDIN et al., 2009). Por tratar-se de uma doença crônica, esse tratamento segue por toda a vida do paciente (PALERM et al., 2008).

Desde a descoberta da insulina em 1921, foram desenvolvidas e disponibilizadas no mercado inúmeras apresentações farmacológicas de diferentes tempos e picos de ação dessa substância que, além de hormônio endógeno, também é considerado um medicamento. Um dos fármacos mais utilizados e disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é a insulina protamina neutra de Hagedorn (do inglês *Neutral Protamine Hagedorn*), ou simplesmente insulina NPH. Por conter o zinco e a protamina na sua composição, esse tipo de apresentação forma depósitos cristalinos que retardam a disponibilidade do fármaco para a corrente sanguínea (DIAS, DOS SANTOS, OSORIO-DE-CASTRO, 2020).

Uma alternativa à injeção da insulina NPH, mas não disponível regularmente para os pacientes do SUS, é o sistema de bomba de infusão contínua de insulina (SICI) (SDB, 2019). Nesse tipo de dispositivo, é armazenada insulina de ação rápida e o paciente pode programar o equipamento para uma liberação basal e uma liberação sob demanda após as refeições, de acordo com sua necessidade para o controle glicêmico (PETTUS et al., 2016).

Quando o tratamento é realizado com a insulina NPH, a velocidade da absorção e o pico de ação variam muito entre os pacientes ( HEISE et al., 2004; HEISE; PIEBER, 2007). Essas flutuações sujeitam os indivíduos a apresentarem mais quadros hipoglicêmicos e

hiperglicêmicos quando comparados ao tratamento com o SICI (WEISSBERG-BENCHELL, ANTISDEL-LOMAGLIO, SESHADRI, 2021). Levando esse aspecto em consideração, pode ser que o organismo responda de forma a aumentar a depuração da insulina NPH em comparação à insulina liberada pelo pellet, pois a insulina NPH é absorvida de forma variável e promove picos de concentrações de insulina na corrente sanguínea que não ocorre quando o tratamento é realizado por meio da bomba de infusão constante de insulina. Além disso, nesse ponto vale aqui contextualizar que o paciente, ao longo do curso da doença, necessita aumentar o quantitativo de unidades da insulina no seu tratamento para a manutenção da euglicemia (LINN et al, 1996; HIRSCH, 1999; KHALANGOT et al., 2009).

A insulina secretada fisiologicamente exerce sua ação e possui um tempo de meia-vida na circulação de cerca de 4-6 minutos, sofrendo de 50-80 % de depuração quando atinge o fígado na primeira passagem via circulação portal (POLONSKY, K. S., 1988; DUCKWORTH; BENNETT; HAMEL, 1998; BERGMAN et al., 2019). Portanto, cabe questionar se esse *clearance* da insulina exógena nos pacientes DM1 pode estar alterado, uma vez que esses pacientes, como dito anteriormente, necessitam aumentar a sua dose de insulina ao longo dos anos de tratamento (YKI-JÄRVINEN; KOIVISTO, 1986).

A quantidade de insulina plasmática é o resultado da taxa de insulina liberada menos a taxa de depuração. E, para que ocorra a depuração da insulina, basicamente e de forma simplificada, os seguintes passos são necessários: (1) ligação da insulina ao receptor de insulina, (2) ligação desse complexo à glicoproteína transmembrana CEACAM1, (3) internalização desse complexo Insulina-Receptor-CEACAM1 e, direcionamento desse complexo aos endossomos para ocorrer a degradação da insulina com a participação de uma enzima conhecida como IDE (do inglês “*Insulin degrading enzyme*”). Essa zinco metaloproteinase não é exclusiva em degradar a insulina, mas esse peptídeo representa o seu principal substrato (DUCKWORTH, 1988; VILLA-PÉREZ et al., 2018).

Estudos com camundongos com deleção total para IDE e CEACAM1 demonstraram que os animais exibiam um quadro inicial de hiperinsulinemia. Nesse sentido, podemos considerar que alterações nos atores que participam da depuração da insulina, podem interferir no resultado final da insulinemia (ABDUL-HAY et al., 2011; DEANGELIS et al., 2008).

Quanto ao receptor de insulina, a situação pode ainda estar relacionado a uma menor resposta do organismo frente a certa quantidade de hormônio, quadro conhecido como

resistência à insulina (RI) (ADA, 1997). Entretanto, apesar de contra-intuito pensar que os indivíduos com o DM1 possam apresentar esse quadro de RI, uma vez que esses indivíduos praticamente não disponibilizam insulina ao organismo de maneira endógena, esses pacientes repõem esse hormônio com terapia farmacológica (CHIANG et al., 2014).

Diante do exposto, o questionamento que impulsionou a realização deste trabalho consiste na ideia de que os pacientes DM1 precisam aumentar a dose de insulina ao longo do curso do seu tratamento. Seria então esse aumento da demanda de insulina um resultado de atenuação da resposta à insulina (Resistência à Insulina), ou até mesmo poderia ser em decorrência de uma maior depuração hormonal com a participação da enzima IDE e da glicoproteína CEACAM1? E, há diferença nesses aspectos quando o tratamento é realizado com a insulina NPH ou com o pellet de infusão contínua de insulina?

Frente a todo este enredo, o presente trabalho é justificado portanto, pautando-se na questão que o DM1 é uma patologia crônica que acomete um número cada vez maior de indivíduos em todo o mundo (IDF, 2019), que está associada a altas taxas de mortalidade e morbidade e que, além disso, a resistência à insulina no DM1 tem sido proposta como um potencial e possível alvo de intervenção junto com a terapia com insulina para se alcançar um bom controle glicêmico (PRIYA, KALRA, 2018). Ademais, a ausência de informações referente ao *clearance* de insulina no DM1 também abrem margem para que o tema possa ser explorado para se alcançar uma melhor compreensão.

Assim, baseado no fato que (a) a IDE hepática é a principal via de degradação da insulina, (b) que a expressão/atividade da IDE pode sofrer variações que vão impactar no resultado da insulinemia, (c) que pode haver diferença na resposta da depuração da insulina quando o organismo é submetido a picos e flutuações na insulinemia e, (d) a RI pode se desenvolver no DM1, hipotetizamos que a hiperglicemia dos animais diabéticos sem tratamento pode diminuir a depuração da insulina e levar a uma RI. Além disso, acreditamos que o tratamento com a insulina NPH nos animais DM1 induzirá um aumento na expressão/atividade da IDE hepática, podendo ainda promover alterações na expressão da glicoproteína CEACAM1 hepática em comparação com animais saudáveis e com animais DM1 com infusão constante de insulina (pellet de insulina). Acreditamos também que, a insulina NPH, aumentando o *clearance* de insulina, promoverá o aumento da necessidade diária de insulina, induzindo a RI nesses animais.

## 2 ESTADO DA ARTE

### 2.1 INSULINA, VIAS DE SINALIZAÇÃO E *CLEARANCE* DE INSULINA

#### 2.1.1 Insulina

A concretização de um trabalho científico que culmina na identificação de uma nova substância geralmente abrange um processo que tem início muitos anos antes. Ocorre como resultado de observações e em decorrência do conhecimento adquirido em publicações prévias, envolvendo também a colaboração entre diversos pesquisadores.

Os indícios de que havia uma substância produzida no pâncreas que desempenhava um papel crucial nos valores glicêmicos surgiram com as observações dos médicos alemães Joseph von Mering e Oskar Minkowski em 1889. Em seus experimentos, eles removeram o pâncreas de um cachorro e perceberam que o animal desenvolvia diabetes e evoluía a óbito. Em 1910, Edward Albert Sharpey-Schafer nomeou essa substância de insulina, palavra de origem latina “*insula*” que significa ilha, fazendo menção às Ilhotas pancreáticas (Revisado por POLONSKY, 2012).

Pouco tempo depois, em 1921, foi a vez dos cientistas Frederick G. Banting, Charles H. Best, James Collip e John J. R. Macleod ocuparem um papel de destaque no cenário científico. A descoberta da insulina completa esse ano (2021) seu centenário e foi atribuída a esses estudiosos, rendendo-lhes o prêmio Nobel em 1923. A grande relevância nesse marco histórico foi que esse fato revolucionou a terapia do DM1, além de promover uma mudança no *status* da doença, passando de fatal para uma doença crônica, possibilitando assim um novo desfecho com maior sobrevida aos pacientes. Esses cientistas conseguiram diminuir os níveis glicêmicos de um paciente diabético administrando uma substância purificada do pâncreas bovino, a insulina (BANTING et al., 1922; ROSENFELD, 2002).

A insulina é um hormônio peptídico anabólico, composto por 2 cadeias peptídicas (A e B) unidas por duas pontes de sulfeto, que contém 51 aminoácidos (aa). O produto da transcrição do gene da insulina é um mRNA que é traduzido no retículo endoplasmático rugoso em um pré-pro-hormônio: a pré-pro-insulina. Após ser transportada ao complexo de Golgi, esse precursor sofre uma clivagem e remoção da sequência sinal da cadeia, passando a se chamar pró-insulina com 86 aa. Este último intermediário sofre uma última clivagem proteolítica para a retirada da cadeia C que a diferencia da insulina. Após essa etapa temos então a formação da insulina e do peptídeo C, os quais são armazenados em grânulos nas

células  $\beta$ . O peptídeo C é secretado em quantidades equimolares à insulina e apesar de não possuir uma função fisiológica conhecida até o momento, sua dosagem pode ser utilizada para estimar a secreção endógena de insulina (Revisado por FU; GILBERT; LIU, 2013).

A secreção de insulina pode sofrer estímulo de vários substratos energéticos, porém a glicose é seu segretagogo mais relevante. Quando ocorre elevação da glicemia (p.ex. após uma refeição), a glicose é transportada ao interior das células  $\beta$  pancreáticas por meio do transportador GLUT-2 (em roedores), uma proteína integral de membrana. Uma vez dentro da célula, a glicose sofre ação da enzima glicocinase e é fosforilada à glicose-6-fosfato, seguindo preferencialmente a via da glicólise com a produção de ATP. A metabolização da glicose resulta em um aumento da razão ATP/ADP dentro da célula. Essa relação aumentada possibilita então o fechamento dos canais de potássio ( $K^+$ ) com consequente despolarização da membrana, promovendo assim a abertura dos canais de cálcio sensíveis à voltagem. O influxo aumentado de  $Ca^{2+}$  permite a exocitose dos grânulos de insulina (HABER et al., 2001).

Cabe nesse ponto ressaltar que a insulina não é o único hormônio produzido pelo pâncreas. Esse órgão é considerado uma glândula mista, composto por uma porção exócrina com atuação na função digestiva e uma porção endócrina. A porção endócrina são as ilhotas de Langerhans, microórgãos que representam 1-2% do volume pancreático formados por diferentes células, a saber: em menores proporções de secreção - células  $\delta$  que respondem pela produção de somatostatina, as células PP que secretam o polipetídeo pancreático, células  $\epsilon$  que secretam grelina, e em maiores proporções - as células  $\alpha$  secretoras de glucagon e as células  $\beta$  que secretam insulina (BOSCO et al., 2010; RÖDER et al., 2016).

Porém, devido ao seu papel crucial no envolvimento do Diabetes *Mellitus* tipo 1, pela atuação fundamental no controle glicêmico e pela temática do trabalho aqui proposto, o enfoque será dado especialmente a este hormônio que é a insulina.

### **2.1.2 Vias de sinalização da insulina**

A sinalização da insulina (Figura 1) é um processo complexo que é responsável por desencadear diversas respostas que vão atuar na regulação da homeostase da glicose, afetando ainda o metabolismo de lipídios e proteínas, envolvendo principalmente a participação do fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014).

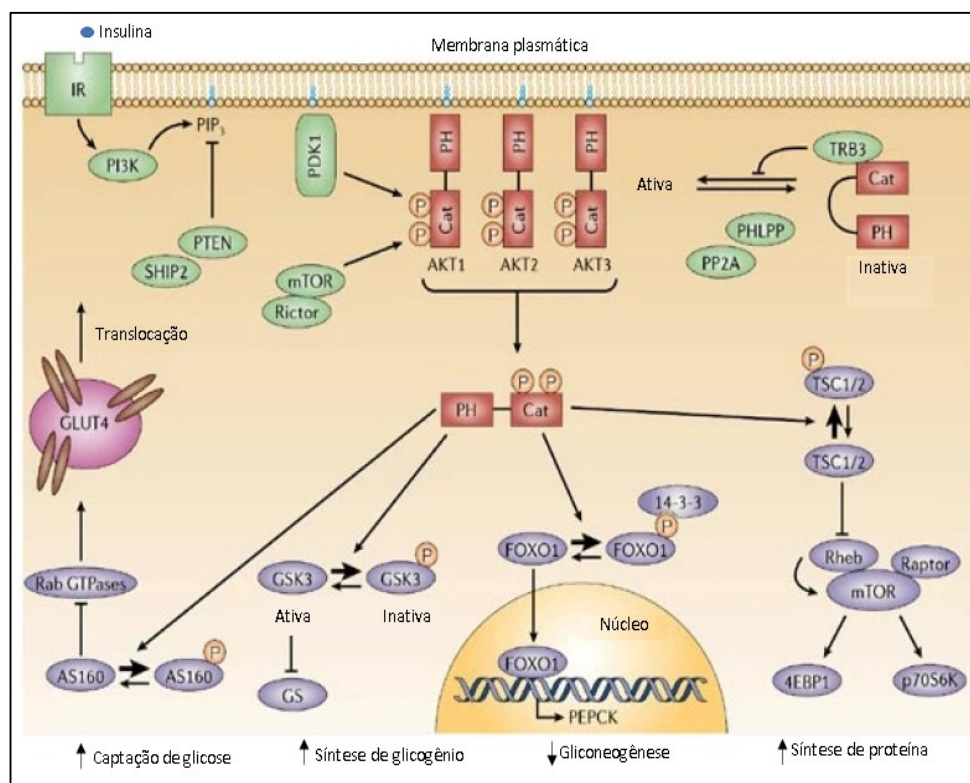
Para exercer toda e qualquer ação nas células alvo, a insulina precisa se ligar ao receptor de insulina na membrana plasmática. Este receptor está presente em praticamente todas as células em quantidades variadas e sua estrutura é composta por um heterodímero  $\alpha_2\beta_2$ . Quando a insulina se liga na subunidade  $\alpha$  (externa), ocorre uma mudança conformacional no receptor que possibilita que a atividade tirosina cinase da subunidade  $\beta$  (interna) seja ativada, promovendo assim uma autofosforilação em resíduos tirosina e dando início à cascata de sinalização. A partir daí é desencadeada uma sequência de fosforilações e defosforilações abrangendo dessa forma diversas proteínas como os substratos dos receptores de insulina (IRS) e proteínas que expressam o domínio SH2 (homologia Src). Ocorre uma interação desses substratos ativados com diversas proteínas, tais como a fofatidilinositol-3-cinase (PI3-K) e o sinal da cascata é amplificado. As proteínas IRS ativam principalmente a via que envolve PI3-K e a proteína cinase B (Akt), sendo esta via de suma importância devido ao seu envolvimento em processos que resultam na proliferação celular e em efeitos metabólicos (KAHN; WHITE, 1988; PATTI; KAHN, 1998).

Nos tecidos-alvo, uma das respostas geradas pela ativação da via PI3-K/Akt envolve a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4). Este facilitador do influxo de glicose é armazenado em vesículas no citoplasma, é expresso no tecido adiposo e no músculo esquelético, sendo translocado à membrana plasmática após ativação dos receptores de insulina, aumentando assim a captação de glicose nesses locais e consequentemente promovendo uma queda na glicemia (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004). Outro efeito decorrente da efetivação dessa via refere-se à fosforilação e consequente inativação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GS3-K). Esta por sua vez ativa a enzima glicogênio sintase, que promoverá a síntese de glicogênio (COHEN; ALESSI; CROSS, 1997).

Em relação à regulação da insulina na síntese de lipídios e produção de glicose a partir de precursores não glicídicos (neoglicogênese), estão envolvidos 2 fatores de transcrição: o da família *Forkhead box protein O* (FOXO) e o da Proteína ligada ao elemento regulador de esteróides 1 (*Sterol regulatory element binding proteins*), abreviado SREBP1c. A FOXO1 defosforilada, sem a presença da insulina, encontra-se no núcleo da célula e tem sua atividade transcritora ativada. Quando ocorre a fosforilação da FOXO1, mediada pela Akt, sua atividade é inibida, a proteína fica retida no citoplasma e diminui-se a transcrição de genes gliconeogênicos. No que se refere à SREBP1c, sua ativação pela ativação da

sinalização insulínica está relacionada com o seu deslocamento ao núcleo onde participa na transcrição de diversas enzimas lipogênicas (SALTIEL, 2021).

**Figura 1.** Via de sinalização da insulina.



Fonte: Adaptado e modificado de Taniguchi et al., 2006.

Descritos os principais eventos e respostas na via da sinalização da insulina que mais se relacionam com as ações metabólicas desse hormônio, cabe caracterizar de forma sucinta como os principais órgãos participam nesse processo. Ressalta-se ainda que por tratar-se de um hormônio anabólico, suas atuações estarão voltadas a promover a absorção, armazenamento e síntese de nutrientes, ao mesmo tempo que bloqueará a degradação dos nutrientes evitando sua disponibilização na corrente sanguínea (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; SALTIEL, 2021).

No músculo, a insulina estimula a captação da glicose, estimula a síntese de glicogênio e a glicólise. No fígado, a ação da insulina leva a uma redução da gliconeogênese, glicogenólise e também a um aumento da síntese de glicogênio hepático, ácidos graxos e triglicerídeos (ZHANG, LIU, 2014).

Já no tecido adiposo, o resultado do aumento da captação da glicose será o seu armazenamento na forma de lipídios. Além de inibir lipólise, primariamente pela inativação

da enzima lipase sensível ao homônio (HSL), a metabolização da glicose dará origem ao glicerol. (ZHANG, LIU, 2014).

Pode-se portanto esperar que na ausência da insulina, boa parte das ações serão contrárias a essas aqui relatadas. Dessa forma, pacientes portadores do DM1 sem tratamento, que carecem da secreção desse hormônio, apresentam hiperglicemia crônica decorrente da não ativação da translocação de GLUT4 nas células musculares e adiposas e do aumento da gliconeogênese e da glicogenólise hepática (PETTUS et al, 2016). Além disso, por mais que a falta da insulina e de seus efeitos metabólicos sejam o cerne das alterações observadas no DM1, não podemos deixar de comentar que nesses pacientes observa-se um aumento das concentrações plasmáticas de glucagon e esse evento promove ainda mais a exarcebação da hiperglicemia. Essa exarcebação é fruto da ação do glucagon em mobilizar substratos energéticos, principalmente estimulando a glicogenólise e neoglicogênese hepática (QUESADA et al., 2008).

### **2.1.3 Clearance de Insulina**

A insulina quando secretada fisiologicamente possui uma meia vida plasmática de 4-6 minutos presumivelmente em razão da necessidade de uma rápida resposta às mudanças glicêmicas. Após ser liberada, a insulina é transportada ao fígado por meio da circulação portal, podendo 50 a 80 % dessa insulina ser depurada nessa primeira passagem. O restante, ao menos 20% do hormônio, segue para o coração e é distribuído aos tecidos periféricos e cerebrais, onde exercerá suas ações. A insulina que não se ligou em nenhum local, pode ainda retornar ao fígado para uma segunda passagem, sendo a fração restante depurada pelos rins (DUCKWORTH; BENNETT; HAMEL, 1998; TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018).

As ações que resultam na fração de insulina plasmática disponibilizada ao organismo ocorrem de maneira coordenada e de forma a existir um balanço entre o que é secretado e o que é depurado. Todo esse processo leva ainda em consideração a concentração plasmática da glicose, a qual é regulada continuamente mesmo com as variações que ocorrem em períodos prandiais e de jejum (BERGMAN et al., 2019).

A degradação da insulina depende de uma protease, a IDE. Essa enzima é uma zinco metaloprotease de 110kD que exhibe acentuada afinidade para degradar a insulina, seu principal substrato. Essa protease foi descrita pioneiramente por Mirsky e Broh-Kahn em



1949 e nessa ocasião esses pesquisadores descreveram uma substância presente no extrato tecidual do rato que era capaz de inativar a insulina (Revisado por LEISSRING et al., 2021).

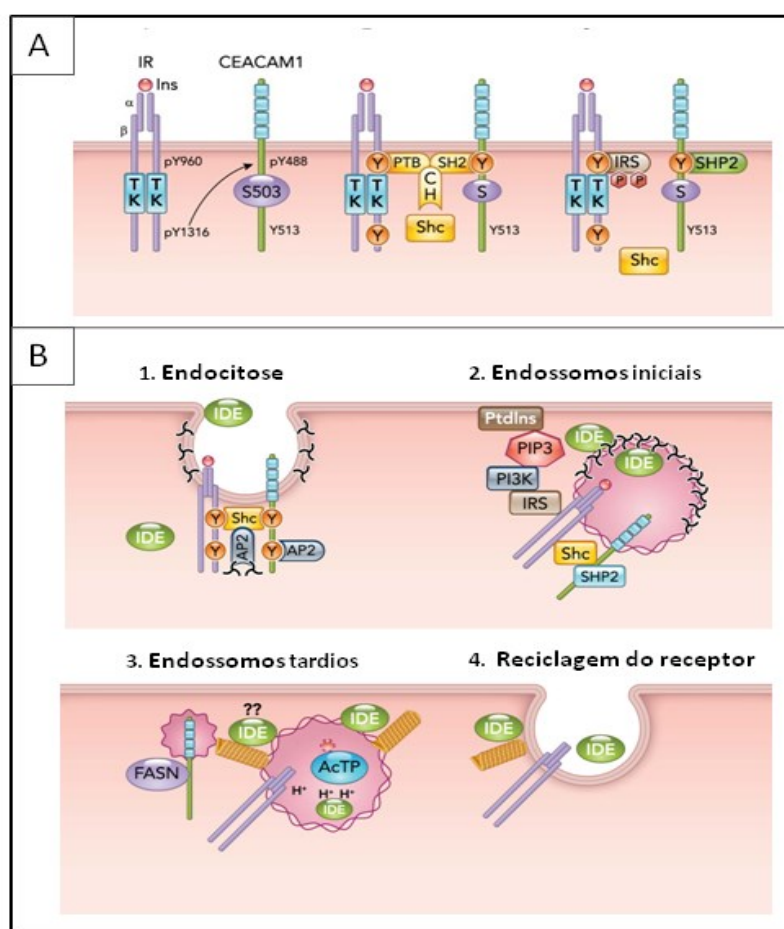
Continuando seus estudos nessa área, Mirsky e colegas sugeriram em 1955 a possibilidade de usar um inibidor da IDE para preservar a insulina endógena (MIRSKY, PERISUTTI, 1955). Essa e outras publicações acenderam uma esperança de que estudos com agentes inibidores dessa enzima poderiam representar um novo alvo farmacológico promissor que atuaria na modulação dos níveis de insulina em pacientes DM2 alterando o seu *clearance* e reduzindo assim sua glicemia (TANG, 2016). Porém, as tentativas se mostraram fracassadas até o momento (LEISSRING et al., 2021).

Além de degradar a insulina, a IDE também degrada outros substratos, entre eles o glucagon e a amilina (BENNETT; DUCKWORTH; HAMEL, 2000; VALERA MORA et al., 2003). Além disso, foi relatado e demonstrado que a atividade e/ou expressão da IDE apresentam-se alteradas em modelos animais de obesidade (VALERA MORA et al., 2003; (BRANDIMARTI et al., 2013). Nesse contexto de obesidade induzida por dieta, em um artigo publicado em 2016, os autores demonstraram que a atividade da IDE hepática apresenta-se diminuída. No entanto, o exercício físico agudo é capaz de restaurar a insulinemia decorrente do quadro de hiperinsulinemia presente nessa condição possivelmente por uma contribuição do aumento no *clearance*, atividade e expressão da IDE exercida primariamente no músculo esquelético (KURAUTI et al., 2016).

Algumas publicações com animais Knockout para a enzima IDE (IDE-KO) observaram que os animais apresentavam um quadro de hiperinsulinemia crônico, demonstrando a importante participação dessa enzima no *clearance* de insulina. No entanto, também observaram que com o avanço da idade, os animais apresentavam um fenótipo de DM2 com intolerância à glicose e à insulina, provavelmente por uma *down regulation* dos receptores de insulina, secundário ao quadro de hiperinsulinemia (ABDUL-HAY et al., 2011; FARRIS et al., 2003). Além disso, um estudo realizado com camundongos com deleção específica dessa enzima no fígado mostrou que os animais apresentaram uma glicemia de jejum alterada, intolerância à glicose, resistência à insulina, porém, sem alteração na insulina plasmática e no seu *clearance* hepático. Juntos, esses resultados auxiliaram a suposição que haveria outras proteínas envolvidas no processo de degradação da insulina e sugeriram a participação da CEACAM1 (VILLA-PÉREZ et al., 2018).

A Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1 (CEACAM1) é uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície dos hepatócitos e dos rins, locais apontados como principais responsáveis pelo *clearance* de insulina. Nesses sentido, a CEACAM1 parece atuar contribuindo com um aumento na taxa de captação do complexo Insulina-Receptor de insulina (I-IR) e direcionando a insulina para degradação (Figura 2 A e B) (NAJJAR, 2002; RUSSO et al., 2016).

**Figura 2:** Degradação da Insulina no hepatócito com a participação da CEACAM1.



Fonte: Adaptado de (NAJJAR; PERDOMO, 2019).

Recentemente foi proposto um mecanismo principal no qual a insulina é degradada nos hepatócitos e como a atuação da CEACAM1 ocorre nesse processo. Como pode-se notar na figura 2 A, essa glicoproteína possui uma porção externa e uma porção interna. Esta porção citoplasmática pode sofrer fosforilação em resíduos tirosina pela Src-cinase e desfosforilação por tirosina fosfatases contendo SH2 inibitório (SHP-1 e SHP-2). Quando a insulina se liga ao seu receptor (IR), a atividade tirosina cinase da subunidade  $\beta$  é ativada

catalizando sua autofosforilação e conseqüentemente fosforilando a CEACAM1 no resíduo tirosina 488 (Tyr 488). Isso permite que a proteína Shc se ancore e forme um complexo com o receptor de insulina e com a CEACAM1 (I-IR-CEACAM1). Esse complexo sofre internalização, sendo direcionado para os endossomos iniciais neutros e nesse local a IDE inicia o processo de degradação da insulina (Figura 2 B). Porém, é necessário que a insulina esteja livre do complexo para completar o seu processo de degradação, que é finalizado no ambiente ácido dos endossomos maduros (HORST et al., 2018; NAJJAR; PERDOMO, 2019).

A retirada da CEACAM1 do complexo ocorre quando esta se liga à enzima ácido graxo sintase (FASN) por meio do resíduo Tyr488. Essa ação, inibe a atividade da FASN e permite a dissociação da insulina do seu receptor e desse complexo já desestabilizado. Os efeitos da FASN são mediados pelo SREBP1c e portanto, sua inativação enzimática, restringe a lipogênese *de novo* no fígado. Quanto ao destino do receptor de insulina internalizado, este pode sofrer degradação nos lisossomos ou então ser reciclado à membrana plasmática como habitualmente ocorre em condições fisiológicas normais (Figura 2 B) (HORST et al., 2018; NAJJAR; PERDOMO, 2019).

## 2.2 DIABETES *MELLITUS*, DIABETES *MELLITUS* TIPO 1, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO DM1

### 2.2.1 Diabetes *Mellitus*

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença de etiologia múltipla que resulta em um cenário hiperglicêmico crônico e apresenta alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. De acordo com dados publicados pelo IDF (International Federation Diabetes), em 2019, o número de acometidos representava um total de 463 milhões de pessoas. A estimativa para 2045 é de que haja um aumento de 51% nesse quantitativo, perfazendo um total de 700 milhões de pessoas diabéticas no mundo (IDF, 2019).

Historicamente, a palavra diabetes é proveniente de uma antiga palavra grega e significa “passar através de”. Esse termo faz menção à poliúria, um sintoma bastante presente no DM. O termo “*mellitus*” foi acrescido por Willis no intuito de caracterizar esse perfil adocicado e para fazer a distinção de outro tipo de diabetes relacionado ao hormônio antidiurético (ADH), com elevada produção de urina sem hiperglicemia, o diabetes *insipidus* (Revisado por ZACCARDI et al., 2016).

Baseado em sua etiologia, essa patologia apresenta duas classificações principais: Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) e Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2). Essas duas formas de DM diferenciam-se principalmente no que se refere à etiologia, sendo que o DM2 representa cerca de 90 % dos casos, apresenta defeitos na secreção e /ou ação da insulina, é mediado por mecanismos metabólicos (p.ex. resistência à insulina) e muitas vezes associa-se à obesidade (ADA, 2020). Já o DM1, antigamente denominado Diabetes *Mellitus* insulino-dependente ou Diabetes juvenil, representa cerca de 10% de todos os casos, é prevalente em crianças e jovens, mas pode se desenvolver e ser diagnosticada em qualquer idade. Alguns desses casos de DM1 são idiopáticos, mas a maior parte é imunomediado e, essa forma de DM será abordada de forma mais aprofundada no subitem seguinte (ATKINSON; EISENBARTH, 2001; THOMAS et al., 2018; ADA, 2020).

### **2.2.2 Diabetes *Mellitus* tipo 1**

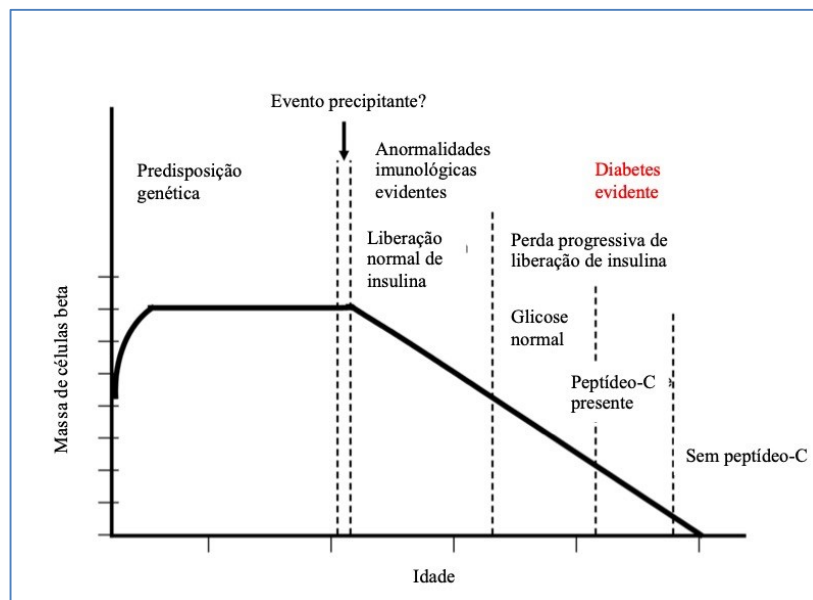
O DM1 é um distúrbio autoimune mediado por células T que atacam e destroem as células  $\beta$  pancreáticas em decorrência de uma interação complexa que compreende fatores ambientais e genéticos, além da microbiota, do metabolismo e do sistema imunológico (SABERZADEH-ARDESTANI et al., 2018; ILONEN; LEMPAINEN; VEIJOLA, 2019).

Geralmente, o processo que ocorre até que o paciente manifeste os sintomas clássicos DM1 se inicia muitos meses e até mesmo anos antes. Os estágios do curso natural da doença foram propostos pela primeira vez por George S. Eisenbarth em publicação no ano de 1986, posteriormente republicados em outros trabalhos do mesmo autor. Nesse modelo ele sugere que o curso da doença é composto de 6 estágios que se iniciam com uma predisposição genética e findam com a completa ou quase completa da destruição das células  $\beta$  e com o peptídeo C indetectável (figura 3) (EISENBARTH, 1986; EISENBARTH; JEFFREY, 2008).

O modelo do proposto por Eisenbarth ainda pode ser utilizado para explicar o que ocorre nessa patologia, pois consegue representar grafica e didaticamente a sequência de eventos que envolvem a perda da massa de células  $\beta$  que ocorre em boa parte dos indivíduos que vão desenvolver o DM1. No entanto, deve-ser levar em consideração que se passaram 35 anos desde que foi descrito pela primeira vez e houve um enorme progresso sobre os fatores envolvidos na evolução e na complexidade da doença. Ademais, os indivíduos apresentam heterogeneidade no curso da doença e muitas lacunas ainda permanecem

desconhecidas no entendimento do desenvolvimento do DM1 (DIMEGLIO, EVANS-MOLINA, ORAM, 2018).

**Figura 3.** Modelo de Eisenbarth da história natural do Diabetes *Mellitus* tipo 1



**Fonte:** Adaptado de EISENBARTH; JEFFREY, 2008. Modelo de Eisenbarth da história natural do Diabetes *Mellitus* tipo 1 (republicado em 2008). Os estágios ocorrem da esquerda para a direita e a idade (em anos).

Seus estágios e características são representados no gráfico da figura 3 e descritos sucintamente a seguir:

**Estágio 1: Predisposição Genética** - No que diz respeito à primeira fase desse modelo, da susceptibilidade genética da doença, inúmeros estudos ressaltam principalmente a participação dos genes HLA classe II (HLA-DQ e HLA-DR) que seriam responsáveis por até 50% do risco de desenvolvimento do DM1. Como esses genes codificam proteínas expressas na superfície celular que são apresentadas às células T CD4+, são considerados cruciais na regulação da resposta imune e autotolerância (ZACCARDI et al., 2016; SANTOS et al., 2020).

**Estágio 2 e 3: Evento Desencadeante e Ativação Auto Imune** – Nesse segundo estágio, gatilhos ambientais tais como infecções virais e introdução de alimentos precocemente são apontados como prováveis desencadeantes da autoimunidade. As células T ativadas estimulam os linfócitos B a produzirem autoanticorpos, que podem ser detectados nos pacientes muitos anos antes e são direcionados contra a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), proteína semelhante à tirosina fosfatase (IA-2), à insulina (IAA) e

transportador de zinco 8 (ZnT8). Além disso, um infiltrado inflamatório crônico nas ilhotas (insulite) composto de macrófagos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados liberam principalmente citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , Interleucina 1 (IL-1) e Inteferon gama (IFN- $\gamma$ ), que atuam mediante mecanismos pró apoptóticos contribuindo com a perda específica de células  $\beta$  pancreáticas (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009).

Estágio 4, 5 e 6 : Perda Progressiva da Secreção de Insulina pela Glicose, Diabetes Instaurado, Perda Completa de Células  $\beta$  – Na quarta etapa, a perda progressivas da secreção de insulina inicialmente é evidenciada pela falha da primeira fase de secreção de insulina frente ao estímulo pela glicose. Nos estágio seguintes considera-se o diabetes instaurado, finalizando com a perda completa ou quase completa das células  $\beta$  e um peptídeo C indetectável (EISENBARTH, 1986; EISENBARTH; JEFFREY, 2008).

Alguns estudos tem mostrado que não há uma perda total das células em uma relativa parcela dos acometidos. De acordo com um estudo publicado em 2015 por Davis e colaboradores, no qual foram incluídos 919 pacientes com DM1, estimou-se que 1 a cada 3 desses pacientes com 3 ou mais anos apresentavam níveis de peptídeo C detectável quando estimulados.

Ademais, salienta-se que pacientes DM1 apresentam um risco aumentado de morte prematura quando comparados à população em geral, por complicações que vão desde cetoacidose diabética e hipoglicemia a doenças cardiovasculares. Algumas publicações nessa área tem mostrado que uma terapia farmacológica intensiva que mantém um bom controle glicêmico, mesmo com o risco aumentado de episódios de hipoglicemia, reduz a frequência e gravidade de complicações micro e macrovasculares (NATHAN et al., 1993; LIND et al., 2014).

### **2.2.3 Diagnóstico e Tratamento do DM1**

Os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) para o diagnóstico do Diabetes *Mellitus* levam em consideração os valores de glicemia de jejum, glicemia após 2 horas de um teste oral de tolerância à glicose, nível de hemoglobina glicada (HbA1c) e valores de glicemia aleatórios quando presentes sintomas clássicos em um quadro de hiperglicemia. Apenas a análise dos parâmetros laboratoriais descritos acima, não distinguem as duas principais formas de DM, mas os sintomas característicos do DM1 podem auxiliar os clínicos no diagnóstico. Por isso foram inclusos na tabela abaixo juntamente com

as especificações dos valores de cortes estabelecidos pela ADA (CHIANG et al., 2014; ADA, 2020).

**Tabela 1.** Critérios para diagnóstico de Diabetes *Mellitus* e sintomas clínicos do DM1.

<b>Critérios</b>	<b>Valores</b>
<b>Glicemia de jejum (8 horas de jejum)</b>	$\geq 126$ mg/dL
<b>Glicemia 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose durante o teste de tolerância à glicose</b>	$\geq 200$ mg/dL
<b>HbA1c</b>	$\geq 6.5\%$
<b>Glicemia (2 dosagens em qualquer momento do dia, quando presentes sintomas clássicos de hiperglicemia).</b>	$\geq 200$ mg/dL
<b>Sintomas Clínicos no DM1</b>	Poliúria Polidipsia Perda de peso inexplicada

Fonte: Adaptado e modificado de ADA, 2020.

Após o diagnóstico do DM1, o paciente vai precisar iniciar o seu tratamento que seguirá por toda a sua vida. A terapia do paciente portador do DM1 se baseia na reposição da insulina exógena. Nesse sentido, os investimentos nesse campo buscam disponibilizar formulações que viabilizem um tratamento que se aproxime ao máximo da secreção hormonal que ocorre fisiologicamente ( HEISE; PIEBER, 2007; CHENG et al., 2019).

Para tal, as técnicas de purificação foram se aprimorando até que a insulina humana regular passou a ser produzida pela tecnologia do DNA recombinante, permitindo a substituição da utilização das insulinas bovinas e suínas. (VECCHIO, 2018). Alterações na sequência de aminoácidos, seja promovendo trocas, inclusões ou retiradas de aa, modificação no pH ou complexá-las com outras substâncias permitiram alterar a farmacodinâmica e a farmacocinética desse medicamento. Essas modificações permitiram a disponibilização de inúmeras apresentações de insulina no mercado (TIBALDI, 2014).

A classificação desses agentes leva em consideração a sua duração de ação, sendo divididos nos seguintes tipos: insulina de ação ultra rápida, ação rápida, de ação intermédica e de longa duração e as mistas. (Tabela 2). Cabe no entanto ressaltar que variação referente

ao início, pico de ação e duração de ação podem ocorrer tanto intra quanto inter indivíduos (SDB, 2019a).

**Tabela 2 : Tipos de Insulina disponíveis no Brasil.**

Tipo	Início da Ação	Pico	Duração
<b>Bolus</b>			
<b>Ultrarrápida (Análogos)</b>			
(Glulisina)	10-15 minutos	1-2 horas	3-5 horas
(Lispro)			
(Asparte)			
<b>Rápida</b>			
(Insulina Humana Regular)	30 minutos	2-3 horas	6 horas e 30 minutos
<b>Basal</b>			
<b>Ação intermediária</b>			
Insulina NPH – humana	1-3 horas	5-8 horas	Até 18 horas
<b>Longa duração (Análogos lentos)</b>			
(Glargina)	90 minutos	Sem pico	Lantus: até 24 horas. Detemir: de 16 a 24 horas. Degludeca: > 24h
(Detemir)			
(Degludeca)			
<b>Pré-misturada</b>			
Insulina pré-misturada regular Mistura Regular 70/30	10 a 15 minutos(componente R) e 1 a 3 horas(componente N)	30% de insulina R e 70% de insulina N	30% de insulina R e 70% de insulina N
<b>Insulina pré-misturada análoga</b>			
Pré Mistura Análoga 30	O nº é o percentual de ultrarrápida na mistura, o restante tem perfil de ação compatível com insulina N	Insulina ultrarrápida (25, 30 ou 50%). Restante insulina N	Insulina ultrarrápida (25, 30 ou 50% da dose). Restante insulina N
Pré Mistura Análoga 25			
Pré Mistura Análoga 50			

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Diabetes, 2021. R = Regular. N= NPH.

Conforme apresentado na tabela 2, a insulina NPH é uma formulação de ação intermediária e possui na sua composição o zinco e a protamina. Esta modificação torna a insulina insolúvel, formando cristais sólidos amorfos quando aplicada pela via subcutânea e consequente disponibilizado-a lentamente para a corrente sanguínea. Uma grande parte dos pacientes portadores de DM1 segue um regime terapêutico pautado na aplicação de múltiplas doses basal/bolus ao longo de um dia, sendo que a insulina NPH geralmente está incluída nesse esquema (HEISE; MATHIEU, 2017).

Além da insulina NPH e das formulações apresentadas na tabela 2, o sistema de bomba de infusão contínua de insulina (SICI) também pode ser usadas para tratamento no DM1 (PALERM et al., 2008). Nessa modalidade, o dispositivo com acesso subcutâneo possui insulina de ação ultra rápida armazenada que pode ser programada para liberação em função da necessidade do paciente para seu controle glicêmico (SDB., 2020).



O Sistema Único de Saúde (SUS) fornece a medicação aos pacientes diagnosticados com DM1 no Brasil. Inicialmente o fornecimento era realizado com a insulina NPH e a insulina Humana Regular. Entretanto, em fevereiro de 2017, foi incluída a insulina análoga de ação rápida Asparte para fornecimento pela rede pública. Mais recentemente, pela Portaria n. 19 de março de 2019, a insulina análoga de ação prolongada passou também a compor a listagem de fornecimento. Essas inclusões certamente representam um grande avanço no sentido de ampliar os esquemas terapêuticos e conseqüentemente melhorar a terapia e o controle glicêmico desses pacientes (BRASIL, 2017; BRASIL, 2019).

No que se refere ao SICI, este sistema não está disponível pelo SUS para a maior parte dos pacientes em função do seu alto custo. Porém, segundo Janež et al. (2020), quando a terapia com a múltiplas injeções diárias mostra-se ineficaz no que concerne ao controle glicêmico, pronunciado fenômeno do amanhacer e episódios de hipoglicemia, deve-se nesses casos considerar a utilização da (SICI).

Ressalva-se por fim que o esquema terapêutico com insulina é individualizada e leva em consideração os objetivos a serem alcançados, a idade, saúde geral, os fatores de risco e as atividades diárias do indivíduo. Com isso, espera-se que haja um benefício no controle glicêmico do paciente, minimizando o risco de episódios de hipoglicemia e diminuindo os efeitos colaterais, ao mesmo tempo que aumentando a adesão ao tratamento (CHIANG et al., 2014).

### 2.3 DIABETES *MELLITUS*, *CLEARANCE* E RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina (RI) pode ser caracterizada como uma condição na qual as células não respondem adequadamente ao hormônio, ou seja, trata-se de uma situação em que há uma atenuação da resposta que seria normalmente esperada. Esta condição pode ter diversas causas, envolver diversos mecanismos e não ocorre somente em condições patológicas, pode ocorrer também de maneira fisiológica como por exemplo na gestação ou no envelhecimento. Além disso, substâncias que podem estar presentes na circulação como glicocorticóides, glucagon, citocinas, ácidos graxos e até mesmo uma condição de hiperglicemia, além da própria insulina, podem afetar a via de sinalização deste hormônio (HIMSWORTH, 1936; HUNTER; GARVEY, 1998).

A RI é bastante estudada no DM2. Existem inúmeros trabalhos na literatura que tratam do tema e, uma vez que o DM2 está geralmente relacionado com a obesidade, esse

fenômeno pode ser induzido pelos ácidos graxos livres ou até mesmo por citocinas pró inflamatórias como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 6 (IL-6) que são geradas em função da inflamação crônica presentes na patologia caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo. Nesse contexto, um dos mecanismos é que ocorre uma atenuação na via de sinalização da insulina gerados pelo aumento da fosforilação em Serina e Treonina tanto no receptor de insulina quanto nas proteínas IRS, favorecendo a instauração de quadros de RI (BOUCHER; KLEINRIDERS; KAHN, 2014; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

No que se refere à RI no DM1, uma meta análise incluindo 38 publicações sobre o tema, concluiu que a RI é uma característica que mostra-se proeminente em pacientes adultos com DM1 e este quadro envolve os tecidos periféricos, hepático e adiposo. Esse mesmo estudo, concluiu ainda que pouca atenção tem sido dada à ineficácia da ação da insulina tanto na prática clínica quanto na pesquisa nesses indivíduos. (DONGA et al., 2015). Além disso, segundo Priya e Kalra (2018), a RI tem sido proposta como uma das causas de não se atingir adequadamente o controle glicêmico e pode estar associada à necessidade no aumento da dose de insulina no Diabetes *Mellitus* tipo 1.

Uma diferença interessante na circustância desse evento nos dois tipos de diabetes está relacionada ao momento em que essa resistência à insulina se instala, uma vez que nos pacientes DM1 esse quadro ocorre meses após o diagnóstico e nos pacientes DM2, a RI se desenvolve e progride antes da hiperglicemia se manifestar. Em todo caso, quadros de RI e hiperglicemia estão relacionados a um aumento do risco de problemas cardiovasculares adversos (KILPATRICK; RIGBY; ATKIN, 2007; LAAKSO; KUUSISTO, 2014).

No entanto, ainda que alguns trabalhos investiguem a RI, o DM e o processo de depuração da insulina, estudos que avaliem esse *clearance* no DM1 ainda não foram descritos na literatura. Assim, em face desse cenário e sabendo da escassez de informação nessa área, urge se investigar a relação entre DM1, RI e *clearance* de insulina.

## 2.4 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Modelos experimentais para o estudo do DM1 são de suma importância para a compreensão desta doença. Existem desde modelos animais modificados geneticamente que desenvolvem espontaneamente o diabetes como o NOD (camundongos diabéticos não obesos) a modelos no qual o DM é induzido quimicamente (quadro 1).

No que se refere aos modelos induzidos, dentre as substâncias químicas que podem ser utilizadas para promover a morte das células  $\beta$  pancreáticas, destacam-se principalmente o uso da aloxana (ALX) e da estreptozotocina (STZ). Esses agentes diabetogênicos são amplamente utilizados em camundongos e ratos, pois são capazes de induzir nesses animais quadros de hiperglicemia associado a glicosúria, polifagia e polidipsia, mostrando-se portanto úteis para gerar modelos animais em estudos que envolvem o DM1 (ACHARJEE et al., 2013).

Neste trabalho, utilizamos a STZ em múltiplas doses como substância diabetogênica para mimetizar o modelo de DM1. Quando são utilizadas múltiplas doses sub diabetogênicas da STZ pela via intraperitoneal por 5 dias, produz-se uma insulite no pâncreas com um morte gradual das células  $\beta$  e deficiência de insulina, sendo esse modelo cada vez mais utilizado, pois os animais desenvolvem uma patologia que se assemelha ao que ocorre nos seres humanos com o DM1. Já quando a STZ é aplicada em alta e única dose de 200 mg/kg de peso do animal, as células  $\beta$  dos camundongos sofrem um efeito mais citotóxico direto com danos ao DNA que findam com a morte dessas células e presença de hiperglicemia em 48 horas (LIKE; ROSSINI, 1976; KOLB, 1987; FURMAN, 2015).

No que tange ao seu mecanismo de ação, a STZ apresenta alta seletividade às células produtoras de insulina, é extraído e isolado do fungo *Streptomyces achromogenes* e, por ser um análogo estrutural da glicose, acaba sendo transportada para o meio intracelular pelos transportadores GLUT-2 presentes nas células  $\beta$ . Nessas células, esse agente provoca efeitos citotóxicos que posteriormente culminarão na morte celular (LENZEN, 2008; ELEAZU et al., 2013).

**Quadro 1: Modelos animais de DM1**

Espécie animal (Modelo de DM1)	Sexo	Substância, dose e via de administração	Tempo de indução	Desfecho glicêmico	Referência
Camundongo C3 D2 F1	Machos e fêmeas	STZ; 40 mg/kg ip	5 dias	Camundongos machos desenvolveram hiperglicemia após 3 semanas. O nível de glicose no sangue aumentou de forma constante durante o período de estudo, enquanto todas as fêmeas permaneceram euglicêmicas.	KROMANN et al., 1982
Ratos Wistar	Machos	STZ; 60 mg/kg ip	Dose única	Níveis de glicose no sangue superiores a 300 mg/dL foram considerados diabéticos	KAZEMIAN et al., 2015
Camundongo C57BL/6J	Machos	STZ; 80 mg/kg ip	4 dias	Camundongos com níveis de glicose no sangue superiores a 288 mg/dl foram considerados diabéticos.	EDDOUKS et al., 2015
Ratos Wistar	Machos	STZ; 60 mg/kg ip	Dose única	Apenas os animais com glicemia de jejum de 12 horas acima de 300 mg/dl foram considerados diabéticos	SAEED et al., 2012
Camundongo C57BL/6J	Machos	STZ; 40 mg/kg ip	5 dias	Animais apresentaram hiperglicemia e diminuição da área e quantidade de ilhotas de Langerhans	SKURIKHIN et al., 2018
Ratos Wistar	Machos	Aloxana; 150 mg/kg ip	Dose única	Animais com níveis glicêmicos superior a 200 mg/dL foram considerados diabéticos	TREVIÑO et al., 2016
Ratos Sprague-Dawley	Machos	Aloxana; 120 mg/kg ip	3 dias	Níveis de glicose de jejum acima de 250 mg/dL foi considerado diabético	EREKAT, N. S.; AL-JARRAH, M. D.; AL KHATIB, A. J. 2014
Ratos Wistar	Machos	Aloxana; 220 mg/kg ip	Dose única	Ratos com glicemia maior ou igual 252 mg/dl foram selecionados para o experimento	SEBAI et al., 2013
Camundongo NOD	Machos e fêmeas	Esponaneamente diabético.	Com 24 semanas de idade 70% das fêmeas e 30% dos machos ficaram diabéticos	Níveis de glicose no sangue superior a 300 mg/dl em uma única medição ou maior que 250 mg/dl em medições consecutivas	KIM et al., 2020

Fonte: elaborado pela autora.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações causadas sobre o *clearance* de insulina e a sensibilidade à insulina em animais DM1 e investigar como o tratamento com injeções diárias de insulina NPH ou com liberação constante de Insulina altera esses parâmetros.

#### 3.1.1 Objetivos Específicos

- Investigar se o DM1 altera a sensibilidade à Insulina.
- Investigar se o tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina altera a sensibilidade à insulina em animais diabéticos tipo 1.
- Comparar os efeitos do tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina sobre sensibilidade à insulina em animais diabéticos tipo 1.
- Investigar se o DM1 altera o *clearance* de insulina.
- Investigar se o tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina altera o *clearance* de insulina em animais diabéticos tipo 1.
- Comparar os efeitos do tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina sobre o *clearance* de insulina em animais diabéticos tipo 1.
- Investigar se o DM1 altera a expressão proteica da CEACAM1 e da IDE em fígado.
- Investigar se o tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina altera a expressão proteica da CEACAM1 e da IDE em fígado de animais diabéticos tipo 1.
- Comparar os efeitos do tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina sobre a expressão proteica da CEACAM1 e da IDE em fígado de animais diabéticos tipo 1.
- Investigar se o DM1 altera a atividade da IDE.
- Investigar se o tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina altera a atividade da IDE em fígado de animais diabéticos tipo 1.

- Comparar os efeitos do tratamento com insulina NPH ou com implante de pellet de insulina sobre a atividade da IDE em fígado de animais diabéticos tipo 1.
- Investigar se os diferentes tratamentos promovem alguma alteração nas funções metabólicas e/ou dano hepático nesses animais.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Este trabalho foi realizado com a utilização de camundongos *Swiss* machos adultos (50-60 dias) provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram alimentados com dieta (ração) comercial e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS) em condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração padrão.

O estudo foi aprovado pela CEUA/UFSC – nº de protocolo 8169250219- anexo 01).

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O modelo experimental de DM foi induzido com 5 injeções diárias pela via intraperitoneal em 5 dias consecutivos de uma dose de 50mg/kg de Estreptozotocina em tampão citrato pH 4,5. Todas as injeções foram precedidas de um período de 1,5 hora e sucedidas por 40 minutos de jejum. Após o período da aplicação de STZ, avaliamos a glicemia dos animais com glicosímetro digital Accu-Chek® Performa (Roche, Alemanha). Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram por 2 dias consecutivos valores da glicemia iguais ou superiores a 200mg/dL. Após a instauração do DM, a glicemia foi acompanhada semanalmente e os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo Controle (CTL): Os animais desse grupo receberam 5 injeções, em 5 dias consecutivos, de tampão Citrato pH 4.5 (veículo da STZ). Esses animais não receberam nenhum tratamento e foram eutanasiados na mesma idade do respectivo protocolo com tratamento por 30 dias.

Grupo DM (DMNTTO) – Após o diagnóstico do DM, os animais pertencentes a esse grupo foram acompanhados e não receberam tratamento com insulina. Esses animais foram eutanasiados na mesma idade dos respectivos animais do protocolo de tratamento por 30 dias.

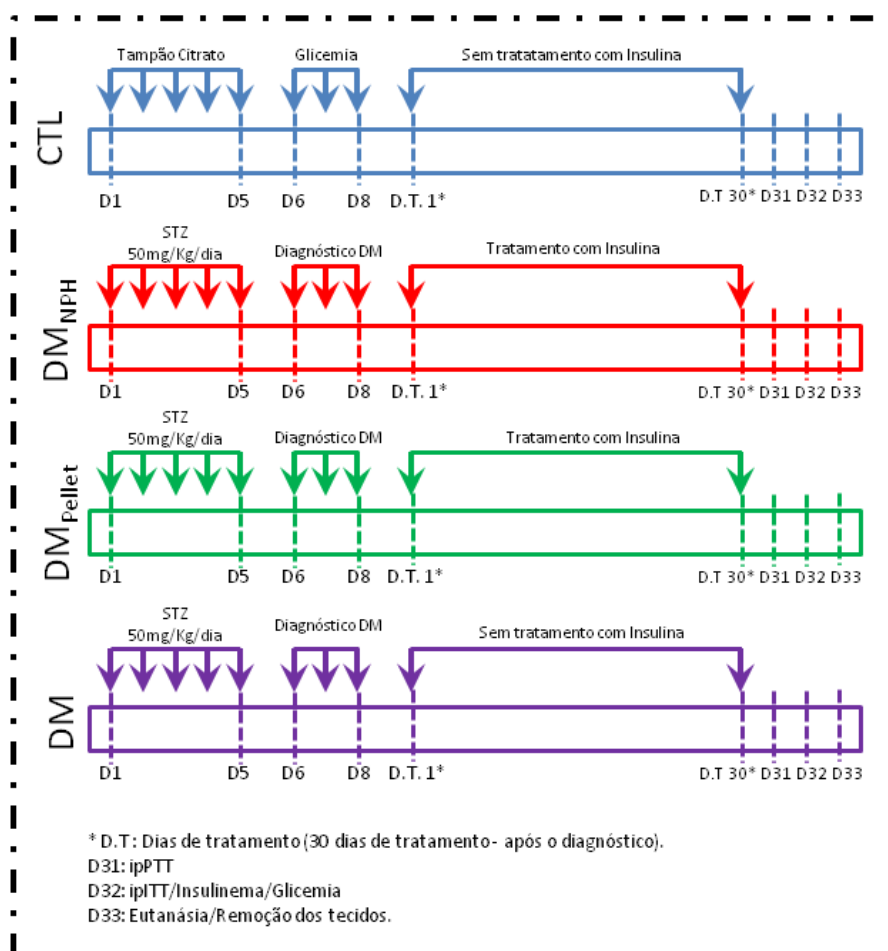
Grupo DM<sub>NPH</sub> (NPH) – Após o diagnóstico do DM, os animais desse grupo receberam o tratamento de duas doses diárias de insulina NPH (Humulin® N, Lilly) por 30 dias por via intraperitoneal. Foi aplicada diariamente 1U às 09 horas e 4 U às 19 horas.

Grupo DM<sub>pellet</sub> (PELLET) – Após o diagnóstico do DM, os animais pertencentes a esse grupo receberam um implante subcutâneo de pellet de liberação constante de insulina

(LinBit, LinShin Canadá), com liberação de 0.1U/dia/pellet. Foram implantados 2 pellets para os primeiros 20g de animal e um pellet para cada 5g que excedesse os 20g. Para as frações remanescentes do peso do animal entre 1 a 5 gramas finais, também foi adicionado um pellet conforme estabelecido pelo fabricante.

O término do tratamento ocorreu com a última aplicação de 1 U de insulina NPH às 09 horas do 30º dia. No do dia seguinte, no período matutino, foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (ipPTT). Um dia antes da eutanásia, foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) e ao final, realizado a eutanásia com a coleta do plasma e dos tecidos (Figura 4).

**Figura 4:** Delineamento Experimental



Fonte: Elaborado pela Autora. Vide nota de rodapé <sup>1</sup>

<sup>1</sup> **Nota de Rodapé:** As doses de insulina NPH foram estabelecidas em Projeto Piloto com base na seguinte publicação: Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. (PINHEIRO; ANDREAZZI; COSTA, 2011).



### 4.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA

A massa corporal foi mensurada semanalmente em balança digital eletrônica (SF 400) até a eutanásia. A glicemia foi verificada sempre no período matutino (estado alimentado), realizando-se um pequeno corte na ponta da cauda e desprezando-se a primeira gota de sangue. O glicosímetro utilizado foi o Accu-Check® Performa (Roche, Alemanha).

### 4.4 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (ipPTT)

Após jejum de 16 horas, a glicemia foi avaliada no tempo 0' (basal) e após 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos da administração intraperitoneal de uma solução de piruvato (1g/Kg de massa corpórea).

### 4.5 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ipITT)

Após um período de privação de alimento de 1,5 hora, a glicemia foi verificada no tempo 0' (basal) e após 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos da aplicação intraperitoneal de insulina regular Humulin (1U/kg de massa corpórea) diluída em salina (0,9% de NaCl). A taxa de constante de decaimento da glicose ( $k_{ITT}$ ) foi calculada a partir das concentrações de glicose plasmática durante a fase de decaimento linear, utilizando a fórmula  $0.693/t_{1/2}$ .

### 4.6 CLEARANCE DE INSULINA *IN VIVO*

Para avaliação do *clearance* de insulina, amostras de plasma foram coletadas, com auxílio de capilares de vidro heparinizados, durante o durante o ipITT. As coletas ocorreram nos tempos: 0' (antes da aplicação), 5, 15, 30 e 60 min após a administração de 1U/kg de insulina. Após determinação das concentrações de insulina, calculamos a remoção da insulina da circulação analisando o delta entre a insulinemia no tempo 15' e no tempo 60'.

### 4.7 DOSAGEM DE INSULINA

As concentrações plasmáticas de insulina foram determinadas utilizando o kit comercial Rat/Mouse Insulin ELISA (Cat. EZRMI-13K, MERK Millipore). Este é um ensaio colorimétrico baseado na metodologia ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). Nesse ensaio, os anticorpos anti-insulina da microplaca se ligam à insulina presente na amostra adicionada. Após a lavagem, um segundo anticorpo, anti-insulina biotilado (que se ligará à enzima peroxidase) é adicionado. Forma-se um complexo

anticorpo/insulina/anticorpo ligado à peroxidase. É realizada uma nova lavagem para retirar os anticorpos (unidos à peroxidase) que não se ligaram e por fim, é adicionado o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Este substrato (TMB) reage com a peroxidase e forma um produto colorido que é lido por um leitor de microplaca nos comprimentos de onda 450 e 590nm. É gerada uma curva padrão de análise a partir de concentrações conhecidas de insulina que são fornecidas pelo kit e a partir dessa curva, determina-se a concentração de insulina das amostras pela interpolação da absorbância versus concentração correspondente do padrão de insulina.

#### 4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA IDE

A atividade da enzima IDE foi avaliada utilizando o kit comercial SensoLyte® 520 IDE Activity (Cat. AS- 72231, AnaSpec, Fremont, CA). Para a obtenção da amostra a ser analisada, as alíquotas de tecido hepático foram homogeneizadas em tampão fornecido junto com o kit comercial e, em seguida, centrifugadas a 10000g a 4°C por 15 minutos para remoção do material insolúvel. O teste seguiu-se de acordo com as instruções do fabricante e, ao final, a atividade total da enzima foi normalizada pelo conteúdo total de proteína da amostra. O cálculo da atividade total da enzima foi realizado utilizando a seguinte equação: Atividade da IDE =  $(A1-A0/T*V)*D$ , sendo A1 a concentração do produto da reação (5-FAM) em 60 min, A0 a concentração do produto no tempo 0 min, T o tempo total do ensaio, V o volume das amostras e D a diluição das amostras.

#### 4.9 COLETA DE TECIDOS

Após jejum de 8 horas os animais foram eutanasiados em câmara de isoflurano seguida de decapitação. Foram coletados o pâncreas, fígado, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo perigonadal e o sangue total em tubo contendo heparina para a obtenção do plasma. Para avaliarmos a sinalização da insulina (AKT fosforilada,) alguns animais de cada grupo (CTL, DM<sub>NPH</sub>, DM<sub>Pellet</sub> e DM) receberam 10 minutos antes da eutanásia a aplicação de 10 U de Insulina Regular (Humulin®) pela via intraperitoneal.

Todos os tecidos e órgãos foram pesados em balança digital (TECNAL, SP, Brasil) logo após a sua extração. Um fragmento do fígado e o músculo esquelético (gastrocnêmio) foram estocados em freezer -80°C para posterior análise da sinalização da insulina pela

técnica do *Western Blot*. Além disso, um fragmento do fígado foi reservado para a atividade da IDE e o plasma foi utilizado para dosagens das transaminases e dosagens do perfil lipídico.

#### 4.10 WESTERN BLOT

Fragmentos de fígado e músculo gastrocnêmio, foram homogeneizadas em tampão de extração de proteína (EDTA 10mM, Tris base 100mM, Pirofosfato de Sódio 100mM, Fluoreto de Sódio 100mM, Ortovanato de Sódio 10mM, PMSF 2mM, Triton 10% e Água MILIQ). Após a realização desta etapa, os extratos foram centrifugados a 12000 rpm 4°C por 30 min para remoção do material insolúvel. As proteínas contidas nos extratos foram dosadas por meio do método de Bradford, tendo como base uma curva padrão de albumina (BSA). As amostras foram então tratadas com tampão Laemmli (20 % do volume da amostra) contendo DDT 10 mM e aquecidas a 100°C por 5 min. Aliquotas das amostras em concentrações proteicas semelhantes foram aplicadas e submetidas à eletroforese no SDS-PAGE (10 % Tris acrilamida) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas por um período de 1,5 hora em solução de bloqueio (TBST, 5% BSA) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. As membranas foram então lavadas com TBST e incubadas *overnight* com anticorpo primário específico a 4°C (Quadro 1)

**Quadro 1:** Anticorpos primários utilizados na técnica de Western Blott

Proteína Alvo	Empresa	Código	Diluição
IDE	Abcam, MA, USA	ab32216	1:1000
CEACAM	Cell Signaling, MA, USA	#14771	1:1000
p-AKT 1/2/3 (Thr 308)	Santa Cruz Biotechnonology	Sc16646	1:1000
GAPDH	Santa Cruz Biotechnonology	Sc20358	1:1000

Fonte : Elaborado pela autora.

Após incubação com anticorpo primário as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário adequado por 2 horas. Ao final, as membranas foram reveladas por quimiluminescência por meio do sistema de fotodocumentação ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, USA). A intensidade das bandas foram medidas e quantificadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EUA. Os valores das bandas foram normalizados pelos valores do controle interno GAPDH.

#### 4.11 PERFIL LIPÍDICO E ENZIMAS HEPÁTICAS - ALANINA AMINO TRANSFERASE (ALT) E ASPARTATO AMINO TRANSFERASE (AST).

Os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e suas frações, bem como as dosagens de ALT e AST foram realizadas por um ensaio enzimático ou colorimétrico nas amostras de plasma obtidas na eutanásia por método automatizado. Os reagentes utilizados foram os cartuchos comerciais da Siemens e o equipamento utilizado foi o Dimension RXL MAX®.

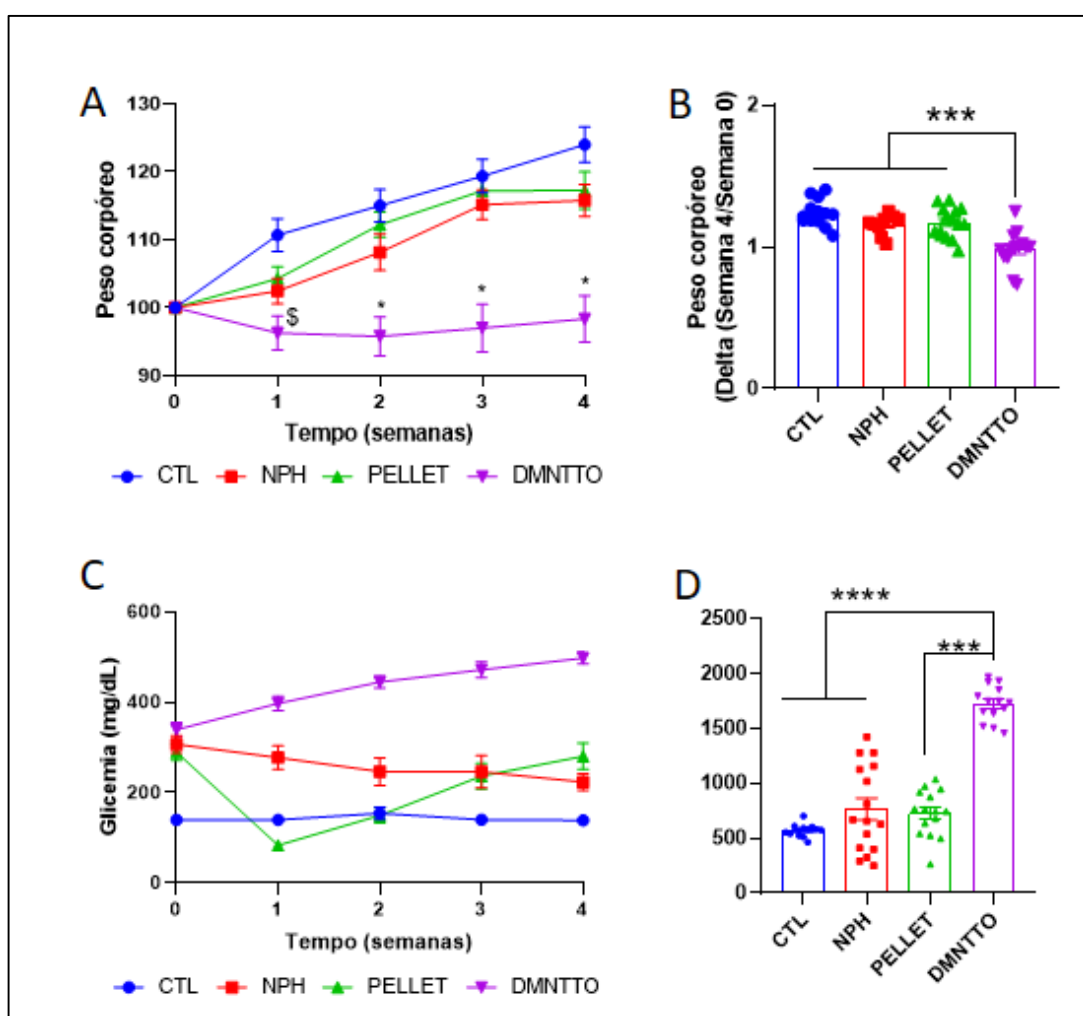
#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a tabulação dos dados, possíveis *outliers* foram identificados pelo teste de Grubbs. Para análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey ou teste “t” de *Student* quando os valores passaram em ao menos um teste de normalidade, dentre o teste D’Agostino & Pearson, o teste Shapiro-Wilk e o teste Kolmogorov-Smirnov. Para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn’s. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.1. e os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) quando realizados testes paramétricos e mediana e intervalo interquartil quando aplicados os testes não paramétricos. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA E GLICEMIA

Como era esperado, os animais do grupo controle ganharam massa corporal ao longo das 4 semanas de acompanhamento, atingindo um ganho percentual de 24% em relação ao seu peso inicial. Fica ainda evidente que houve um prejuízo no crescimento dos animais do grupo DM sem nenhum tratamento, com uma perda 2,3% em relação ao peso inicial. Esse prejuízo do ganho de peso não foi observado nos animais tratados com Insulina NPH ou Pellet (Figura 5A/B).



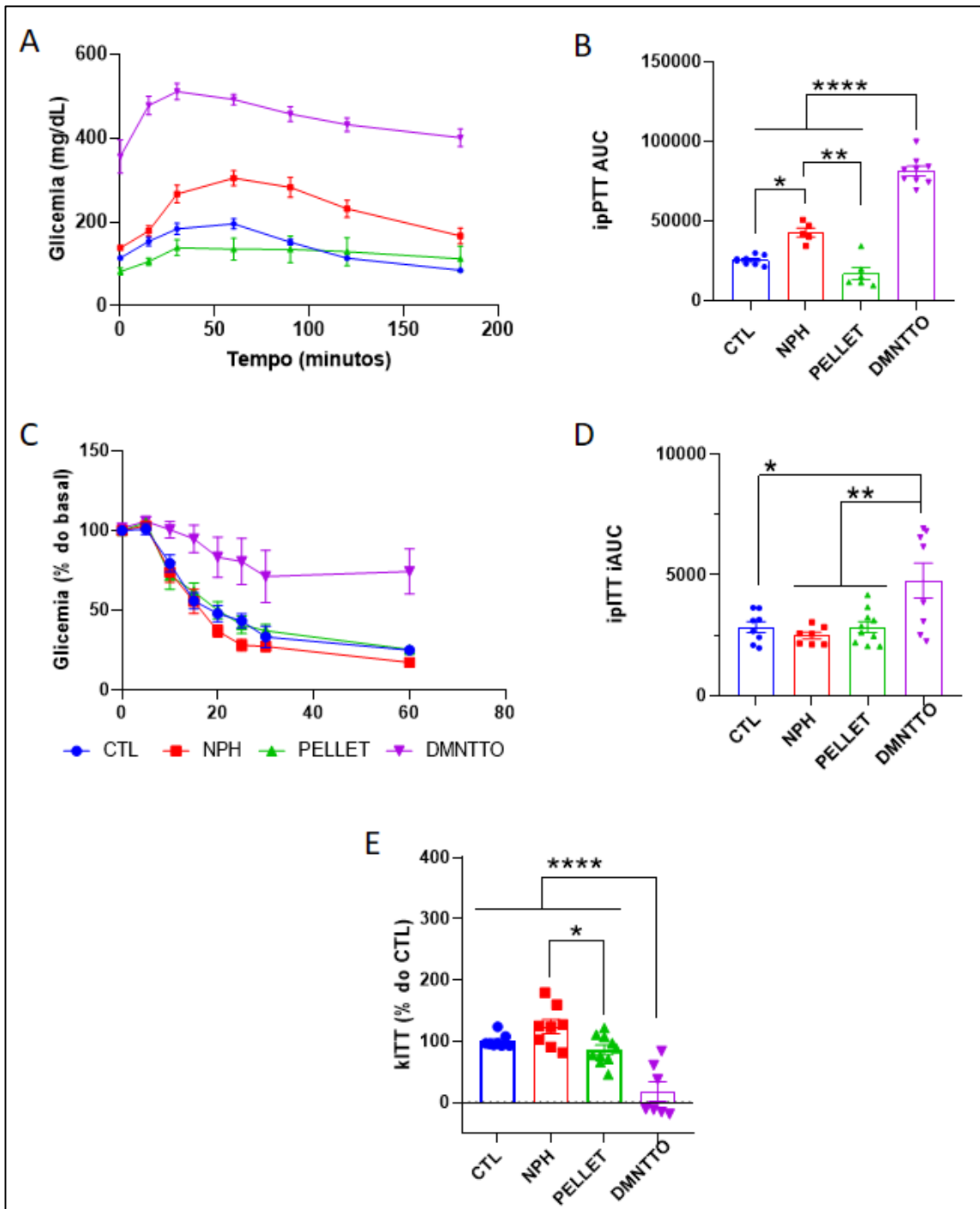
**Figura 5.** Avaliação do peso e da glicemia ao longo do tempo. Acompanhamento do peso (A) e a respectiva área-sob-a-curva (B), e da glicemia (C) e da respectiva área-sob-a-curva (D) em 4 semanas. CTL n= 13, NPH n = 17, Pellet n= 15, DM n=15. Em A (\$) = indica diferença entre o grupo CTL vs DM e (\*) = indica diferença entre grupo CTL, NPH e Pellet vs DM. Dados representados pela média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido de pós Teste de Tukey.

Para validar nosso modelo de Diabetes *Mellitus* e a eficiência dos diferentes tratamentos, avaliamos a glicemia no estado alimentado ao longo de todo o período experimental. Um percentual de 93,55% dos animais foram considerados diabéticos (glicemia  $\geq 200$ mg/dL por 2 dias consecutivos). Observamos que os animais do grupo DM apresentaram uma glicemia elevada, com valor médio na quarta semana de 497,5 mg/dL (Figura 5C). Ainda, constatamos que tanto o tratamento com Pellet e com insulina NPH foram eficazes, uma vez que os animais de ambos os grupos DM<sub>NPH</sub> e DM<sub>PELLET</sub> apresentaram glicemia reduzida em comparação com o grupo não tratado e similar ao CTL (Figura 5C/D).

## 5.2 TOLERÂNCIA AO PIRUVATO E TOLERÂNCIA À INSULINA

Para determinar o efeito dos diferentes tipos de tratamento com insulina bem como da ausência de intervenção farmacológica (grupo DM) sobre a produção hepática da glicose, os animais foram submetidos ao teste de tolerância ao piruvato. Como demonstrado na Figura 6 A e B, é possível perceber que os animais do grupo DM exibem uma curva glicêmica acentuadamente elevada quando comparado aos demais grupos e que os valores da área sob a curva (AUC) apontam para uma redução da tolerância ao piruvato significativamente menor frente aos outros grupos. Ainda, o grupo NPH também exibe uma curva um pouco exacerbada frente aos outros grupos, indicando que há uma maior produção hepática de glicose nesse grupo. Cabe ressaltar que não se observa essa diferença entre os grupos CTL e grupo DM<sub>PELLET</sub>, demonstrando que estes grupos comportam-se de maneira semelhante em relação à produção hepática de glicose (Figura 6A/B).

Para aferir a sensibilidade periférica à insulina avaliamos a glicemia dos animais após uma carga exógena de Insulina. Observamos que o decaimento da glicemia induzido pela insulina nos animais DMNTTO foi expressivamente menor em comparação aos outros grupos, indicando que esses animais apresentavam RI. Ambos os tratamentos foram eficazes na prevenção da instauração da RI induzida pelo DM1 (Figura 6C-E).

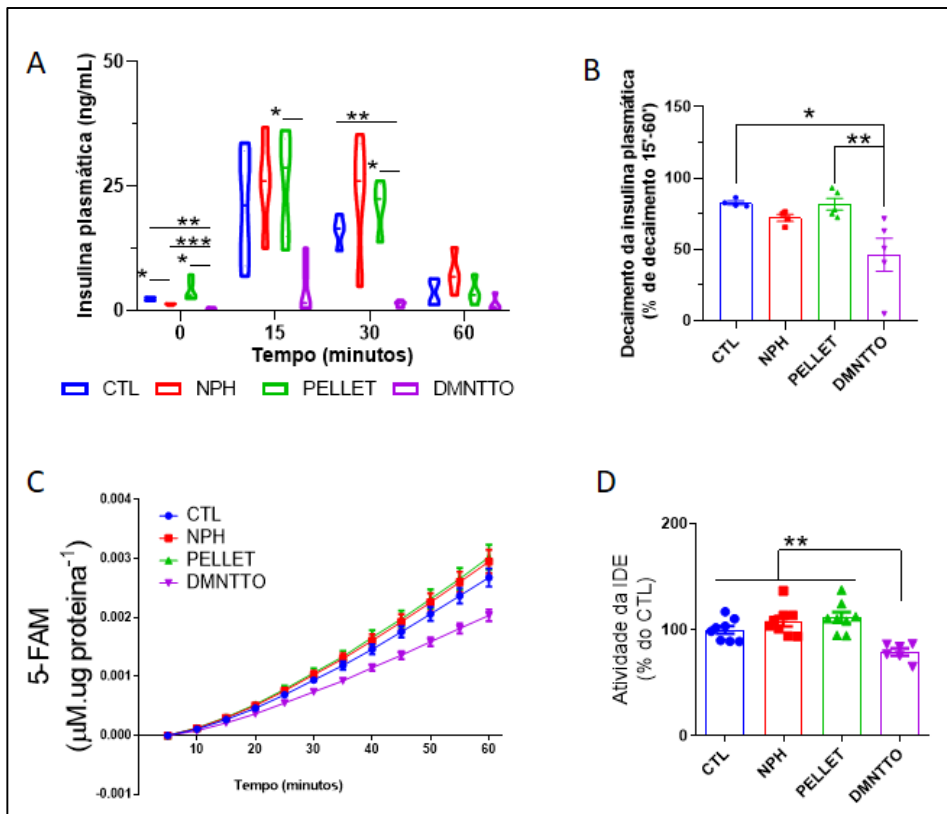


**Figura 6**– Glicemia durante o ipPTT e ipITT. Glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância ao piruvato (A) e a respectiva área sob a curva (B), glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (C), área sob a curva (D) e a respectiva constante de decaimento (E). CTL n= 8, NPH n= 5-8, Pellet n= 6-10, DM n= 7-9. Dados representados pela média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey.

### 5.3 CLEARANCE DE INSULINA E ATIVIDADE DA IDE

Para aferir o *clearance* de insulina nos diferentes grupos, avaliamos a insulinemia durante o ipITT e a atividade da IDE hepática. Na figura 7A observamos que, apesar de todos os grupos apresentarem o pico da insulina plasmática 15 minutos após a injeção de insulina, o grupo DMNTTO apresentou valores reduzidos de insulinemia durante todo o tempo (Figura 7A). Para medir a eficiência na remoção da insulina da circulação, avaliamos a porcentagem de decaimento da insulina entre os tempos 15 e 60 minutos e observamos que o grupo DMNTTO apresentou a menor taxa de remoção da insulina (Figura 7B). Isso nos indica que o DM1 parece alterar a capacidade do organismo em depurar a insulina plasmática e que os tratamentos testados foram eficazes em restabelecer essa capacidade.

Aprofundando nossas investigações no processo de *clearance* de insulina, aferimos a atividade da IDE hepática e observamos uma redução da atividade desta enzima nos animais diabéticos não tratados (Figura 7C/D).



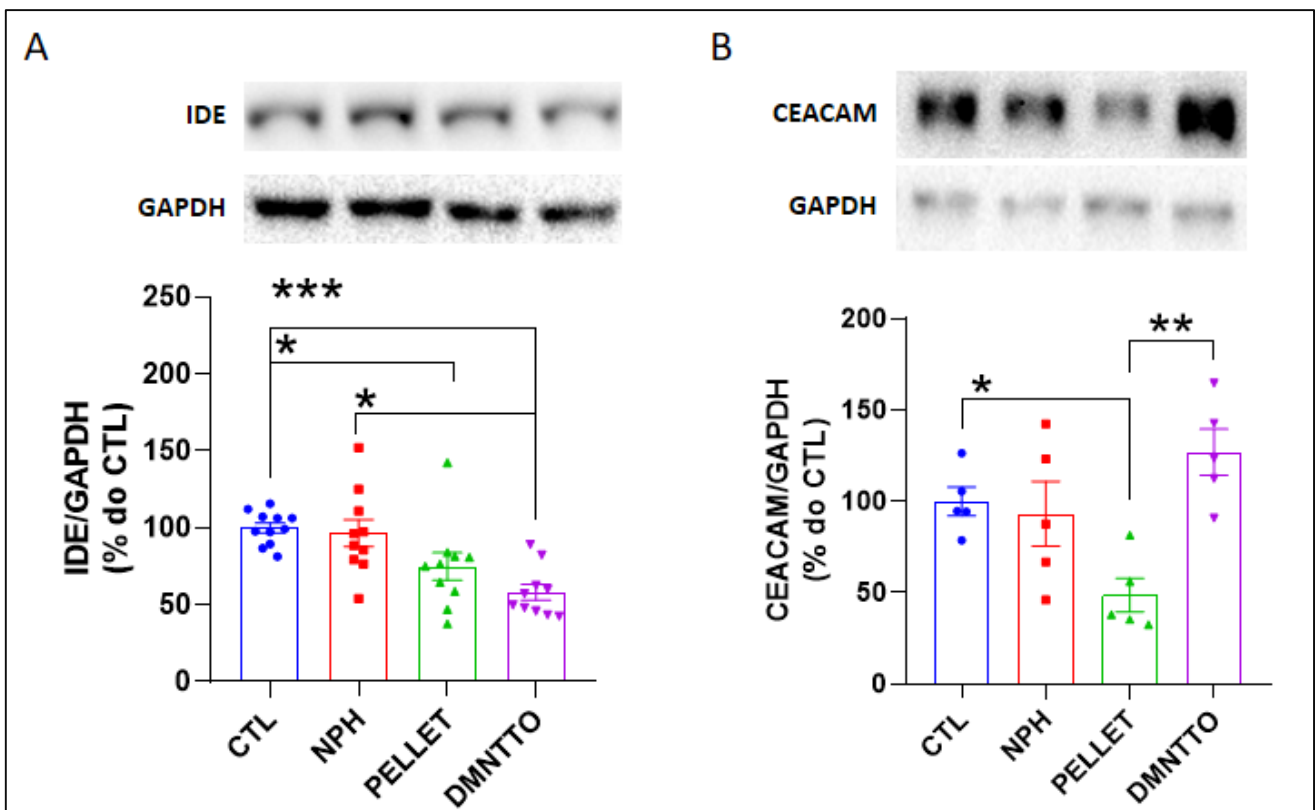
**Figura 7-** Insulina plasmática durante o ipITT e atividade cinética da IDE. Insulina plasmática durante o ipITT (A), % de decaimento de insulina de 15'- 60min (B), Atividade cinética da IDE de fragmento hepático (C) e Atividade total da IDE em relação ao controle (D). CTL n= 4- 8, NPH n=4-8, Pellet n=4-8, DM n=5-6. Dados representados pela média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey.



#### 5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA IDE E DA CEACAM EM FRAGMENTO HEPÁTICO

Ao analisarmos o conteúdo proteico da IDE e da glicoproteína CEACAM, constatamos que, em comparação aos grupos CTL e NPH, o grupo DM apresentou uma diminuição de conteúdo proteico da IDE (Figura 8 A/B).

Além disso, o grupo Pellet apresentou uma redução tanto da expressão proteica de IDE quanto de CEACAM em relação ao grupo CTL, sendo significativa também a diferença da CEACAM em relação ao grupo DM (Figura 8 A/B).



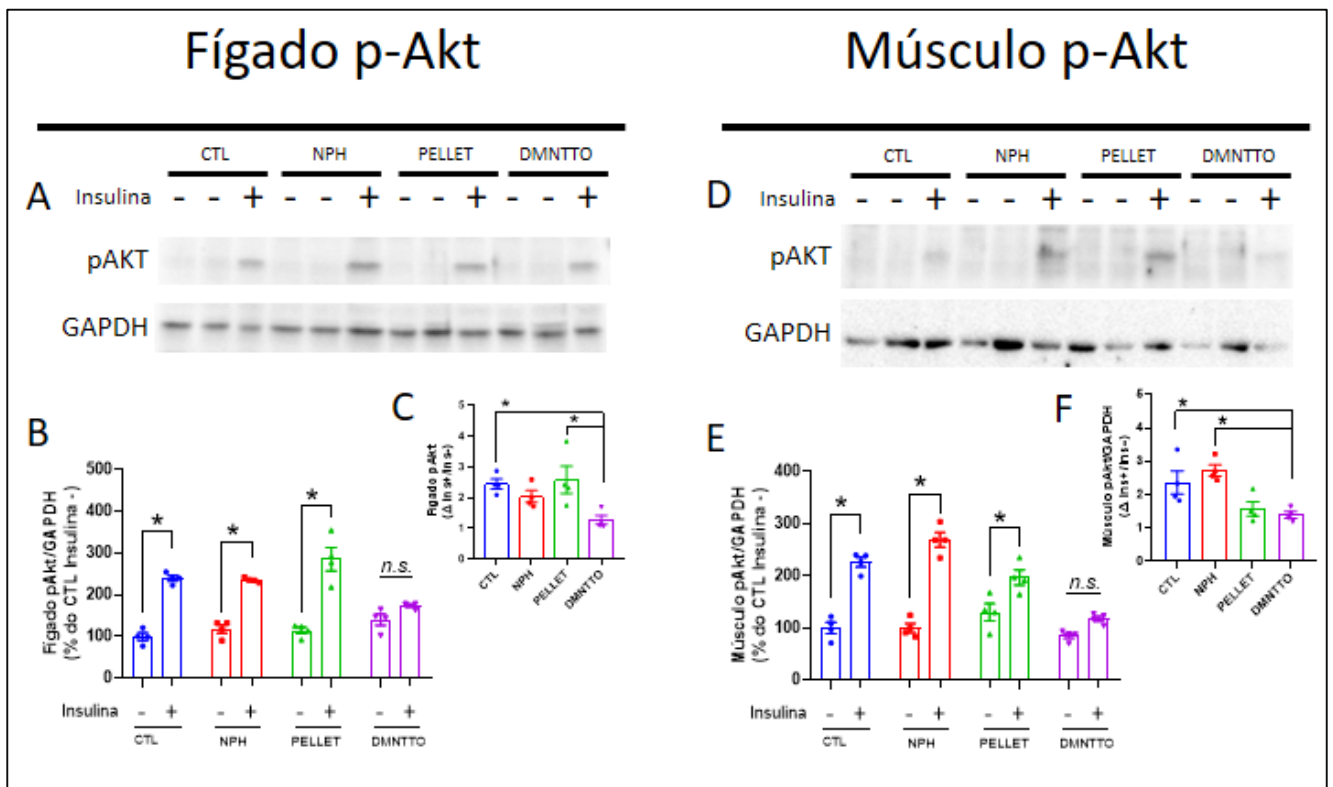
**Figura 8** – Conteúdo proteico hepático de IDE e CEACAM. Conteúdo proteico da enzima IDE (A), conteúdo proteico da glicoproteína CEACAM (B). CTL n=5-11, NPH n= 5-10 Pellet n= 5-10, DM n= 5-10. IDE: Dados são mediana e intervalo interquartil e foi aplicado teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. CEACAM: Dados representados pela média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey.

#### 5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE AKT FOSFORILADA

Para avaliarmos a sinalização da insulina no fígado e no músculo esquelético, analisamos o conteúdo proteico de Akt fosforilada (p-Akt).

Conforme demonstrado na Figura 9 B/ E, 10 minutos após uma injeção de insulina (10 U), o conteúdo de p-AKT aumentou de forma significativa tanto no fígado (Figura 9B) quanto no músculo gastrocnêmio (Figura 9E) nos grupos CTL, Pellet e NPH.

No entanto, esse efeito não foi observado no grupo DMNTTO. Após a administração da insulina, o conteúdo de p-AKT não sofreu alterações (Figura 9B/E). Além disso, pode-se dizer que somente o grupo DM apresentou um prejuízo significativo na sinalização da insulina no fígado e no músculo em comparação ao controle (Figura 9C/F).

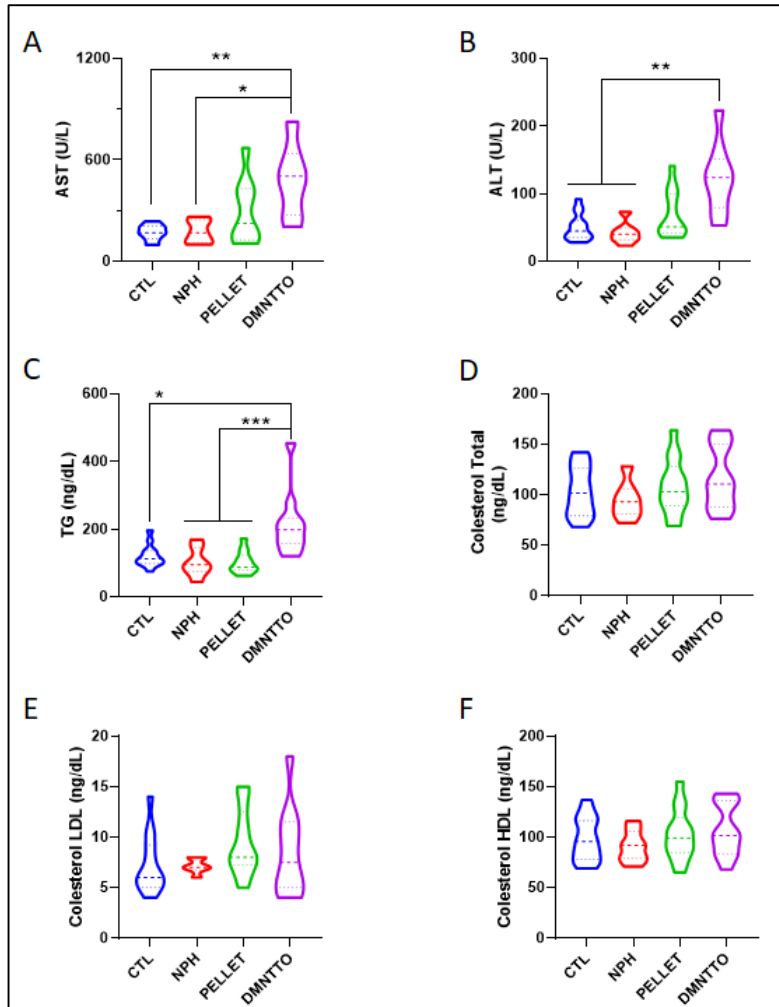


**Figura 9.** Expressão proteica de Akt fosforilada no fígado e no músculo gastrocnêmio. Imagem representativa da expressão de p-AKT no fígado (A) e no músculo (D), expressão de p-AKT no fígado (B) e no músculo (E) sem a administração de insulina (-) e com insulina (+), gráfico de inserção: diferença entre p-AKT com insulina e sem insulina no fígado (C) e no músculo (F). CTL n= 4 , NPH n = 4 , Pellet n= 4 , DM n= 4. Dados representados média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . (B) e (E): Diferenças estatísticas determinadas por teste “t” de Student. (C) e (F): Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey.

## 5.6 AVALIAÇÃO DAS TRANSAMINASES HEPÁTICAS E COLESTEROL (TOTAL E FRAÇÕES)

De acordo com os dados apresentados na Figura 10 A/B, os animais do grupo DM exibem valores aumentados nas duas transaminases avaliadas quando comparados aos

animais do grupo CTL e ao grupo NPH. Além disso, há um aumento no conteúdo plasmático de triglicerídeos do grupo DM quando comparado a todos os demais grupos experimentais (Figura 10D). Tanto o colesterol total quanto HDL e LDL, não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos comparados (Figura 10D-F).



**Figura 10.** Concentração plasmática de Colesterol Total (e frações), ALT e AST.. Concentração plasmática de AST (A), ALT (B), Triglicerídeos (C), Colesterol Total (D), LDL (E) e HDL (F). CTL n= 7-14, NPH n = 5-7, Pellet n= 9-13, DM n=7-12. Dados representados pela média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . HDL, AST e Colesterol Total: Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey. TG, ALT e LDL: dados representados por intervalo interquartil e mediana e diferenças estatísticas determinadas por Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's.

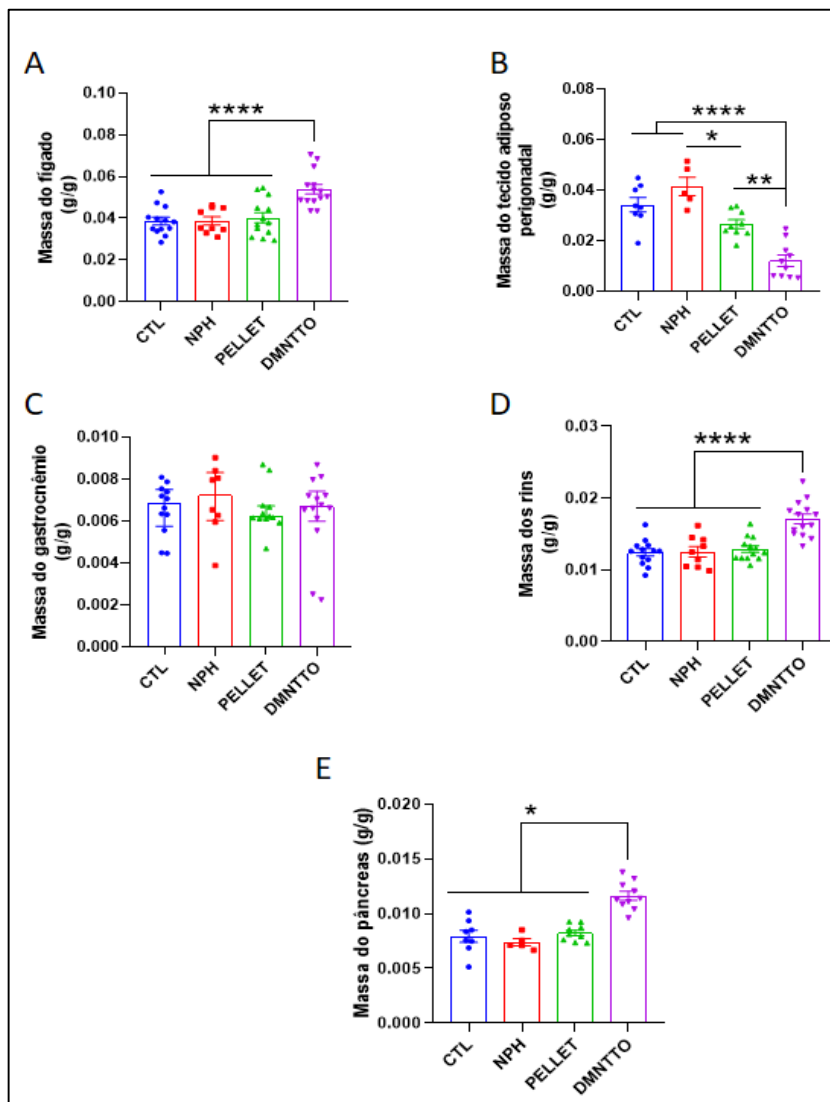
## 5.7 AVALIAÇÃO DA MASSA RELATIVA DOS ÓRGÃOS

Como esperado, os animais diabéticos sem nenhum tratamento (DM) apresentaram uma diminuição significativa da massa de tecido adiposo perigonadal quando comparados a

todos os demais grupos (Figura 11 B). A massa do músculo esquelético gastrocnêmio, entretanto, não sofreu redução, sendo considerada similar aos demais grupos (Figura 11 C).

No entanto, é possível perceber que os rins, pâncreas e o fígado dos animais do grupo DMNTTO apresentaram um aumento da sua massa o que nos indica que pode haver modificações nesses tecidos ao longo do curso da doença (Figuras 11 A, D e E).

Importante aqui ressaltar que para obtermos os valores do peso relativo dos órgãos, utilizamos o peso corpóreo de cada animal para a normalização dos valores.



**Figura 11** – Massa relativa dos órgãos dos animais. Massa relativa do fígado (A), do Tecido Adiposo Perigonadal (B), do Músculo esquelético gastrocnêmio (C), dos Rins (D) e do Pâncreas (E). CTL n= 8-13, NPH n=5-9, Pellet n=9-13, DM n=10-14. Dados representados por média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey. Para Músculo esquelético: dados representados por intervalo interquartil e mediana. Realizado teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's.

## 6 DISCUSSÃO

Conforme detalhado ao longo da introdução deste trabalho, a depuração de insulina exerce um importante efeito na homeostase da glicose e sensibilidade à insulina em situações tanto fisiológicas quanto patológicas (BRANDIMARTI et al., 2013). Os pacientes DM1 que fazem tratamento com a reposição da insulina exógena necessitam de um ajuste (acrécimo) da dose ao longo do tratamento para a manutenção da euglicemia (HIRSCH, 1999; KHALANGOT et al., 2009). Nesse sentido, este estudo dedicou-se a avaliar o *clearance* de insulina em animais diabéticos tratados pelo período de 30 dias com insulina NPH ou pellet de infusão contínua de insulina, tendo ainda um grupo de animais diabéticos sem tratamento e um grupo de animais controle na composição do delineamento experimental. Além disso, avaliamos também se os animais desenvolviam RI ao final desse período.

Para iniciarmos nossas investigações, inicialmente geramos nosso modelo de estudo de DM1 pela aplicação por 5 dias consecutivos de doses sub diabetogênicas de STZ, sendo o diagnóstico estabelecido após 2 mensurações de glicemia  $\geq 200\text{mg/dL}$ .

Pelo acompanhamento semanal do peso corpóreo, os animais do grupo DM apresentaram uma perda de 2,3% na massa corpórea. Nesse aspecto, enquanto a insulina apresenta um efeito anabólico, sua ausência apresenta um efeito oposto. Quando essa falta de hormônio é persistente, são recrutadas diversas reservas energéticas que irão não só afetar o metabolismo da glicose, mas também o de lipídios e proteínas (COOKE; PLOTNICK, 2008). Dessa forma, os animais do grupo DM acabam entrando em um estado catabólico que culmina em perda de massa corpórea.

O DM1 é uma doença crônica que necessita de tratamento para o seu devido controle glicêmico. Nessa conjuntura, de acordo com os resultados apresentados, o grupo DM manteve uma hiperglicemia persistente em todo o período acompanhado. Além disso, a glicemia dos animais tratados com insulina, tanto o DM<sub>NPH</sub> quanto o DM<sub>Pellet</sub>, foi considerada similar ao grupo CTL. Outros trabalhos relataram resultados similares em roedores em relação à hiperglicemia e/ou perda de massa corpórea quando o DM1 é instaurado e é induzido pela STZ (LIU et al., 2006; RYDGREN; VAARALA; SANDLER, 2007; ALDAHMAH; EL-NAGAR; IBRAHIM, 2016).

Tomando esses dados de conjunto, podemos dizer que validamos o nosso modelo de DM1. Podemos dizer também que validamos o nosso tratamento com insulina nos animais diabéticos DM<sub>NPH</sub> e DM<sub>Pellet</sub>.

Além disso, ao se analisar a glicemia ao longo das 4 semanas (Figura 5 D), observa-se que há uma maior variação dos resultados glicêmicos apresentados pelo grupo DM<sub>NPH</sub> em relação ao grupo DM<sub>Pellet</sub>. Esses resultados estão de acordo com um trabalho conduzido por Grant e colaboradores (2012). No desenvolvimento de protocolos de tratamento com insulina em animais DM1, eles observaram que os camundongos diabéticos não obesos (NOD) apresentavam maiores flutuações de valores glicêmicos com a aplicação da insulina complexada com a protamina e zinco quando comparados com animais tratados com uma infusão contínua de insulina (GRANT et al., 2012).

Seguindo as nossas análises e no intuito de avaliarmos a tolerância ao piruvato, ao término do protocolo de 30 dias de tratamento, realizamos o ipPTT. Este é um teste que prediz a sensibilidade hepática à insulina, uma vez que a neoglicogênese ocorre predominantemente no fígado e a insulina é necessária para sua inibição. Sendo assim, o piruvato atua como um substrato para a produção de glicose e a glicemia é então avaliada ao longo do teste (EKBERG et al., 1999; ANDRADE-CETTO; VÁZQUEZ, 2010).

O aumento da produção endógena da glicose no grupo DMNTTO indica que houve um provável prejuízo na inibição da gliconeogênese hepática. Esse efeito, pode ser explicado ao menos em parte, considerando que a insulina é crucial nesse processo, pois promove a ativação da PI3K, inibindo assim a transcrição das enzimas envolvidas nesse processo, fosfoenolpiruvato carboxinase (PEPCK) e glicose 6 fosfatase (BARTHEL; SCHMOLL, 2003; ZHANG; LIU, 2014). Além disso, segundo Yosten (2018), os pacientes DM1 tendem a ter níveis de glucagon mais elevados, mesmo frente a uma glicemia elevada. Quando o diabetes já está instaurado com a manifestação da hiperglicemia após a perda de cerca de 80% da massa de células  $\beta$ , a massa de células  $\alpha$ , já não eficientemente inibida pela insulina, secreta níveis acentuadamente elevados de glucagon. O glucagon, que agora apresenta-se mais elevado em relação à insulina, aumenta o catabolismo e impulsiona também a produção hepática de glicose. E, ainda segundo este autor, mesmo que o tratamento seja iniciado e os níveis de glicose estejam controlados, ainda é comum haver episódios de hiperglicemia especialmente após uma refeição. Dessa forma, além da hiperglicemia pela falta da secreção da insulina pelas células  $\beta$ , provavelmente ainda há a contribuição da gliconeogênese pelos

níveis aumentados de glucagon, prejudicando ainda mais a glicemia nesse grupo de animais que carecem de insulina. Entretanto, o tratamento com a infusão contínua de insulina (DM<sub>Pellet</sub>) foi capaz de reverter esse prejuízo, pois conforme apresentado nos resultados, esse grupo apresentou valores de glicemia semelhantes ao do grupo controle durante o teste.

Em relação à produção hepática de glicose do grupo DM<sub>NPH</sub>, houve também um incremento nas concentrações de glicose nesse grupo, menor em relação ao grupo DM, mas com diferença estatística em comparação aos demais grupos. Petersen e colegas (2004), avaliaram a contribuição da glicogenólise hepática e da neoglicogênese para a glicemia em pacientes DM1 com controle glicêmico moderado (HbA1C média de 7,9%) em relação a pacientes saudáveis em repouso e durante o exercício físico. Os pacientes DM1 faziam o uso da insulina NPH e apresentavam uma glicemia de repouso significativamente mais alta que o grupo controle, com concentração de glucagon e epinefrina semelhante ao controle. Portanto, com os resultados obtidos nesse trabalho, eles concluíram que a elevação da glicemia era decorrente da contribuição da neoglicogênese (PETERSEN; PRICE; BERGERON, 2004).

Para avaliarmos a resistência à insulina, um dia antes da eutanásia, realizamos o ipITT. Nesse teste, após a administração de uma dose suprafisiológica de insulina, avalia-se a glicemia ao longo do tempo. Essa análise, somada ao cálculo do decaimento da glicose (Kitt) nos indica a captação da glicose pelos tecidos periféricos, principalmente pelo músculo, estimulada pela insulina (WAJCHENBERG et al., 1999).

Nesse ponto, vale dizer que alguns autores defendem a noção do desenvolvimento do quadro de RI no DM1 como sendo decorrente da hiperinsulinemia proveniente da terapia com a insulina (LIU et al., 2009; CATALANO et al., 2014). Porém, esse é um tema que ainda não existe consenso na literatura.

Sob esse aspecto, dois estudos importantes avaliaram a sensibilidade à insulina de pacientes DM1 em comparação com indivíduos saudáveis através da técnica do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico e sugeriram que a hiperglicemia parece ser responsável por uma considerável parcela no desenvolvimento da RI (DEFRONZO; HENDLER; SIMONSON, 1982; PRATO et al., 1997). Nossos resultados apontam para o desenvolvimento de uma RI no grupo DM sem tratamento que pode ser decorrente do quadro de hiperglicemia crônico apresentado por esse grupo. Segundo Kaul e colegas (2015), alguns mecanismos propostos pelos quais a hiperglicemia pode atenuar a transdução de sinal da

insulina vão desde um maior desvio da glicose para a via da hexosamina, ativação de vias de cinases de estresse como JNK (do termo inglês *c-Jun N-terminal kinases*) assim como isoformas de proteína quinase C (PKC) e, aumento e acúmulo na formação de produtos finais de glicação avançada (AGE).

Ainda nesse sentido, os animais do NPH e Pellet se mostraram sensíveis à insulina no ipITT. Isso nos leva a crer que a RI parece ser revertido com o tratamento com insulina nesse protocolo de 30 dias ou que o desenvolvimento da RI seja dependente do tempo de duração da doença. Yki-Järvinen e Koivisto (1986), ao avaliarem grupos de indivíduos portadores de DM1 em função do tempo de duração da doença, observaram que os pacientes com mais de 20 anos de diagnóstico apresentavam uma exacerbada diminuição da sensibilidade à insulina em comparação com os indivíduos com menos de 1 ano de diagnóstico.

Continuando nossas análises, agora *ex vivo*, dosamos as enzimas: Alanina amino transferase (ALT) e Aspartato amino transferase (AST), para verificarmos possíveis danos hepáticos. Essas enzimas são encontradas principalmente no fígado. No entanto, apesar de não serem específicas desse órgão, são muito utilizadas na prática clínica em conjunto com outras dosagens laboratoriais tanto no estabelecimento do diagnóstico quanto no acompanhamento de doenças hepáticas. Quando há dano celular, a membrana da célula se torna mais permeável e assim essas enzimas acabam atingindo a corrente sanguínea, podendo dessa maneira ser encontradas elevadas nas amostras de soro ou plasma (HUANG et al., 2006; KIM et al., 2008). Nossos resultados mostraram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de AST e ALT somente no grupo DM quando comparado ao grupo CTL. Isso nos indica que o DM1 leva a um possível dano hepático, o qual é impedido de se desenvolver com os tratamentos de insulina testados.

A fim de avaliarmos o perfil lipídico, nessas mesmas amostras realizamos as dosagens do colesterol (total e frações). As dislipidemias no DM1 são bastante relatadas na literatura, tanto em trabalhos com humanos quanto com animais, e se relacionam mais com situações de descontrole glicêmico (TASKINEN; NIKKILÄ, 1979; VANNINI et al., 1984; DULLAART, 1995). Nesse trabalho, encontramos um aumento das concentração de triglicerídeos no grupo de animais DM sem tratamento. Os dados encontrados corroboram com a literatura. Diversos autores relatam resultados semelhantes (PATEL et al., 2013; CHOI; YOKOZAWA; OURA, 1991).



As alterações que ocorrem no metabolismo lipídico são decorrentes da falta de insulina em promover a lipogênese e inibir a lipólise no tecido adiposo. Nesse sentido, como a enzima lipase sensível à hormônio (HSL) acaba não sendo inativada, promove uma maior disponibilização de ácidos graxos na circulação que o fígado utiliza para produzir as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs). Além disso, frente ao cenário de falta de insulina e em condições excedentes de ácidos graxos, há também redução da atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL), diminuindo assim o catabolismo dos quilomicros e VLDLs. Como são ricos em triglicerídeos, o que se observa é um aumento de triglicerídeos plasmáticos (VERGÈS, 2009, 2020).

As alterações do perfil lipídico não foram encontradas no grupo tratado com insulina (DM<sub>NPH</sub> e DM<sub>Pellet</sub>). Alguns autores relatam que em casos de DM1 bem controlado, a dosagem de triglicerídeos apresenta-se normal ou até mesmo diminuída (DULLAART, 1995; HUGHES et al., 2016).

Uma característica a ser mencionada é que além da hipertrigliceridemia, os animais do grupo DM possivelmente também exibem níveis aumentados de ácidos graxos livres (AGL). Neste trabalho, nós não avaliamos os ácidos graxos livres no plasma. Porém, um estudo conduzido por Zabielski e colegas (2014) com camundongos C57Bl/6 demonstrou que os animais diabéticos com indução pela STZ, após 3 semanas exibiam níveis de ácidos graxos livres plasmáticos 2 vezes mais altos em relação ao grupo de animais tratados com pellets de insulina. (ZABIELSKI et al., 2014). Por isso, não podemos excluir que a RI seja decorrente também desse acúmulo de ácidos graxos e não somente da hiperglicemia crônica.

Seguindo nossas avaliações, ao realizarmos o ipITT, coletamos amostras de plasma para dosarmos a insulina e avaliamos seu decaimento ao longo do teste. O *clearance* de insulina avaliado dessa forma pode ser considerado como uma estimativa indireta da depuração hormonal *in vivo*, sendo esse método também utilizado de forma satisfatória por outros autores (BRANDIMARTI et al., 2013; TASCHETTO et al., 2021).

Continuando nessa linha, mensuramos a atividade da IDE e seu conteúdo proteico nas amostras de fígado. Nossos resultados mostram que o grupo DM apresenta uma depuração hepática de insulina diminuída que relaciona-se a uma menor atividade e expressão proteica da IDE no fígado.

Nesse perspectiva, embora haja controvérsias sobre o papel da IDE no *clearance* de insulina, alguns trabalhos que avaliam essa enzima, tem demonstrado que ela apresenta-se

alterada em diferentes contextos. Um estudo com camundongos *Swiss* machos submetidos a uma dieta padrão, avaliou o efeito do exercício agudo no *clearance* de insulina e na expressão de IDE. Conforme mencionado, houve uma queda da glicemia e da insulinemia nesses animais. Ao avaliarem os resultados obtidos na pesquisa, os autores concluíram que o exercício agudo aumenta a depuração de insulina possivelmente pelo aumento da expressão de IDE no fígado e músculo esquelético, sendo que essa modulação da IDE possivelmente constitui uma medida de segurança para manter a homeostase glicêmica, tornando assim o exercício físico mais seguro e eficaz (KURAUTI et al, 2016).

Recente publicação avaliando três períodos de gestação de ratas Wistar concluiu que a elevada demanda de insulina requerida no último período da prenhez (3ª semana), ocorre não apenas por uma diminuição da sensibilidade à insulina e aumento da massa e função de células  $\beta$ , mas esse processo pode também ser decorrente de uma contribuição do *clereance* hormonal. Em conclusão, os resultados mostraram uma associação entre a menor depuração de insulina e atividade de IDE hepática, sem alteração no conteúdo proteico total dessa enzima no fígado (TASCHETTO et al., 2021).

Outro trabalho, dessa vez utilizando camundongos deficientes para a IDE no fígado (L-IDE-KO) e alimentados com dieta rica em gordura, comparou a contribuição da deleção da IDE versus sua superexpressão funcional, tendo como objetivo investigar o papel regulador dessa enzima na homeostase da glicose e na sensibilidade à insulina. Os animais com a deleção da IDE, apresentaram intolerância à glicose, quadro de RI, sendo que a superexpressão da enzima normalizou esses parâmetros. Referente ainda aos animais L-IDE-KO, estes apresentaram níveis mais elevados de insulina de jejum e no estado alimentado, sem alteração no *clearance* de insulina. Diante dos dados apresentados nesse trabalho, eles concluíram que a função das células  $\beta$ , mas não a massa, é melhorada em animais L-IDE-KO e que esse fato deve-se a uma provável resposta compensatória à RI desencadeada pela perda da função da IDE hepática. Além do mais, os animais com a deleção da enzima exibiam ainda níveis mais baixos de fosforilação e de recetores de insulina hepáticos (MERINO et al., 2020).

Mesmo que parte desses trabalhos tenham observado alterações na insulinemia com ou sem alteração no *clearance* de insulina, esse fato muitas vezes parece envolver inicialmente as células  $\beta$  secretando mais insulina. Vale ressaltar nesse ponto que os nossos animais são modelos de DM1 e portanto, não possuem células  $\beta$  suficientes para compensar

a baixa quantidade de insulina que possuem. A literatura é escassa no que diz respeito ao *clearance* de insulina no DM1, mas levando em consideração os dados da depuração da insulina e da atividade e expressão da IDE no fígado, pode ser que fisiologicamente e na tentativa de atingir a homeostase glicêmica, o organismo responde reduzindo a depuração hormonal. Ademais, esses resultados estão de acordo com um antigo trabalho no qual ratos diabéticos Wistar induzidos por Aloxana, avaliados 6 dias após essa aplicação, tiveram uma significativa redução da degradação de insulina no fígado que foi restaurada aos níveis do controle em um grupo de ratos diabéticos tratados por 48 horas com insulina (UETE, TSUCHIKURA, 1972).

Quanto aos animais DM<sub>NPH</sub> e DM<sub>Pellet</sub>, a atividade da IDE não apresentou diferença estatística, mas houve uma menor expressão proteica da IDE e CEACAM1 no grupo Pellet. Esses resultados, podem estar relacionados à via de administração do fármaco. A insulina é liberada pelo pâncreas de forma bifásica e dessa maneira fisiológica, o conteúdo hormonal logo atinge o fígado onde sofre extensa depuração na primeira passagem. Quando a insulina é injetada pela via subcutânea, não há essa primeira extração hepática como ocorre fisiologicamente e a insulina basal periférica pode apresentar-se cerca de 2,5 vezes maior em pacientes DM1 em comparação a indivíduos sem diabetes com glicemia similar (GREGORY; CHERRINGTON; MOORE, 2020). No entanto, a aplicação pela via intraperitoneal se assemelha mais ao que ocorre fisiologicamente, disponibilizando ao fígado um maior quantitativo de insulina (LUKAS, BRINDLE, GREENGARD, 1971).

Ainda sob esta perspectiva, em especial referente ao grupo Pellet, o rim tem uma participação também no *clearance* e pode remover até 50 % de insulina da circulação periférica. E, em pacientes obesos tratados com insulina subcutânea, esse tipo de depuração de insulina parece ganhar uma maior importância. Quando há falência renal, a quantidade necessária de insulina reduz de forma considerável e há um aumento do potencial hipoglicemiante exercida por esse hormônio, chegando a casos de não necessitar da aplicação exógena quando o paciente ainda apresenta células  $\beta$  residuais funcionais (DUCKWORTH; BENNETT; HAMEL, 1998; VALERA MORA et al., 2003; CASTRO et al., 2014).

Como já dito neste trabalho, tem-se atribuído à CEACAM1 um importante papel na depuração de insulina, por isso, avaliamos como estava sua expressão proteica no fígado. Sobre a expressão da CEACAM1 no grupo Pellet já foi comentado.

No que diz respeito ao grupo DM, não encontramos diferença estatística no conteúdo proteico de CEACAM1 hepático quando comparado ao do grupo CTL. Destaca-se aqui que da mesma forma que há uma carência de estudos sobre DM1 e *clearance* de insulina, isso também ocorre em relação à CEACAM1. Mas, essa glicoproteína foi demonstrada estando alterada em diferentes circunstâncias. Um grupo de pesquisadores, trabalhando com camundongos C57BL/6J, submeteu os animais a uma dieta rica em gordura e investigou sobre o papel da CEACAM1. Eles observaram que a lipólise promoveu uma redução significativa nos níveis dessa proteína no fígado após 21 dias de dieta e que causou uma redução no *clearance* de insulina, bem como uma RI e esteatose hepática. Importante salientar que para que essa proteína exerça seu papel na depuração da insulina, precisa haver a fosforilação da CEACAM1 e esse evento ocorre depois que a insulina se liga ao seu receptor, o qual possui atividade tirosina cinase intrínseca (AL-SHARE et al., 2015; RUSSO et al., 2016). Nós não quantificamos a CEACAM1 fosforilada e portanto, não descartamos a hipótese de que esta fosforilação possa estar reduzida nos animais DM.

Outra situação que pode ser levada em consideração refere-se ao receptor de insulina interferindo no resultado final da insulinemia (DUCKWORTH, 1988). Nessa linha, uma pesquisa utilizando camundongos knockout para os receptores de insulina no fígado, mostrou que os animais apresentaram um aumento da secreção de insulina e diminuição acentuada da depuração hormonal, uma concentração de insulina 20 vezes maior no estado alimentado nesses animais quando comparados ao grupo controle, com níveis de glucagon normais. A sinalização da insulina no fígado desempenha papel chave na homeostase da glicose (MICHAEL et al., 2000). Ademais, foi sugerido que a IDE pode exercer também um papel não proteolítico que representaria uma forma pela qual essa enzima determina o destino final do receptor de insulina e portanto, sua atuação envolve a quantidade de IR que será exposto na membrana (NAJJAR; PERDOMO, 2019). Não tivemos sucesso em quantificar o IR dos tecidos, mas conseguimos quantificar a expressão proteica da fosforilação da AKT.

Vale lembrar que para haver a propagação da sinalização da insulina, precisa haver a ligação da insulina no receptor de insulina (PATTI; KAHN, 1998). Dessa forma, resolvemos avaliar como estava a sinalização da insulina pela fosforilação da AKT nesses animais. Mostramos que a sinalização insulínica hepática e no músculo gastrocnêmio foi significativamente reduzido no grupo DM. E esse dado é condizente com o resultado que

obtivemos no ipITT, no qual foi possível observar uma resistência à ação da insulina nesse grupo.

Quanto ao peso dos órgãos coletados na eutanásia, o grupo DM apresentou diferenças estatísticas significantes em relação ao fígado, rim, pâncreas e tecido adiposo perigonadal. Em relação a este último, já foi comentado que a carência da insulina apresenta um caráter catabólico com o recrutamento das reservas energéticas do organismo e portanto, além da diminuição do peso corporal, houve também a perda de tecido adiposo perigonadal.

Em publicações utilizando ratos, um grupo de pesquisadores induziu o DM em única dose de STZ e avaliaram o rim, fígado e pâncreas desses animais após 2, 4, 8 e 12 semanas da aplicação da STZ. Além da perda da massa corpórea, da poliúria e da hiperglicemia, os animais mais velhos (após 12 semanas) tiveram o peso relativo dos rins aumentados e a análise histológica revelou sinais de nefrotoxicidade avançada, com infiltração de linfócitos. A análise do fígado mostrou que além do aumento do peso relativo, histologicamente, o órgão apresentava acúmulo de gotículas lipídicas, infiltração de linfócitos, aumento de material fibroso e elevação de AST e ALT. Quanto ao pâncreas, não observaram redução relativa desse órgão (ZAFAR et al., 2009 ; ZAFAR, et. al. 2009a; ZAFAR, NAQVI, 2010). Um trabalho com camundongos *Swiss* no qual a STZ foi aplicada em dose única de 150 mg/kg, após 12 dias, não encontrou alterações nas transaminases hepáticas, mas o exame histopatológico mostrou alterações caracterizadas por infiltrações leucocitárias, esteatose moderada e inflamação que foram atribuídas aos danos celulares da hiperglicemia (ALDAHMAH; EL-NAGAR; IBRAHIM, 2016).

No que se refere ao aumento da massa dos órgãos, apesar de não apresentarmos neste trabalho as avaliações histológicas do fígado e do pâncreas, os resultados em conjunto apresentados ao longo deste trabalho, levam a crer que esse fato ocorreu em partes devido a um acúmulo de gordura nesses órgãos. O dano hepático observado nos animais DM pode ocorrer como o resultado de uma situação na qual primeiramente podemos considerar que a carência da insulina irá favorecerá o processo da lipólise do tecido adiposo em detrimento da lipogênese. Esse evento irá acarretará em um aumento de ácidos graxos livres no plasma e o acúmulo de AGLs pode provocar uma perturbação no sistema de  $\beta$ -oxidação hepática culminando em uma maior infiltração de gorduras no fígado (PIGHIN et al., 2005; TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO, 2013).

Além disso, outra hipótese que pode favorecer esse processo é que os AGLs e hiperglicemia são fatores que podem desencadear a ativação de NF $\kappa$ B e, uma vez ativado, esse fator de transcrição pode elevar a produção de citocinas pró inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Ao final desses eventos, além do aumento dos produtos da peroxidação de lipídios, haverá um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), favorecendo o surgimento de estresse oxidativo, reduzindo a  $\beta$ -oxidação de lipídios, promovendo a esteatose hepática e resultando em diversos eventos deletérios (TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO, 2013; MOHAMED et al., 2016).

Ainda sobre esse tema, segundo Tudies e colegas (2012), a hipótese da esteatose hepática no DM1 é que além das anormalidade no metabolismo das lipoproteínas, potenciais fatores envolvidos são decorrentes da hiper ativação induzida pela hiperglicemia de fatores de transcrição da proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos (CHREBP) e SREBP1c, pela regulação positiva do número de transportadores GLUT2 com consequente síntese de gordura intra-hepática ou uma combinação desses mecanismos.

Já em relação ao rins, segundo Amorim et al. (2019), o estado de hiperglicemia crônico desencadeia um processo de estresse oxidativo que relaciona-se com alterações funcionais e estruturais em diferentes células renais. Este processo é mediado por diversas vias metabólicas e apresenta-se interligado à inflamação e ao desequilíbrio redox, que ao final irão acarretar em injúria celular com evolução para a doença renal.

Em resumo, nossos dados nos permitem concluir que os animais diabéticos sem tratamento e acompanhados no protocolo de 30 dias apresentam uma hiperglicemia persistente que possivelmente contribuiu para a diminuição no *clearance* de insulina e redução na expressão proteica e atividade da IDE, atenuação da sinalização da insulina via fosforilação de AKT, quadro de RI hepático e periférico, dislipidemia, dano hepático, bem como possíveis danos renais e no pâncreas. E que o tratatamento com insulina, seja a NPH ou por meio do *pellet* de infusão contínua foi capaz de prevenir a maior parte desses desfechos deletérios. Além do mais, considerando as vias de administração da insulina SC e IP, o *clearance* renal pode exercer um papel mais importante na depuração da insulina periférica, principalmente pela via IP, uma vez que a insulina biodisponível não deve ter a primeira passagem pelo fígado assim como ocorre na secreção fisiológica.

## 7 CONCLUSÕES

Assim, mostramos pela primeira vez que os animais DM1 sem nenhum tratamento apresentam uma acentuada redução no *clearance* de insulina que vem acompanhado de uma menor expressão e atividade da enzima IDE no fígado e que esses eventos podem ser decorrentes de um mecanismo fisiológico do organismo em tentar elevar a quantidade de insulina circulante. Além disso, há indução de um acentuado quadro de resistência à insulina, com inúmeros desfechos metabólicos desfavoráveis e com o comprometimento e impacto em diversos órgãos.

E que o tratamento com insulina por 30 dias, mesmo que com suas singularidades, reverte boa parte dessas alterações. Esses dados podem alertar ainda para que o controle glicêmico nos pacientes DM1 seja realizados de maneira rigorosa para evitar as possíveis complicações micro e macrovasculares. Além disso, mais esforços são necessários para aprofundar a compreensão nessa área.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL-HAY, S. O. et al. Deletion of Insulin-degrading enzyme elicits Antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 2–7, 2011.
- ACHARJEE, S. et al. Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. **Canadian Journal of Diabetes**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 269–276, 2013.
- ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 310–314, 1997.
- ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 43, n. January, p. S14–S31, 2020.
- AL-SHARE, Q. Y. et al. Forced hepatic overexpression of CEACAM1 curtails diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, [S. l.], v. 64, n. 8, p. 2780–2790, 2015.
- ALDAHMAH, B. A.; EL-NAGAR, D. M.; IBRAHIM, K. E. Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 311–317, 2016.
- AMORIM, R. G. et al. Kidney disease in diabetes mellitus: Cross-linking between hyperglycemia, redox imbalance and inflammation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 112, n. 5, p. 577–587, 2019.
- ANDRADE-CETTO, A.; VÁZQUEZ, R. C. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two Cecropia species. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 130, n. 1, p. 93–97, 2010.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, [S. l.], v. 358, n. 9277, p. 221–229, 2001.
- BACH, J. F. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 516–542, 1994.
- BANTING, F. G. et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. 1922. **Canadian Medical Association Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 141–146, 1922.
- BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 285, n. 4, p. 48–4, 2003.
- BENNETT, R. G.; DUCKWORTH, W. C.; HAMEL, F. G. Degradation of Amylin by Insulin-degrading Enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 47, p. 36621–36625, 2000.



BERGMAN, R. N. et al. Hypothesis: Role of reduced hepatic insulin clearance in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 68, n. 9, p. 1709–1716, 2019.

BOSCO, D. et al. Unique arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in human islets of Langerhans. **Diabetes**, [S. l.], v. 59, n. 5, p. 1202–1210, 2010.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2014, [S. l.], v. 6, p. a009191, 2014.

BRANDIMARTI, P. et al. Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 219, n. 2, p. 173–182, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº10 de 21 de fevereiro de 2017. Torna pública a decisão de incorporar insulina análoga de ação rápida para o tratamento da Diabetes Mellitus Tipo 1, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 22 fev. 2017. Seção 1, p. 50.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº19 de 27 de março de 2019. Torna pública a decisão de incorporar insulina análoga de ação prolongada para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo I, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 29 mar. 2019. Seção 1, p. 99.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CASTRO, A. V. B. et al. Obesidade, Resistência à insulina e comorbidades - mecanismos de associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [S. l.], v. 58, n. 6, p. 600–609, 2014.

CATALANO, K. J. et al. Insulin resistance induced by hyperinsulinemia coincides with a persistent alteration at the insulin receptor tyrosine kinase domain. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e108693, 2014.

CHANG, L., CHIANG, S. H., SALTIEL, A. R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. **Molecular medicine**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 65–71, 2004.

CHENG, A. Y. Y. et al. Differentiating Basal Insulin Preparations : Understanding How They Work Explains Why They Are Different. **Advances in Therapy**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 1018–1030, 2019.

CHIANG, J. L. et al. Type 1 Diabetes Through the Life Span : A Position Statement of the American Diabetes Association. [S. l.], v. 37, n. July, p. 2034–2054, 2014.

CHOI, J. S.; YOKOZAWA, T.; OURA, H. Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia

in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin. **Planta Medica**, [*S. l.*], v. 57, n. 3, p. 208–211, 1991.

COHEN, P.; ALESSI, D. R.; CROSS, D. A. E. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? **FEBS Letters**, [*S. l.*], v. 410, n. 1, p. 3–10, 1997.

COOKE, David W.; PLOTNICK, Leslie. Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. **Pediatrics in Review**, [*S. l.*], v. 29, n. 11, p. 374–385, 2008.

CRYER, P. E. Minimizing hypoglycemia in diabetes. **Diabetes Care**, [*S. l.*], v. 38, n. 8, p. 1583–1591, 2015.

DA SILVA XAVIER, G.. The Cells of the Islets of Langerhans. **Journal of Clinical Medicine**, [*S. l.*], v. 7, n. 3, p. 54, 2018.

DAVIS, A. K. et al. Prevalence of detectable c-peptide according to age at diagnosis and duration of type 1 diabetes. **Diabetes Care**, [*S. l.*], v. 38, n. 3, p. 476–481, 2015.

DEANGELIS, A. M. et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1: A link between insulin and lipid metabolism. **Diabetes**, [*S. l.*], v. 57, n. 9, p. 2296–2303, 2008.

DEFRONZO, R. A.; HENDLER, R.; SIMONSON, D.. Insulin Resistance is a Prominent Feature of Insulin-dependent Diabetes. **Diabetes**, [*S. l.*], v. 31, n. 9, p. 795–801, 1982.

DIAS, L. L. Dos S; DOS SANTOS, M. A. B.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. Public financing of human insulins in Brazil: 2009-2017. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [*S. l.*], v. 23, n. 304975, p. 1–13, 2020.

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **The Lancet**, [*S. l.*], v. 391, n. 10138, p. 2449–2462, 2018.

DONGA, E. et al. Insulin resistance in patients with type 1 diabetes assessed by glucose clamp studies: Systematic review and meta-analysis. **European Journal of Endocrinology**, [*S. l.*], v. 173, n. 1, p. 101–109, 2015.

DUCKWORTH, W. C. Insulin Degradation: Mechanisms, Products, and Significance. **Endocrine Reviews**, [*S. l.*], v. 9, n. 3, p. 319–345, 1988.

DUCKWORTH, W. C.; BENNETT, R. G.; HAMEL, F. G. Insulin degradation: Progress and potential. **Endocrine Reviews**, [*S. l.*], v. 19, n. 5, p. 608–624, 1998.

DULLAART, R. P. F. Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Netherlands Journal of Medicine**, [*S. l.*], v. 46, n. 1, p. 44–54, 1995.

EDDOUKS, M. et al. *Capparis spinosa* L. aqueous extract evokes antidiabetic effect in streptozotocin-induced diabetic mice. *Avicenna journal of phytomedicine*, v. 7, n. 2, p. 191, 2017.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 314, n. 21, p. 1360–1368, 1986.

EISENBARTH, G; S.; JEFFREY, J. The natural history of type 1A diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 146–155, 2008.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 219–226, 2009.

EKBERG, K. et al. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. **Diabetes**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 292–298, 1999.

ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–7, 2013.

EREKAT, N. S.; AL-JARRAH, M. D.; AL KHATIB, A. J. Treadmill exercise training improves vascular endothelial growth factor expression in the cardiac muscle of type I diabetic rats. *Cardiology research*, v. 5, n. 1, p. 23, 2014.

FARRIS, W. et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid  $\beta$ -protein, and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 100, n. 7, p. 4162–4167, 2003.

FU, Z., GILBERT, E. R., LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 25–53, 2013.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 5.47.1-5.47.20, 2015.

GIRARDIN, C. M. et al. Continuous glucose monitoring: A review of biochemical perspectives and clinical use in type 1 diabetes. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 136–142, 2009.

GRANT, C. et al. Development of Standardized Insulin Treatment Protocols for Spontaneous Rodent Models of Type 1 Diabetes. **Original Research**, [S. l.], v. 62, n. 5, p. 381–390, 2012.

GREGORY, J. M.; CHERRINGTON, A. D.; MOORE, D. J. The peripheral peril: Injected insulin induces insulin insensitivity in type 1 diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 69, n. 5, p. 837–847, 2020.

HABER, E. P. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 219–227, 2001.

HEISE, T.; PIEBER, T. R. Towards peakless , reproducible and long-acting insulins . An

assessment of the basal analogues based on isoglycaemic clamp studies. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 648–659, 2007.

HEISE, T.; MATHIEU, C. Impact of the mode of protraction of basal insulin therapies on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and resulting clinical outcomes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 3–12, 2017.

HEISE, T. et al. Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 1614–1620, 2004.

HIMSWORTH, H. P. DIABETES MELLITUS: ITS DIFFERENTIATION INTO INSULIN-SENSITIVE AND INSULIN-INSENSITIVE TYPES. **The Lancet**, [S. l.], v. 227, n. 5864, p. 127–130, 1936.

HIRSCH, I. B. Type 1 diabetes mellitus and the use of flexible insulin regimens. **American Family Physician**, [S. l.], v. 60, n. 8, p. 2343–2352, 1999.

HORST, A. K. et al. CEACAM1 in liver injury, metabolic and immune regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 10, 2018.

HUANG, X. et al. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. **Sensors (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 756–782, 2006.

HUGHES, T. A. et al. Lipoprotein composition in patients with type 1 diabetes mellitus: impact of lipases and adipokines. **Journal of Diabetes and its Complications**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 657–668, 2016.

HUNTER, S. J.; GARVEY, W. T.. Insulin Action and Insulin Resistance: Diseases Involving Defects in Insulin Receptors, Signal Transduction, and the Glucose Transport Effector System. **The American journal of medicine**, [S. l.], v. 105, n. 4, p. 331–345, 1998.

HWANG, J. J. et al. Glycemic variability and brain glucose levels in type 1 diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 163–171, 2019.

INTERNATIONAL FEDERATION DIABETES. IDF Diabetes Atlas 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019.

ILONEN, J.; LEMPAINEN, J.; VEIJOLA, R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 635–650, 2019.

JANEŽ, A. et al. Insulin Therapy in Adults with Type 1 Diabetes Mellitus: a Narrative Review. **Diabetes Therapy**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 387–409, 2020.

KAHN, C. R.; WHITE, M. F. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 1151–1156, 1988.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, [S. l.], v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KAUL, K.; APOSTOLOPOULOU, M.; RODEN, M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [S. l.], v. 64, n. 12, p. 1629–1639, 2015.

KAZEMIAN, M. et al. Anti-diabetic effect of Capparis spinosa L. root extract in diabetic rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 5, n. 4, p. 325, 2015.

KHALANGOT, M. et al. Correlation between the prevalence of type 1 diabetes with the daily insulin dose and the autoimmune process against glutamic acid decarboxylase in adults. **European Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 611–615, 2009.

KILPATRICK, E. S.; RIGBY, A. S.; ATKIN, S. L. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: “Double diabetes” in the diabetes control and complications trial. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 707–712, 2007.

KIM, T. K. et al. Amelioration of Autoimmune Diabetes of NOD Mice by Immunomodulating Probiotics. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1832, 2020.

KIM, W. R. et al. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 1363–1370, 2008.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. **Diabetes/Metabolism Reviews**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 751–778, 1987.

KROMANN, H. et al. The low dose streptozotocin murine model of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: studies in vivo and in vitro of the modulating effect of sex hormones. *Diabetologia*, v. 22, n. 3, p. 194-198, 1982.

KURAUTI, M. A., et al. Acute exercise improves insulin clearance and increases the expression of insulin-degrading enzyme in the liver and skeletal muscle of swiss mice. **PLoS one**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1–16, 2016.

KURAUTI, M. A. et al. Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 229, n. 3, p. 221–232, 2016.

LAAKSO, M.; KUUSISTO, J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 293–302, 2014.

LEISSRING M. A. et al. Targeting Insulin-Degrading Enzyme in Insulin Clearance. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 2235, 2021.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of

diabetes mellitus. **Science**, [S. l.], v. 193, n. 4251, p. 415–417, 1976.

LIND, M. et al. Glycemic Control and Excess Mortality in Type 1 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 21, p. 1972-82, 2014.

LINN et al. Intensive Therapy in Adult Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Is Associated With Improved Insulin Sensitivity and Reserve : A Randomized , Controlled , Prospective Study Over 5 Years in Newly Diagnosed Patients. **Metabolism**, [S. l.], v. 45, n. 12, p. 1508–13, 1996.

LIU, C. T. et al. Antidiabetic effect of garlic oil but not diallyl disulfide in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 44, n. 8, p. 1377–1384, 2006.

LIU, H. et al. Insulin is a Stronger Inducer of Insulin Resistance than Hyperglycemia in Mice with Type 1 Diabetes Mellitus ( T1DM ). **The Journal of Biological Chemistry**. [S. l.], v. 284, n. 40, p. 27090–27100, 2009.

LUKAS, G., BRINDLE, S. D., GREENGARD, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**., [S. l.], v. 178, n. 3, p. 562–566, 1971.

MERINO, B. et al. Hepatic insulin-degrading enzyme regulates glucose and insulin homeostasis in diet-induced obese mice. **Metabolism Clinical and Experimental**, [S. l.], v. 113, p. 154352, 2020.

MICHAEL, M. D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 87–97, 2000.

MIRSKY, I. A., PERISUTTI, G. Effect of insulinase-inhibitor on hypoglycemic action of insulin. **Science**, [S. l.], v. 122, n. 3169, p. 559–560, 1955.

MOHAMED, J. et al. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 132–141, 2016.

NAJJAR, Sonia M. Regulation of insulin action by CEACAM1. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 240–245, 2002.

NAJJAR, S. M.; PERDOMO, G. Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. **Physiology (Bethesda, Md.)**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 198–215, 2019.

NATHAN, D. M. et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New English Journal of medicine**, [S. l.], v. 329, n. 14, p. 977–986, 1993.

NORRIS, J. M.; JOHNSON, R. K.; STENE, L. C. Type 1 diabetes early life origins and

changing epidemiology. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 226–238, 2020.

PALERM, C. C. et al. A run-to-run control strategy to adjust basal insulin infusion rates in type 1 diabetes. **Journal of Process Control**, [S. l.], v. 18, n. 3–4, p. 258–265, 2008.

PATEL, V. et al. Combination of omeprazole with GLP-1 agonist Therapy improves insulin sensitivity and antioxidant activity in liver in type 1 diabetic mice. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 927–936, 2013.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The Insulin Receptor - A Critical Link In Glucose Homeostasis And Insulin Action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 2–4, p. 89–109, 1998.

PETERSEN, K. F.; PRICE, T. B.; BERGERON, R. Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: Impact of type 1 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 89, n. 9, p. 4656–4664, 2004.

PETTUS, J. et al. The past, present, and future of basal insulins. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, [S. l.], v. 32, n. 30, p. 13–23, 2016.

PIGHIN, D. et al. Role of lipids in the early developmental stages of experimental immune diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 1064–1069, 2005.

PINHEIRO, L.; ANDREAZZI, A. E.; COSTA, M. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 117–127, 2011.

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 156–165, 2008.

POLONSKY, K. S., et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 435–441, 1988.

POLONSKY, K. S. The Past 200 Years in Diabetes. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 367, n. 14, p. 1332–1340, 2012.

PRATO, S. D. et al. Studies on the mass action effect of glucose in NIDDM and IDDM : evidence for glucose resistance. **Diabetologia**, [S. l.], v. 40, p. 687–697, 1997.

PRIYA, G.; KALRA, S. A Review of Insulin Resistance in Type 1 Diabetes: Is There a Place for Adjunctive Metformin? **Diabetes Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 349–361, 2018.

QUESADA, I. et al. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 199, n. 1, p. 5–19,

2008.

RÖDER, P. V. et al. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Experimental & molecular medicine**, [S. l.], v. 48, n.3 , p. e219, 2016.

RODRIGUEZ-DIAZ, R. et al. Paracrine Interactions within the Pancreatic Islet Determine the Glycemic Set Point. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 549–558.e4, 2018.

ROSENFELD, L. Insulin: discovery and controversy. **Clinical chemistry**, [S. l.], v. 48, n. 12, p. 2270–2288, 2002.

RUSSO, L. et al. Role for hepatic CEACAM1 in regulating fatty acid metabolism along the adipocyte-hepatocyte axis. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 57, n. 12, p. 2163–2175, 2016.

RYDGREN, T.; VAARALA, O.; SANDLER, S. Simvastatin protects against multiple low-dose streptozotocin-induced type 1 diabetes in CD-1 mice and recurrence of disease in nonobese diabetic mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 323, n. 1, p. 180–185, 2007.

SABERZADEH-ARDESTANI, B. et al. Type 1 diabetes mellitus: Cellular and molecular pathophysiology at a glance. **Cell Journal**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 294–301, 2018.

SAEED, S. et al. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of guar gum on streptozotocin-induced diabetes in male rats. *Pharmacognosy magazine*, v. 8, n. 29, p. 65, 2012

SALTIEL, A. R. Insulin Signaling in Health and Disease. **The Journal of Clinical investigation**, [S. l.], v. 131, n. 1, p. e142241, 2021.

SANTOS, D. C. et al. HLA class II genotyping of admixed Brazilian patients with type 1 diabetes according to self-reported color/race in a nationwide study. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. Clannad, 2019a. 419 p.

SBD. **Insulina análoga de ação prolongada é incorporada ao SUS**. In: Sociedade Brasileira de Diabetes. 29 mar. 2019. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/insulina-analoga-de-acao-prolongada-e-incorporada-ao-sus>. Acesso em 10 abr 2021.

SBD. **Insulina**. In: Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD. Disponível em <https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/insulina>. Acesso em 14 abr. 2021.



SEBAI, H. et al. Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Lipids in health and disease*, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2013.

SKURIKHIN, E. G. et al. Role of  $\beta$  cell precursors in the regeneration of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells under the influence of glucagon-like peptide 1. *Bulletin of experimental biology and medicine*, v. 165, n. 5, p. 644-648, 2018.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 14, n. 10, p. 20704–20728, 2013.

TANG, W. J. Targeting Insulin-Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [*S. l.*], v. 27, n. 1, p. 24–34, 2016.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [*S. l.*], v. 7, n. 2, p. 85–96, 2006.

TASCHETTO, A. P. et al. Reduced insulin sensitivity and increased  $\beta / \alpha$  cell mass is associated with reduced hepatic insulin-degrading enzyme activity in pregnant rats. **Life Sciences**, [*S. l.*], v. 277, p. 119509, 2021.

TASKINEN, M. R.; NIKKILÄ, E. A. Lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in insulin-deficient human diabetes - Relation to high-density and very-low-density lipoproteins and response to treatment. **Diabetologia**, [*S. l.*], v. 17, n. 6, p. 351–356, 1979.

THOMAS, N. J. et al. Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, [*S. l.*], v. 6, n. 2, p. 122–129, 2018.

TIBALDI, J. M. Evolution of Insulin : From Human to Analog. **The American Journal of Medicine**, [*S. l.*], v. 127, n. 10, p. S25–S38, 2014.

TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. The cell biology of systemic insulin function. **Journal of Cell Biology**, [*S. l.*], v. 217, n. 7, p. 1–17, 2018.

TREVIÑO, S. et al. Metforminium decavanadate as a potential metallopharmaceutical drug for the treatment of diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016. p. 1-14, 2016.

TUDIES, S.; REGNELL, S. E.; LERNMARK, Å. Hepatic Steatosis in Type 1 Diabetes. **The review of diabetic studies**, [*S. l.*], v. 8, n. 4, p. 454–467, 2012.

UETE, T., TSUCHIKURA, H. Autoregulatory System of Insulin Degradation in Liver: I. Decreased I-Insulin Degradation in the Liver of Insulin Deficient Rats. **The Journal of**

**Biochemistry**, [S. l.], v. 72, p. 157–163, 1972.

VALERA MORA et al. Insulin clearance in obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 487–493, 2003.

VECCHIO, I. et al. The Discovery of Insulin : An Important Milestone in the History of Medicine. **Frontiers in Endocrinology.**, [S. l.], v. 9, n. 613, p. 1–8, 2018.

VERGÈS, B. Lipid disorders in type 1 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 353–360, 2009.

VERGÈS, B. Dyslipidemia in Type 1 Diabetes: A Masked Danger. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 422–434, 2020.

VILLA-PÉREZ, P. et al. Liver-specific ablation of insulin-degrading enzyme causes hepatic insulin resistance and glucose intolerance, without affecting insulin clearance in mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [S. l.], v. 88, p. 1–11, 2018.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Resistência à insulina: métodos diagnósticos e fatores que influenciam a ação da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 76–85, 1999.

WASHBURN, R. L. et al. C-peptide as a therapy for type 1 diabetes mellitus. **Biomedicines**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–24, 2021.

WEISSBERG-BENCHELL, J.; ANTISDEL-LOMAGLIO, J.; SESHADRI, R. Insulin pump therapy: a meta-analysis. *In: Diabetes Care*. [s.l: s.n.]. v. 26, n. 4, p. 1079–1087.

YKI-JÄRVINEN, H. & KOIVISTO, V. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. **N. Engl. J. Med.**, [S. l.], v. 315, n. 4, p. 224–230, 1986.

YOSTEN, G. L. C. Alpha cell dysfunction in type 1 diabetes. **Peptides**, [S. l.], v. 100, p. 54–60, 2018.

ZABIELSKI, P. et al. Impact of insulin deprivation and treatment on sphingolipid distribution in different muscle subcellular compartments of streptozotocin-diabetic C57Bl/6 mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 306, n. 5, 2014.

ZACCARDI, F. et al. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: A 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, [S. l.], v. 92, n. 1084, p. 63–69, 2016.

ZAFAR, M. et al. Altered Kidney Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **International Journal of Morphology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 783–790, 2009.

ZAFAR, M. et al. Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **International Journal of Morphology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 719–725, 2009.

ZAFAR, M., NAQVI, S. N. U. H. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats : A Comparative Study. **International Journal of Morphology**, [*S. l.*], v. 28, n. 1, p. 135–142, 2010.

ZHANG, J.; LIU, F.. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. **IUBMB Life**, [*S. l.*], v. 66, n. 7, p. 485–495, 2014.

## ANEXO 01 – CERTIFICADO CEUA



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do Clearance de Insulina no Diabetes Mellitus Tipo 1", protocolada sob o CEUA nº 8169250219 (ID 001267), sob a responsabilidade de **Gustavo Jorge dos Santos e equipe; Liana França** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 12/06/2019.

We certify that the proposal "Insulin Clearance in Type 1 Diabetes Mellitus", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 8169250219 (ID 001267), under the responsibility of **Gustavo Jorge dos Santos and team; Liana França** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/12/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **03/2022**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **45 a 60 dias**

N: **60**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **20 a 40 g**

Local do experimento: Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB/UFSC Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/IB/Unicamp

Florianópolis, 27 de junho de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina