

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Glucose intestinal absorption: A promising target for dietary proteins and Metformin**

**Joana Filipa Borrega Moura Lourenço**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2020**



**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Glucose intestinal absorption: A promising target for dietary proteins and Metformin**

**Joana Filipa Borrega Moura Lourenço**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à  
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professora Auxiliar, Maria João Carlos da Silva Gama**

**2020**

# I – Resumo

A Diabetes Mellitus é uma condição patológica, caracterizada pela existência de hiperglicemia, resultante da produção inadequada de insulina, e/ou resistência dos tecidos a esta hormona e/ou aumento da gluconeogénese.

Esta é classificada segundo o mecanismo fisiopatológico subjacente, pelo que é crucial conhecer os mecanismos que regulam a homeostasia da glucose.

A Diabetes Mellitus tipo 2, manifesta-se preferencialmente em adultos, e a primeira abordagem terapêutica desta patologia passa pela alteração do estilo de vida, contudo, sempre que esta se verifique ineficiente, é crucial iniciar-se uma abordagem farmacológica, sendo a Metformina a primeira linha de tratamento.

Os objetivos gerais desta monografia passam por aprofundar os conhecimentos acerca dos mecanismos de ação deste fármaco, determinar o papel dos péptidos intestinais na homeostasia da glucose e identificar o potencial terapêutico de uma dieta rica em proteínas nesta patologia. A pesquisa bibliográfica teve por base a pesquisa de artigos científicos nas bases de dados *Pubmed* e *SciELO*, tendo sido aplicados descritores científicos, critérios de inclusão e limitadores de pesquisa

Estudos contemplando o papel da Metformina, concluíram que esta fomenta a diminuição da gluconeogénese e glucogenólise hepática e também a sensibilização dos tecidos periféricos à insulina. Para além da sua atividade hepática, a Metformina atua também no intestino. Este fármaco é absorvido na superfície apical dos enterócitos intestinais, através de transportadores identificados em estudos recentes.

Recentemente, o papel de alguns péptidos intestinais na regulação da homeostasia da glucose, tem ganho interesse investigacional. Estudos reforçam o papel modulador de um transportador de péptidos específico, o PepT1, que através da deteção de proteínas no lúmen intestinal, regula os níveis de glucose sanguínea, podendo este constituir uma nova estratégia terapêutica para esta patologia.

Nos últimos anos, verificou-se um aumento da procura por dietas ricas em proteína, existindo um crescimento no número de estudos que se debruçam sobre a manutenção dos níveis de glucose, após uma refeição rica em proteínas.

Assim, existe ainda um leque muito vasto de mecanismos que podem ser alvo de investigação, com intuito de serem formuladas novas estratégias terapêuticas para a Diabetes Mellitus 2.

## **Palavras-chave:**

Diabetes Mellitus tipo 2, Glucose, Metformina, Péptidos, Dieta rica em proteínas/pobre em hidratos de carbono

## II – Abstract

Diabetes Mellitus is a pathological condition, characterized by the existence of hyperglycemia resulting from deficient production of insulin, and/or resistance of tissues to this hormone and/or increased gluconeogenesis. It is classically classified in diverse categories, which have a different pathophysiology, being crucial to know the mechanisms that regulate glucose homeostasis.

Type 2 Diabetes Mellitus, manifests itself preferentially in adults, since, and the primary therapeutic approach regarding this pathology consists in lifestyle changes, however, whenever these are inefficient, it is crucial to start a pharmacological approach. Metformin is the first line of pharmacological treatment for type 2 Diabetes Mellitus.

The general objectives of this manuscript are to deepen the knowledge on the mechanisms of action of this drug, determine the role of intestinal peptides in glucose homeostasis and identify the therapeutic potential of a protein-rich diet in this pathology.

The bibliographic research was based on scientific articles from Pubmed and SciELO databases, using scientific descriptors, inclusion criteria and research limitations.

Studies focusing the role of Metformin, concluded that it promotes not only the reduction of hepatic gluconeogenesis and glucogenolysis, but also the sensitization of peripheral tissues. In addition to its hepatic activity, Metformin also acts at the Intestines. This drug is absorbed through the apical surface of the intestinal enterocytes, through transporters identified in recent studies.

Recently, the role of some intestinal peptides in regulating glucose homeostasis has gained research interest. Studies reinforce the modulating role of a specific peptide transporter, PepT1, which, through the detection of proteins in the intestinal lumen, regulates blood glucose levels, constituting a possible new therapeutic target for this pathology.

In recent years, there has been an increase of the demand for high-protein diets, as there is an increase in the number of studies that focus on the maintenance of glucose levels after a protein-rich meal.

Therefore, there is still a very wide range of mechanisms that can be investigated, with the aim of formulating new pharmacological strategies for type 2 Diabetes Mellitus.

### **Key-words:**

Type 2 Diabetes Mellitus, Glucose, Metformin, Peptides, *High-protein/low carb diet*

### III – Acrónimos

**AA** – Aminoácidos  
**Ac-CoA** – Acetil Coenzima A  
**ACC** – Acetil Coenzima A Carboxilase  
**ADA** – *American Diabetes Association*  
**ADO** – Antidiabéticos Orais  
**ADP** – Adenosina Difosfato  
**AMP** – Adenosina Monofosfato  
**AMPK** – Proteína Cinase ativada por Adenosina Monofosfato  
**AP** – Membrana Apical  
**ATP** – Adenosina Trifosfato  
**BBM** – Membrana em Bordadura em Escova  
**BL** – Membrana Basolateral  
**BPG** – Bifosfoglicerato  
**Ca<sup>2+</sup>** – Ião Cálcio  
**cAMP** – Adenosina Monofosfato Cíclico  
**cGPD** – Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase Citosólica  
**CCK** – Colecistocininas  
**CREB** – Proteína de ligação ao cAMP do Fator de Transcrição  
**CRTC2** – Coativador Transcricional Regulado por CREB-2  
**CT** – Colesterol total  
**DGS** – Direção-Geral da Saúde  
**DHAP** – Dihidroxiacetona Fosfato  
**DM** – Diabetes Mellitus  
**DM1** – Diabetes Mellitus tipo 1  
**DM2** – Diabetes Mellitus tipo 2  
**DPP4** – Dipeptidilpeptidase-4  
**FBPase** – Fructose-1,6-Bifosfatase  
**FDG** – Fluorodeoxiglucose  
**FFA** – Ácidos Gordos Livres  
**FXR** – Recetor Farnesoid X  
**F2,6BP** – Frutose-2,6-Bifosfato  
**F6P** – Frutose-6-Fosfato  
**GIP** - Polipeptídeo Insulinotrópico Dependente de Glucose  
**GLP-1** – Péptido semelhante ao Glucagon 1  
**GLP-2** – Péptido semelhante ao Glucagon 2  
**GLUT** – Transportador de Glucose  
**GLUT-2** – Transportador de Glucose 2  
**GP** – Glucose Plasmática  
**G3P** – Glicerol-3-Fosfato  
**G6P** – Glucose-6-Fosfato  
**G6Pase** – Glucose-6-Fosfatase  
**HbA1c** – Hemoglobina Glicada  
**HDL** – Lipoproteína de Alta Densidade  
**HP/LC** – *High-protein/low-carb Diet*  
**H<sup>+</sup>** – Ião Hidrogénio  
**ID** – Intestino Delgado  
**IDF** – *International Diabetes Federation*

**IL** – Ilhéus de Langerhans  
**IMC** – Índice de Massa Corporal  
**K<sup>+</sup>** – Ião Potássio  
**KATP** – Canal de K<sup>+</sup> sensível ao ATP  
**Kir6.2** – Subunidade major do Canal de K<sup>+</sup> sensível ao ATP  
**LDH** – Lactato Desidrogenase  
**LDL** – Lipoproteína de Baixa Densidade  
**Ma-Coa** – Malonil Coenzima A  
**ME** – Músculo Esquelético  
**mGPD** – Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase Mitocondrial  
**MLCK** – Cadeia Leve da Miosina Cinase  
**mRNA** – Ácido Ribonucleico Mensageiro  
**NAD** – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina  
**NAD<sup>+</sup>** – Forma Oxidada do NAD  
**NADH** – Forma Reduzida do NAD  
**Na<sup>+</sup>** – Ião Sódio  
**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>** – Bomba de Sódio-Potássio  
**NMDA** – N-metil-D-aspartato  
**OAA** – Oxaloacetato  
**OCT** – Transportador de Catiões Orgânicos  
**OCT1** – Transportador de Catiões Orgânicos 1  
**OCT2** – Transportador de Catiões Orgânicos 2  
**OCT3** – Transportador de Catiões Orgânicos 3  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**PDE4B** – 3', 5'-Fosfodiesterase Cíclica 4B  
**PET** – Tomografia por Emissão de Positrões  
**PEP** – Fosfoenolpiruvato  
**PEPKC** – Fosfoenolpiruvato Carboxicinase  
**PepT1** – Transportador de Péptidos 1  
**PFK** – Fosfofrutocinase  
**PFKFB1** – Frutose-2,6-Bifosfatase  
**PKA** – Proteína Cinase A  
**PKC** – Proteína Cinase C  
**PLC** – Fosfolipase C  
**PMAT** – Transportador Membranar da Monoamina  
**PTOG** – Prova Oral de Tolerância à Glucose  
**PYY** – Péptido YY  
**Pyr K** – Piruvato Cinase  
**RNA** – Ácido Ribonucleico  
**RTK** – Recetor Tirosina Cinase  
**SERT** - Transportador de Serotonina  
**SGLT** – Co-transportador de Sódio e Glucose  
**SGLT-1** – Co-transportador de Sódio e Glucose 1  
**SG3P** – *Shuttle* do glicerolfosfato  
**SIK2** – Cinase Induzível por Sal 2  
**SUR1** – Recetor de Sulfonilureias  
**TG** – Triglicéridos  
**VDCC** – Canal de Ca<sup>2+</sup> Voltagem-Dependente

# Índice

<b>IV – Introdução</b>	<b>12</b>
<b>1. Diabetes Mellitus</b>	<b>12</b>
1.1. Definição	12
1.2. Classificação	12
1.3. Epidemiologia	13
<b>2. Homeostasia da Glucose</b>	<b>14</b>
2.1. Transporte Membranar de Glucose	14
2.2. Absorção Intestinal de Glucose	14
2.3. Regulação da Absorção Intestinal de Glucose	18
2.4. Insulina como Regulador da Homeostasia da Glucose	19
2.4.1. Insulina: Biossíntese	19
2.4.2. Insulina: Secreção	19
2.4.3. Insulina: Ação	20
<b>3. Diabetes Mellitus Tipo 2</b>	<b>22</b>
3.1. Diagnóstico	22
3.2. Fisiopatologia	23
3.2.1. Resistência à Insulina	23
3.2.2. Défice de Insulina	23
3.2.3. Tecido Adiposo, Fígado e Músculo Esquelético	24
3.3. Terapêutica	24
<b>V – Objetivo</b>	<b>25</b>
<b>VI – Materiais e Métodos</b>	<b>26</b>
<b>VII – Discussão</b>	<b>28</b>
<b>1. Metformina: Uma Perspetiva Atual</b>	<b>28</b>
1.1. Farmacocinética	28
1.2. Transportadores Membranares	29
1.3. Mecanismo de Ação	30
1.4. Fígado	30
1.4.1. Gluconeogénese Hepática	30
1.4.2. Ativação da AMPK	33
1.4.3. AMPK e a Resistência à Insulina	33
1.5. Intestino	34
1.5.1. Péptido Semelhante ao Glucagon 1	35
1.5.2. Ácidos Biliares	35
1.5.3. Eixo Intestino-Cérebro	36
1.5.4. Microbiota Intestinal	37
<b>2. Péptidos: Uma Perspetiva Futura</b>	<b>38</b>
2.1. Péptidos e Proteínas	38
2.1.1. Transportador de Péptidos	39
2.1.2. Influência de Péptidos na Homeostasia da Glucose	40
2.2. <i>High-protein/low-carb Diet</i>	43
<b>VIII – Conclusões</b>	<b>45</b>



## Índice de Imagens

<i>Figura 1: Modelo Clássico da absorção intestinal de glucose no enterócito.</i> .....	15
<i>Figura 2: Absorção de glucose através do transportador SGLT-1.</i> .....	16
<i>Figura 3: Modelo do GLUT-2 Apical.</i> .....	17
<i>Figura 4: Mecanismos de secreção de insulina.</i> .....	20
<i>Figura 5: “Assessment of methodological Quality”.</i> .....	27
<i>Figura 6: Mecanismos pelos quais a Metformina afeta o metabolismo do fígado.</i> .....	31
<i>Figura 7: A ação da Metformina e a incorporação do lactato na glucose.</i> .....	32
<i>Figura 8: A Metformina e o trato gastrointestinal.</i> .....	35
<i>Figura 9: Transportador PepT1.</i> .....	39
<i>Figura 10: Absorção de péptidos intestinais.</i> .....	42

# Índice de Tabelas

*Tabela 1: Número de estudos encontrados nas bases de dados. .... 26*

## IV – Introdução

### 1. Diabetes Mellitus

#### 1.1. Definição

A Diabetes Mellitus (DM) refere-se a um conjunto de alterações metabólicas que partilham o fenótipo de hiperglicemia. Existem diferentes tipos de DM, motivados por fatores genéticos e ambientais (1).

A DM, designada pela *International Diabetes Federation* (IDF), como Diabetes, é uma condição patológica considerada grave e crónica. Esta ocorre quando existem níveis elevados de glucose na corrente sanguínea, quer pela impossibilidade de produção de insulina, quer pela incapacidade de ação da mesma, ou pelo aumento da produção endógena de glucose (2).

A insulina é uma hormona pancreática essencial, que permite a entrada da glucose existente na corrente sanguínea, para as células, e o seu metabolismo. Esta hormona também é essencial no metabolismo das gorduras e proteínas. Alterações nos níveis de insulina e/ou da sua ação, levam a alterações nos níveis de glucose plasmática (GP), o que conduz a um estado de hiperglicemia, um dos indicadores clínicos da DM (2).

O défice de insulina, quando não controlado a longo prazo, leva a complicações incapacitantes e potencialmente fatais, contudo, se existir um controlo adequado da DM, o aparecimento destas complicações pode ser retardado, ou até mesmo evitado (2).

Considerando a sua incidência crescente, e segundo a previsão da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030, a DM será a sétima causa de morte no mundo (3).

#### 1.2. Classificação

A classificação da DM baseia-se no processo patogénico que desencadeia o estado de hiperglicemia. Esta nova classificação vem opor-se a critérios anteriores, que tinham por base a idade de início ou o tipo de terapia implementado.

A DM divide-se em duas grandes categorias, designadas como DM tipo 1 (DM1) ou DM tipo 2 (DM2). Contudo, têm vindo a ser reconhecidas outras formas de DM, associadas a alterações genéticas. Nestas, podem existir características comuns tanto à DM1, como à DM2 (1).

Segundo recomendações atuais da *American Diabetes Association* (ADA), a DM pode ser classificada em:

1. DM1 - devido à destruição autoimune das células- $\beta$ , resultando numa deficiência absoluta de insulina.
2. DM2 - devido à supressão da secreção de insulina por parte das células- $\beta$  relacionada com uma resistência insulínica.
3. DM Gestacional - diagnosticada pela primeira vez durante o segundo ou terceiro trimestre da gravidez, não existindo evidência de DM pré-gestacional.
4. Tipos específicos de DM, devido a causas secundárias como, síndrome de DM monogénica (DM neonatal e DM com início em idade juvenil), patologias do pâncreas

exócrino (fibrose quística e pancreatite) e induzida por substâncias químicas (glucocorticóides, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, entre outros) (4).

Vários fatores genéticos e ambientais podem condicionar a perda de função ou morte das células- $\beta$ , manifestando-se como hiperglicémia, tanto na DM1 como na DM2. Como a hiperglicémia ocorre em ambos os tipos de DM, estes têm a mesma probabilidade de desenvolver complicações crónicas que se manifestam a ritmos diferentes. A caracterização dos processos que levam à morte e perda de função das células- $\beta$  permitirá futuramente o desenvolvimento de terapias individualizadas (4).

### **1.3. Epidemiologia**

A prevalência mundial de DM aumentou de cerca de 30 milhões de casos em 1985, para 463 milhões em 2019. Considerando estes valores, a IDF estima que, em 2030, existam cerca de 578 milhões de diabéticos no mundo, aumentando este número para 700 milhões quando se perspetiva o ano de 2045 (2).

Embora a prevalência da DM esteja a aumentar a uma escala global, verifica-se um maior aumento no caso da DM2. Este facto prende-se pelo envelhecimento populacional, pelas alterações dos hábitos alimentares, inatividade física e conseqüentemente o aumento da obesidade. Além disso, o aumento da capacidade de diagnóstico e rastreio das unidades de saúde, conduz ao incremento da prevalência desta doença (1).

Em Portugal, o Relatório Anual do Observatório da Diabetes de 2016, revela que entre os 20 e os 79 anos, existe uma prevalência de 13,3% de DM, indicando que mais de 1 milhão de portugueses deste grupo etário tem DM (5).

Verifica-se maior prevalência da DM no sexo masculino (15,9%) em detrimento do sexo feminino (10,9%). A idade também apresenta relevância, existindo um forte aumento da prevalência na população idosa (5).

É possível relacionar o Índice de Massa Corporal (IMC) e a DM, sendo que, cerca de 90% da população com DM, apresenta excesso de peso (49,2%) ou obesidade (39,6%) (5).

## 2. Homeostasia da Glucose

Conhecer os mecanismos homeostáticos que controlam os níveis de plasmáticos de glucose é essencial para que exista um melhor controlo da DM (6).

A homeostasia da glucose reflete um equilíbrio entre a energia obtida pela ingestão de alimentos, a produção hepática de glucose, e a captação e utilização de glucose pelos tecidos periféricos (1).

### 2.1. Transporte Membranar de Glucose

O epitélio intestinal é composto por enterócitos, que se encontram ligados entre si através de junções apertadas, e é neste epitélio que se realiza o transporte e metabolismo dos nutrientes (7).

A glucose proveniente da dieta, sob a forma de glúcidos, é o substrato principal para a actividade metabólica do Homem (8). Estes polissacarídeos, são digeridos enzimaticamente ao nível dos enterócitos das vilosidades intestinais, em unidades mais simples, os monossacarídeos (9).

O transporte de glucose e outros açúcares, é realizado por duas famílias de proteínas transportadoras, uma formada por co-transportadores ativos, que requerem o consumo de Adenosina Trifosfato (ATP) e são dependentes do Ião Sódio ( $Na^+$ ) (SGLT), e outra formada por transportadores de difusão facilitada (GLUT), não requerendo energia, realizando o transporte a favor do gradiente de concentração (10). Ambas apresentam especificidade para diferentes substratos, diferentes propriedades cinéticas, garantindo que a captação celular de glucose é assegurada nas diversas condições metabólicas (11).

Foram identificados alguns SGLT ao nível do intestino, rim e músculo (9). Destes, o Co-transportador de  $Na^+$ /glucose 1 (SGLT-1) é o que tem maior representatividade no epitélio intestinal, atuando através do gradiente eletroquímico do  $Na^+$  gerado pela Bomba de Sódio-Potássio ( $Na^+/K^+$ ), transportando a glucose contra o seu gradiente de concentração (10).

### 2.2. Absorção Intestinal de Glucose

No Modelo Clássico, que representa a absorção intestinal de glucose, esta é ativamente captada do lúmen intestinal para o interior dos enterócitos, através do SGLT-1 (9).

O SGLT-1 é expresso principalmente ao nível do intestino e dos rins, tendo recentemente Gorboulev et al. postulado que o SGLT-1 é expresso na Membrana em Bordadura em Escova intestinal (BBM) (12).

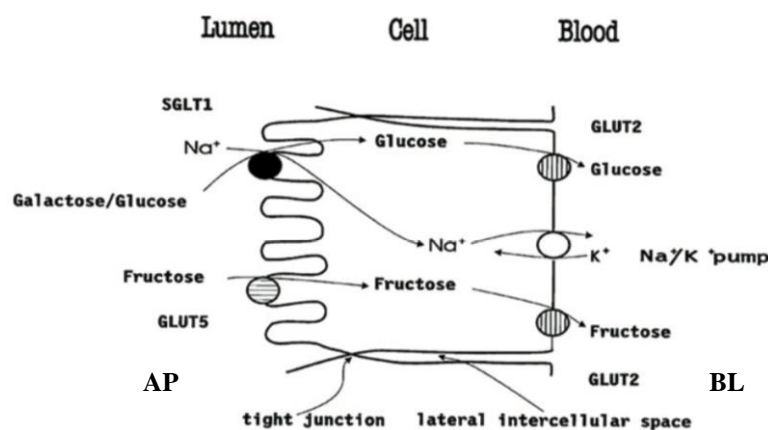
Este transportador possui um local específico de ligação ao  $Na^+$ , conduzindo a uma alteração conformacional deste, permitindo o acesso da glucose (13).

O transporte através do SGLT-1 na Membrana Apical (AP) é reversível, o que indica que é dependente do gradiente eletroquímico do  $Na^+$  e da glucose. Por cada molécula de glucose transportada, dois  $Na^+$ , são transportados na mesma direção, uma vez que o gradiente transmembranar é gerado pela  $Na^+/K^+$ -ATPase (9).

A  $Na^+/K^+$ -ATPase é uma proteína transmembranar que permite a manutenção do potencial eletroquímico negativo, de modo a facilitar a entrada de  $Na^+$ , através da membrana e permite uma maior absorção de glucose pelo SGLT-1 (14).

O Modelo Clássico de absorção intestinal, representado na Figura 1, caracteriza-se por ser um modelo simples que explica a absorção de glucose, quando as concentrações luminais de glucose se encontram inferiores às concentrações plasmáticas. Nesta situação, as moléculas de glucose são rapidamente captadas pelo SGLT-1, transportando a glucose contra o gradiente de concentração (15).

Contudo, este modelo não explica a absorção de glucose em situação pós-prandial, quando o SGLT-1 se encontra saturado (15).



**Figura 1: Modelo Clássico da absorção intestinal de glucose no enterócito.** A glucose é transportada ativamente da AP para o espaço intracelular, pelo SGLT-1. Na membrana basolateral (BL), é transportada passivamente a favor do gradiente de concentração. In Araújo J.R. et al, Arq Med, 2009 (11).

Em 1933, Wertheimer classificou o transporte de glucose no intestino como sendo determinado por dois componentes distintos: um inibido pela Florizina, e um outro insensível a esta (16). Posteriormente verificou-se que o SGLT-1 (17), inibido pela Florizina, era saturável e de natureza electrogénica (16).

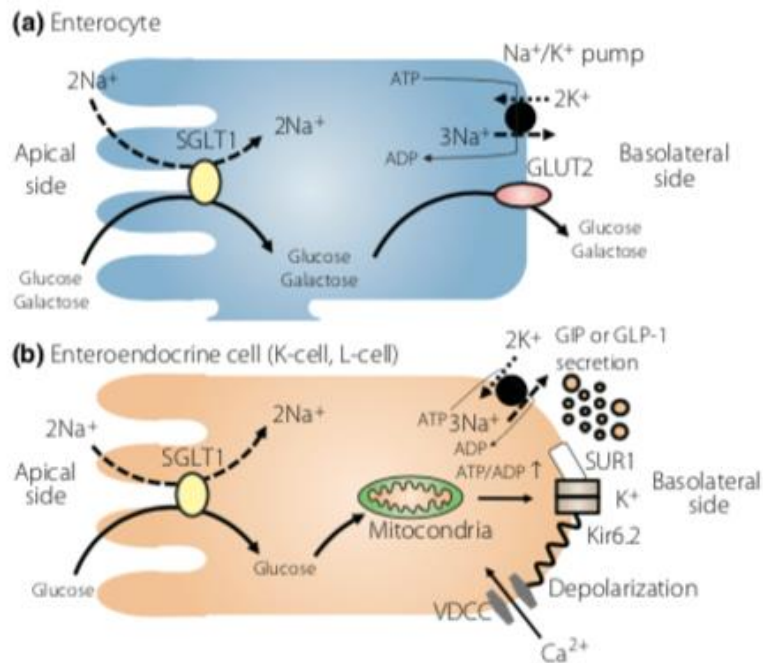
Evidências demonstraram a existência de um segundo transportador de glucose na AP (11). O interesse neste segundo transportador resultou do aparecimento de novos estudos *in vivo* em ratos, que sugeriam que o Transportador de Glucose 2 (GLUT-2) poderia ser recrutado a partir de vesículas intracelulares para a AP, resultando na absorção de elevadas quantidades de glucose luminal (16).

A primeira hipótese sugere a presença do GLUT-2 ao nível apical, designado por Modelo do GLUT-2 Apical, representado da Figura 2 (11). Esta hipótese foi reforçada através da identificação do GLUT-2 na AP do intestino (18).

Estudos recentes sugerem que, o GLUT-2 aparenta estar permanentemente presente na AP dos enterócitos, contribuindo para níveis de glucose pós-prandial acima do limite (19).

O GLUT-2, é um transportador de difusão facilitada, independente de  $Na^+$ , com baixa afinidade e alta capacidade de transporte de glucose. É inibido pela Citocalasina B e pela Floretina (6).

Estudos concluíram que o SGLT-1 é também expresso em células secretoras de incretina (20). As principais incretinas são o Polipeptídeo Insulinotrópico Dependente de Glucose (GIP), secretado pelas células K na porção proximal do Intestino Delgado (ID), e o Péptido Semelhante ao Glucagon 1 (GLP-1), secretado pelas células-L na porção distal e no cólon (20). São secretadas após a ingestão de alimentos, levando a uma maior produção de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas (20).



**Figura 2: Absorção de glicose através do transportador SGLT-1.** Absorção da glicose num enterócito (a) e numa célula enteroendócrina (b) através do transportador SGLT-1. In Harada N. et al, J Diabetes Investig, 2012 (20).

A resposta do GIP e GLP-1 na ausência de SGLT-1, após a administração de glicose é suprimida, verificando-se uma diminuição nos níveis de insulina após o jejum relacionada com a inexistência de resposta à incretina (16).

Num contexto pós-prandial, os produtos da digestão de glúcidos, atingem a AP do jejuno, 30 minutos após serem ingeridos. De acordo com o Modelo do GLUT-2 Apical, alguns minutos após a glicose ser transportada pelo SGLT-1, existe um rápido recrutamento de GLUT-2, para a AP, provenientes de vesículas intracelulares, aumentando a actividade intrínseca do GLUT-2, previamente existente na membrana (21).

Este mecanismo está dependente da ativação de vias de transdução de sinal envolvendo proteínas reguladoras intracelulares dependentes do SGLT-1 como a Proteína Cinase C (PKC) e a Proteína Cinase ativada por Adenosina Monofosfato (AMP) (AMPK) (6).

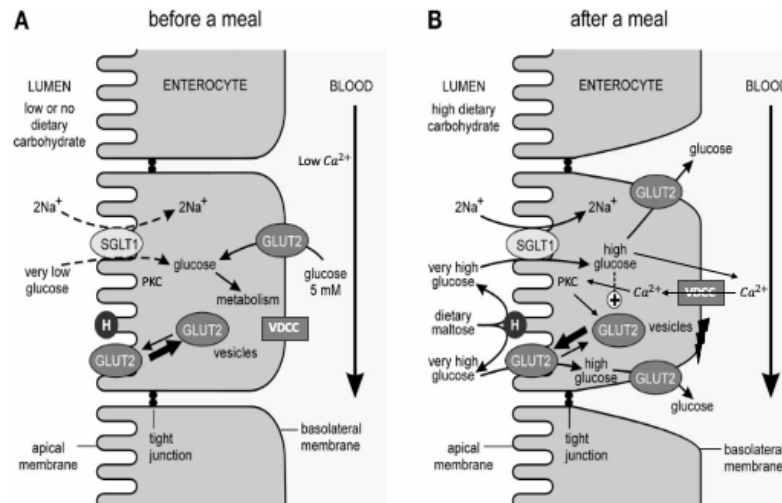
Para a ativação da PKC é necessária a presença de Ião Cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (18), que modula a expressão do GLUT-2 na AP (14). O Canal de  $Ca^{2+}$  Voltagem-Dependente (VDCC) desempenha um papel essencial na regulação da absorção de  $Ca^{2+}$  (22).

Estudos demonstraram que a absorção intestinal de  $Ca^{2+}$  pelo VDCC está envolvida na regulação da absorção de glicose, controlando a inserção apical de GLUT-2 (23).

Posteriormente, descobriram que a despolarização da AP pela absorção de glucose através do SGLT-1, ativa o influxo de  $Ca^{2+}$  luminal via VDCC (24).

Um aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico ativa a Cadeia Leve da Miosina Cinase (MLCK), que através de uma fosforilação ativa a miosina II, causando um rearranjo do citoesqueleto que permite a translocação de GLUT-2 para as AP (18).

O mecanismo resultante da cooperação entre estes transportadores, representado na Figura 3, ocorre quando existem elevadas concentrações de glucose no lúmen intestinal, nomeadamente durante a digestão de uma refeição rica em glúcidos, o que promove uma absorção facilitada da glucose superior àquela que se proporciona quando apenas o SGLT-1 se encontra ativo (17).



**Figura 3: Modelo do GLUT-2 Apical.** (A) Antes de uma refeição, a concentração de glucose no lúmen intestinal é baixa, sendo inferior à concentração plasmática. A actividade intrínseca e a expressão do transportador facilitado de glucose GLUT-2 são baixas, e ocorre absorção de glucose contra o seu gradiente de concentração através do transportador ativo de glucose dependente de  $Na^+$ , SGLT-1. (B) Após uma refeição, as concentrações elevadas de glucose estão em contacto com as microvilosidades. Decorrente da actividade hidrolítica das dissacarídates, transporte de glucose via SGLT-1 resulta na ativação da PKC e, conseqüentemente, na ativação e recrutamento do GLUT-2 para a AP do enterócito. O transporte de glucose via SGLT-1 resulta na contração do anel peri-juncional de actimiosina, causando uma rotação subtil da superfície absorptiva da célula. In Kellett G.L. et al., *Diabetes*, 2005 (25).

Assim, o SGLT-1, para além de transportar a glucose, funciona também como um sensor desta, controlando a inserção membranar pós-prandial do GLUT-2. Posteriormente e à medida que a glucose vai sendo absorvida, a sua concentração diminui ao nível do lúmen intestinal, revertendo todo o processo de sinalização, permitindo ao GLUT-2 a sua inativação e remoção da AP, restaurando-se a situação pré-prandial (15).

Antes de uma refeição, os níveis de glucose luminal apresentam-se mais baixos, sendo a presença de GLUT-2 na AP reduzida, ocorrendo o transporte da glucose da corrente sanguínea para o enterócito através do GLUT-2 basolateral (15). A presença de GLUT-2 na AP é nula em situação de jejum noturno, sendo a glucose eficazmente transportada pelo SGLT-1 contra o gradiente de concentração para o interior do enterócito, impedindo elevadas concentrações ao nível do colón (15).

A localização do SGLT-1 na AP e do GLUT-2 na BL, é crucial para que o transporte de glucose, através do epitélio, seja unidirecional (26).

Avaliar a contribuição de SGLT-1 e GLUT-2 para o transporte intestinal de glicose, é imprescindível para entender a fisiologia e a fisiopatologia dos mecanismos que envolvem a homeostasia da glicose (16).

### 2.3. Regulação da Absorção Intestinal de Glicose

O aumento do número de indivíduos com DM2 conduziu a um maior interesse pelos mecanismos de regulação de absorção dos monossacarídeos da dieta (16).

Os hidratos de carbono complexos que atingem o ID são posteriormente hidrolisados, de modo a serem transportados através da mucosa intestinal, dependendo a quantidade de energia disponível, da quantidade de nutrientes que são absorvidos ao nível da BBM (14).

Numa situação pós-prandial não existe uma relação linear entre os níveis de SGLT-1 membranar e a concentração de glicose no lúmen intestinal, no entanto, no que diz respeito ao GLUT-2, os seus níveis na AP e a sua atividade aumentam proporcionalmente a essa concentração (15).

O GLUT-2 apical, é regulado por um vasto leque de estímulos como:

1. Ingestão de glúcidos de elevado índice glicémico, que promove a sua ativação (6);
2. Hormonas endócrinas, como a insulina, que promovem o seu aumento (20);
3. Hormonas parácrinas, sendo aumentado pelo Péptido semelhante ao Glucagon 2 (GLP-2) (27), e diminuído pelo GIP (27);
4. Jejum, diminuindo a sua expressão nesta situação (11);
5. DM, aumentando nesta situação (18).

O SGLT-1 é também modulado através de vários mecanismos como:

1. Ingestão de glúcidos, uma vez que este é ativado no caso de dietas de elevado índice glicémico, aumentando a absorção de glicose;
2. Jejum, verificando-se uma ativação do transportador;
3.  $Na^+$ , que o ativa (25).

A regulação da absorção intestinal de glicose a curto prazo envolve mecanismos que podem alterar os níveis de transportadores membranares, fomentando a inserção dos mesmos na membrana através de vesículas intracelulares, ou promovendo a remoção dos mesmos da membrana (6).

Quanto à regulação da absorção de glicose no intestino, a longo prazo, os níveis de transportadores na membrana podem ser modulados pela alteração da expressão do seu RNA mensageiro (mRNA) e/ou pela alteração da sua taxa de síntese (13).

A regulação do transporte de glicose a nível intestinal, tanto a curto como a longo prazo, apresenta um outro fator envolvido, relacionado com a atividade intrínseca dos transportadores, que pode estar alterada sem que haja modificação dos seus níveis membranares (13).

Neste mecanismo podem estar envolvidas proteínas intracelulares reguladoras do SGLT-1, que conduzem à ativação ou inibição do transportador, através de reações de fosforilação e desfosforilação (6).

A inibição do SGLT-1 inativa a via da PKC, conduzindo a uma redução do GLUT-2 apical, sendo também inibido o transporte facilitado (15).

Assim, verifica-se uma relação de dependência entre os dois transportadores dependendo o transporte mediado pelo GLUT-2, do SGLT-1 (28).

## **2.4. Insulina como Regulador da Homeostasia da Glucose**

A insulina é o principal regulador do equilíbrio entre a produção, o armazenamento e a utilização da glucose.

Em jejum, os níveis de insulina encontram-se baixos e os níveis de glucagon elevados, aumentando a produção de glucose através da gluconeogénese e glucogenólise hepática.

O glucagon reduz também a captação de glucose pelos tecidos insulinosensíveis (Músculo Esquelético (ME) e tecido adiposo), promovendo assim a mobilização de Aminoácidos (AA) e ácidos gordos armazenados (lipólise). Esta hormona é secretada pelas células- $\alpha$  pancreáticas, contudo esta secreção depende de níveis de glucose ou insulina no sangue baixos (1).

Em contexto pós-prandial, existe um maior aporte de glucose, provocando um aumento da insulina, e conseqüentemente uma queda nos níveis de glucagon, revertendo os processos referidos anteriormente. A insulina é considerada anabólica, promovendo o armazenamento dos hidratos de carbono e a síntese de lípidos e proteínas. Grande parte da glucose pós-prandial é utilizada como combustível para o ME, permitindo a captação de glucose por estimulação da insulina. Outros tecidos, como o cérebro, utilizam a glucose independentemente da estimulação da insulina (1).

### **2.4.1. Insulina: Biossíntese**

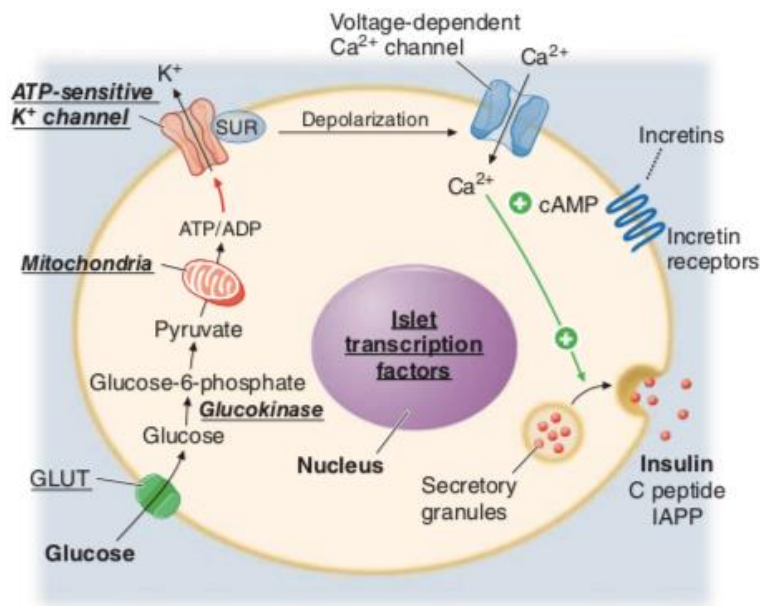
A insulina é produzida pelas células- $\beta$  pancreáticas dos Ilhéus de Langerhans (IL), sendo inicialmente sintetizada como um polipéptido precursor de 86 AA de cadeia simples, designado pré-pró-insulina. É um processo proteolítico que dá origem à pró-insulina, pela remoção do péptido aminoterminal (1).

Através da clivagem de um fragmento interno de 31 resíduos da pró-insulina, gera-se o Péptido-C com as cadeias A (21 AA) e B (30 AA) da insulina, conectadas por ligações dissulfureto. A molécula de insulina e o Péptido-C armazenam-se em conjunto, sendo co-secretados a partir das células- $\beta$ . O Péptido-C é eliminado mais lentamente do que a insulina, e como tal este é um marcador útil da secreção desta.

Observaram-se níveis elevados de pró-insulina sérica nos dois tipos de DM, sendo estes marcadores indicativos de disfunção das células- $\beta$ . Estas co-secretam amilina (um péptido de 37 AA), em conjunto com a insulina. O papel deste péptido não está completamente esclarecido, todavia, este é o principal componente das fibrilhas amiloides encontradas nos IL de doentes com DM2 (1).

### **2.4.2. Insulina: Secreção**

A glucose é a chave para a regulação da secreção de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas. Esta inicia-se pelo transporte da glucose para as células- $\beta$  através de um transportador facilitador do transporte de glucose. Níveis de glicémia superiores a 70 mg/dL promovem a síntese de insulina, uma vez que regulam positivamente os processos de transcrição e tradução de proteínas (1).



**Figura 3: Mecanismos de secreção de insulina.** A glucose e outros nutrientes regulam a secreção de insulina pela células- $\beta$  pancreática. A glucose é transportada através do GLUT-2 e o subsequente metabolismo da glucose pela células- $\beta$  altera a atividade do canal iônico, secretando insulina. In Jameson J.L et al, HAR Prin Inter Med, 2018 (1).

A fosforilação da glucose pela Glucocinase é a etapa limitativa da taxa de secreção de insulina regulada pela glucose. Posteriormente, o metabolismo da Glucose-6-Fosfato (G6P) pela glicólise gera ATP, que inibe o Canal de Ião Potássio ( $K^+$ ) sensível ao ATP (KATP). Este canal é composto por duas proteínas distintas, uma compõe o local de ligação de alguns Antidiabéticos Orais (ADO), e a outra uma proteína do KATP. A inibição deste canal induz a despolarização da membrana das células- $\beta$ , abrindo os VDCC, estimulando a secreção de insulina (1).

A secreção de insulina apresenta um padrão pulsátil de libertação hormonal. Outras vias metabólicas intrínsecas às células- $\beta$ , amplificam a secreção de insulina estimulada pela glucose. O GLP-1 e o GIP ligam-se a recetores específicos nas células- $\beta$ , de modo a estimular a secreção de insulina através da produção de AMP Cíclico (cAMP), quando os níveis de glucose sanguíneos se encontram acima dos níveis de glicémia em jejum.

Pensava-se que a libertação de GLP-1 ocorria apenas a partir de células-L neuroendócrinas do trato gastrointestinal após a ingestão de alimentos. No entanto, estudos recentes indicam que a produção de GLP-1 a partir de células- $\alpha$  pode desempenhar um papel na regulação da secreção de insulina (1).

### 2.4.3. Insulina: Ação

A insulina é secretada para o Sistema Venoso Portal, sendo 50% removida pelo fígado. A restante insulina entra na circulação sistémica, acabando por se ligar a recetores em locais alvo. A ligação desta ao seu recetor, estimula a atividade intrínseca do Recetor Tirosina Cinase (RTK), levando à autofosforilação do recetor e ao recrutamento de moléculas de sinalização intracelulares.

Estas iniciam uma cascata complexa de reações de fosforilação e de desfosforilação, resultando em efeitos metabólicos da insulina. A ativação de outras vias de sinalização do recetor de

insulina induz a síntese do glicogénio, a síntese de proteínas, a lipogénese e regulação de vários genes em células insulinosensíveis (1).

## 3. Diabetes Mellitus Tipo 2

A DM2 constitui um grupo heterogéneo de doenças caracterizadas por diversos graus de resistência insulínica, e/ou comprometimento da secreção de insulina, e/ou produção aumentada de glucose hepática.

Diferentes alterações genéticas ou metabólicas na ação ou secreção da insulina, originam o mesmo fenótipo de hiperglicémia nesta patologia (1).

Esta é mais comumente observada em adultos com idade avançada, devido à crescente taxa de obesidade, inatividade física, dieta inadequada e envelhecimento das células- $\beta$ .

Pode manifestar-se através de sintomas semelhantes aos da DM1, contudo, a sua apresentação costuma ser menos exuberante, podendo ser por vezes assintomática (2).

Globalmente, a prevalência da DM2 tem vindo a mostrar-se elevada, sendo impulsionada pelo envelhecimento da população e desenvolvimento económico, que podem proporcionar estilos de vida e hábitos alimentares menos saudáveis (2).

### 3.1. Diagnóstico

A DM pode ser diagnosticada com base em critérios valorativos da GP, sendo estes expressos pelo valor da GP em jejum ou pelo valor da GP, duas horas após a ingestão de 75g de glucose, sendo esta designada como Prova Oral de Tolerância à Glucose (PTOG), ou ainda com base nos valores da Hemoglobina Glicada (HbA1c) (4).

Segundo a Direção-Geral da Saúde (DGS), o diagnóstico da DM é feito com base em alguns parâmetros como:

- a) Sintomas clássicos e Glicémia ocasional  $> 200$  mg/dL;
- b) Glicémia em jejum  $> 126$  mg/dL;
- c) Glicémia após PTOG  $> 200$  mg/dL;
- d) HbA1c  $> 6,5\%$  (29).

O diagnóstico numa pessoa assintomática, não deve ser realizado com base num único valor anormal, devendo ser confirmado em segunda análise.

Numa situação em que o doente apresente sintomas clássicos, a medição da GP é suficiente para diagnosticar DM.

É possível utilizar um só parâmetro para o diagnóstico da DM, contudo, utilizando mais de um parâmetro, estes devem estar concordantes com um só diagnóstico, e caso tal não se verifique é necessária nova avaliação do parâmetro anormal (29).

Tanto a GP em jejum como a PTOG podem ser utilizadas para diagnosticar a DM, sendo a PTOG, o teste com maior taxa de diagnóstico de DM. A HbA1c tem várias vantagens visto que o doente não necessita de estar em jejum para a realização do teste.

Ao utilizar o teste da HbA1c para diagnosticar a DM, é necessário ter em conta que esta é uma medida indireta dos níveis médios de glucose no sangue dos últimos 90 dias, e que estes podem ser alterados por diversos fatores (1).

A ADA recomenda que se faça a triagem de todos os indivíduos com idade superior a 45 anos a cada 3 anos, e triagem em indivíduos mais jovens com IMC  $> 25$  Kg/m<sup>2</sup> ou apresentem um

outro fator de risco para DM. De modo a excluir o diagnóstico de DM1, realiza-se o teste de auto-anticorpos para os IL (4).

## **3.2. Fisiopatologia**

Tanto a resistência insulínica como a secreção hormonal descompensada de insulina são a chave para o desenvolvimento de DM2. É ainda debatível qual das duas situações anteriores aparece primordialmente, contudo, grande parte dos estudos sustenta que a resistência à insulina precede a alteração da secreção de insulina, sendo esta alteração o ponto fulcral para a manifestação de DM2.

A DM2 caracteriza-se pela secreção reduzida de insulina, resistência à insulina, produção em excesso de glucose ao nível hepático, metabolismo anormal da glucose e por fim, inflamação (1).

A tolerância à glucose permanece normal nos estadios iniciais da doença, contudo existe já uma resistência à insulina, compensada pelas células- $\beta$  pancreáticas que aumentam a produção de insulina. Com a progressão da resistência à insulina e da hiperinsulinémia compensatória, existe uma incapacidade por parte dos IL de suportar este estado, resultando em elevações da glicémia pós-prandial. Verifica-se posteriormente um declínio na secreção de insulina, aumentando a produção hepática de glucose que resulta numa hiperglicémia em jejum. Existe também falha nas células- $\beta$ , suprimindo inadequadamente a secreção de insulina, aumentando a produção de glucagon e conseqüentemente a produção de glucose hepática (1).

### **3.2.1. Resistência à Insulina**

A condição de resistência à insulina compreende um espectro de distúrbios, sendo a hiperglicémia um dos sintomas mais prontamente diagnosticados.

Foram descritas em adultos dois síndromes de resistência grave à insulina:

- 1) Tipo A, que afeta maioritariamente mulheres jovens e é caracterizado por hiperinsulinémia grave, obesidade e hiperandrogenismo
- 2) Tipo B, que afeta mulheres de meia-idade e é caracterizado por hiperinsulinémia grave, hiperandrogenismo e distúrbios auto-imunes.

Os indivíduos portadores do tipo A possuem um defeito na via de sinalização da insulina, e indivíduos portadores do tipo B possuem auto-anticorpos direcionados para o recetor de insulina. Estes auto-anticorpos podem bloquear a ligação ou estimular o recetor de insulina, levando a um estado de hiperglicémia intermitente (1).

### **3.2.2. Défice de Insulina**

Inicialmente, na DM2, a secreção de insulina aumenta em resposta à resistência à insulina, de modo a manter normal a tolerância à glucose.

Supõem-se que exista um defeito genético que quando sobreposto à resistência à insulina, promove a alteração da função das células- $\beta$ , assim como do seu estado de diferenciação celular (1).

O ambiente metabólico relacionado com esta patologia impacta negativamente a função dos IL, uma vez que a situação de hiperglicémia crónica promove um agravamento do estado de hiperglicémia. Quando existe controlo dos níveis de glicémia, a função das células- $\beta$  é conservada (1).

Os níveis elevados de Ácidos Gordos Livres (FFA) e de citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos pancreáticos, promove uma disfunção dos IL, e a redução da ação do GLP-1 contribui para a redução da secreção de insulina (1).

### **3.2.3. Tecido Adiposo, Fígado e Músculo Esquelético**

A obesidade central visceral, característica da DM2, é considerada parte do processo patogénico. O aumento da massa de adipócitos promove a existência de níveis aumentados de FFA. As adipocinas, além de regularem o peso corporal, o apetite e o gasto de energia, modulam a sensibilidade à insulina.

Os FFA acabam por prejudicar a utilização de glucose no ME e promovem a produção da mesma pelo fígado, comprometendo o funcionamento das células- $\beta$ . Por outro lado, a produção de adiponectina é reduzida em casos de obesidade, contribuindo para o desenvolvimento de resistência hepática à insulina (1).

A resistência à insulina compromete a utilização da glucose pelos tecidos insulinosensíveis e aumenta a produção de glucose hepática, contribuindo para a hiperglicémia. A resistência insulínica reflete a falha da hiperinsulinémia em suprimir mecanismos como a gluconeogénese, resultando numa maior produção de glucose e diminuição do armazenamento do glicogénio pelo fígado.

Este aumento de produção hepática de glucose ocorre após o défice de secreção de insulina e resistência à mesma no ME. Os níveis do recetor de insulina e a atividade do RTK no ME são reduzidos, no entanto estes advêm secundariamente e não primariamente da hiperinsulinémia. A acumulação de intermediários lipídicos no ME prejudica a fosforilação oxidativa, reduzindo a produção de ATP por parte mitocôndria (1).

## **3.3. Terapêutica**

O objetivo terapêutico primordial da DM é o controlo da glicémia. Assim sendo, a primeira linha terapêutica consiste na alteração do estilo de vida, tendo este um grande impacto ao nível do prognóstico e controlo da doença (30).

Contudo, a DM2 é um distúrbio progressivo, e é comum requerer vários agentes farmacoterapêuticos, assim como a administração parentérica de insulina (30).

Este tratamento deve ser individualizado e otimizado, tendo em conta as diversas comorbilidades dos doentes, sobretudo os mais idosos (31).

Existem vários grupos de fármacos incluídos no grupo dos ADO e destes, a Metformina é a primeira linha farmacoterapêutica na DM2 pelo seu baixo custo, pela sua ação pleiotrópica e por apresentar efeitos adversos não graves e transitórios (32).

## V – Objetivo

A elaboração desta monografia intitulada *Glucose intestinal absorption: A promising target for dietary proteins and Metformin*, tem como objetivos gerais:

1. Aprofundar os mecanismos de ação da Metformina;
2. Determinar o papel dos péptidos intestinais na homeostasia da glucose;
3. Identificar o potencial terapêutico de uma dieta rica em proteínas e pobre em hidratos de carbono na DM2.

Analisando estas questões, é viável definir como objetivos específicos:

1. Do primeiro ponto,
  - Determinação da relação entre a gluconeogénese hepática e a AMPK;
  - Estudo dos mecanismos de ação da Metformina no intestino.
2. Do segundo ponto,
  - Identificação dos transportadores intestinais de péptidos;
  - Estabelecimento da relação entre os péptidos intestinais e o GLP-1.
3. Do terceiro ponto,
  - Analisar o impacto de uma dieta rica em proteínas e pobre em hidratos de carbono, no controlo da glicémia em indivíduos com DM2.

## VI – Materiais e Métodos

Inicialmente foi efetuada uma pesquisa nas bases de dados *Pubmed* e *SciELO*, com os seguintes descritores científicos: *Type 2 Diabetes Mellitus*, *Glucose*, *Metformin*, *Peptides*, *High-protein diet*.

Estes descritores foram emparelhados, tendo sido cada descritor pesquisado individualmente, e em cruzamento, utilizando o booleano AND.

A expressões utilizadas na pesquisa foram: *Type 2 Diabetes Mellitus AND Glucose AND Metformin*, e *Peptides AND Glucose AND High-protein diet*.

Como limitadores de pesquisa foram empregues: a relevância para o tema, o tipo de artigo (*Books and documents*, *Clinical trial* e *Review*), o ano de publicação (1990-2020), o texto completo (*free full text*), a credibilidade das fontes, o resumo acessível e o idioma (português e inglês).

Como critérios de não inclusão considere:

- Estudos que não abordem a DM2, ou a Metformina, ou a glucose, ou os péptidos;
- Estudos que não sejam referentes à área da fisiologia, farmacoterapia e fisiopatologia.

Aplicando os critérios de inclusão e os limitadores de pesquisa, foram encontrados os seguintes estudos:

*Tabela 1: Número de estudos encontrados nas bases de dados.*

	<i>Pubmed</i>	<i>SciELO</i>
<i>Type 2 Diabetes Mellitus AND Glucose AND Metformin</i>	103	12
<i>Peptides AND Glucose AND High-protein diet</i>	31	0

Para complementar a informação obtida, foram consultados os livros *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20ª Edição, e *Metformin – the gold standart*, assim como as *guidelines* da DGS, da ADA, e da OMS.

A pesquisa bibliográfica foi efetuada entre fevereiro e outubro de 2020.

Para a seleção dos estudos utilizei o método “*Assessment of methodological Quality*”.

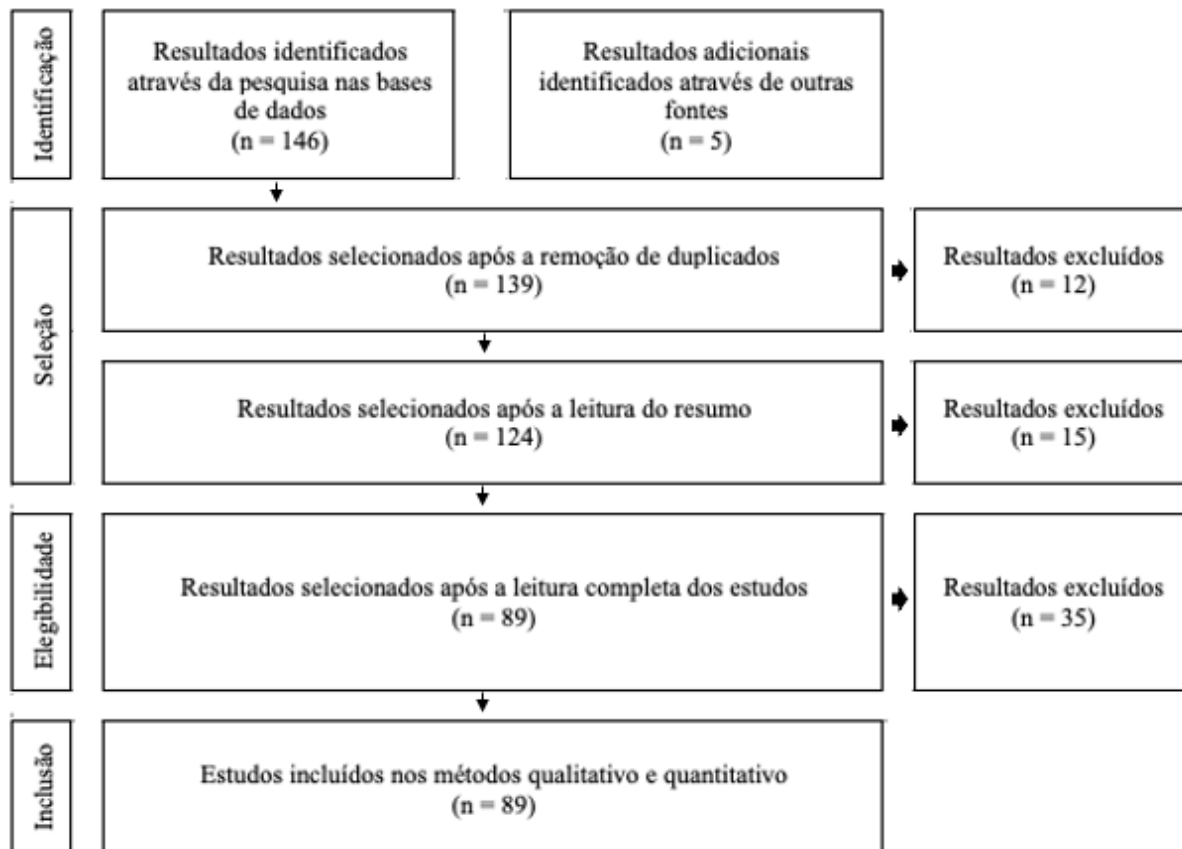


Figura 4: “Assessment of methodological Quality”. Método de seleção dos estudos a utilizar na monografia.

## VII – Discussão

### 1. Metformina: Uma Perspetiva Atual

A Metformina, é um ADO, proveniente da *Galega Officinalis* (33). Esta produz galegina, que foi testada como agente hipoglicemiante na década de 1920 (34).

No início do século XX, observou-se que este componente reduzia as concentrações GP, no entanto, apenas em 1950 se estudou esta biguanida e se desenvolveu a sua primeira forma farmacêutica, o “*Glucophage*” (35).

Ao contrário da maioria dos fármacos, este é derivado de um componente natural, não tendo sido por isso desenvolvido para atingir um mecanismo específico (36).

No final dos anos 90, a Metformina passou a ser o principal fármaco para o tratamento da DM2 (31).

Sabe-se que a Metformina melhora o controlo glicémico, tem um bom perfil de segurança, promove a perda de peso, reduz a mortalidade por eventos cardiovasculares, tem baixo risco de hipoglicémia e baixo custo (31).

A Metformina tem vindo a ser catalogada como um medicamento com atividade pleiotrópica, uma vez que esta apresenta cada vez mais efeitos benéficos à medida que vão sendo feitas novas descobertas sobre este fármaco (37). Contudo, e apesar destas características vantajosas, uma elevada proporção de doentes não tolera este fármaco devido aos seus efeitos gastrointestinais (33).

#### 1.1. Farmacocinética

A Metformina é administrada por via oral na forma farmacêutica de comprimido. Geralmente encontra-se na forma catiónica, sendo hidrofílico a pH fisiológico, e tem baixa lipossolubilidade, tornando pouco provável a sua difusão passiva através das membranas lipídicas celulares (33).

A absorção da Metformina de libertação imediata é maioritariamente realizada ao nível do ID, sendo a absorção gástrica e no intestino grosso insignificante (38).

A biodisponibilidade oral da Metformina é de entre 50 a 60%, sendo a dose recuperada nas fezes de Metformina inalterada de cerca de 30%. No entanto, a biodisponibilidade pode ser alterada pela motilidade gástrica e pode ser reduzida se o fármaco for administrado concomitantemente com uma refeição com alto teor lipídico (33).

A concentração de Metformina no jejuno é cerca de 30 a 300 vezes maior do que as concentrações plasmáticas, sendo por isso o ID um importante local de estudo da captação de Metformina (39).

Foram sendo desenvolvidas formulações de libertação modificada de Metformina, de modo a tornar mais uniforme a absorção do fármaco ao longo do intestino, reduzindo a concentração do medicamento num só local.

Uma das formulações de Metformina de liberação modificada utiliza um polímero que permite atrasar o trânsito intestinal e assim retardar a sua liberação ao longo do intestino (33). Recentemente foi desenvolvida uma outra formulação que permite uma dissolução dependente do pH (40).

Quando comparada com a formulação de liberação imediata, a Metformina de liberação modificada apresenta menor biodisponibilidade, embora a eficácia na redução da glicose seja semelhante (40).

A Metformina é eliminada através da urina, inalterada, não existindo evidência de metabolitos resultantes deste fármaco (39). Estudos confirmam que a administração intravenosa de Metformina resulta em eliminação renal rápida, não sendo praticamente detectável ao nível das fezes, o que é consistente com a absorção deste fármaco ao nível gastrointestinal (38).

## **1.2. Transportadores Membranares**

Estudos em células Caco-2 demonstraram que a Metformina é eficientemente absorvida pela AP dos enterócitos, através de transportadores bidirecionais (41).

Foram identificados vários transportadores para os quais a Metformina é o substrato principal, como o Transportador de Catiões Orgânicos (OCT) 1 a 3, o Transportador Membranar da Monoamina (PMAT), e o Transportador de Serotonina (SERT) (41).

Os OCTs são expressos em vários tecidos, como o intestino, o fígado, o rim, o cérebro, os músculos e o coração (33).

O Transportador de Catiões Orgânicos 1 (OCT1) é predominantemente expresso no fígado, mas desempenha um papel importante na transferência de catiões do lúmen intestinal para o interstício, nomeadamente a Metformina (33). Postulava-se que o OCT1 se localizava na BL (42), no entanto, estudos recentes indicam que este se encontra na AP das células epiteliais do intestino (43).

Relativamente ao Transportador de Catiões Orgânicos 2 (OCT2), este é expresso maioritariamente a nível renal, sendo a excreção de Metformina feita parcialmente pelo rim (33).

O Transportador de Catiões Orgânicos 3 (OCT3) é expresso no ME e no intestino, estando associado à captação e efluxo de Metformina nas glândulas salivares, o que pode explicar a alteração do paladar associada ao tratamento com este fármaco (44).

O PMAT é caracterizado por ser encontrado em vários tecidos do corpo, incluindo o intestino, sendo por isso poliespecífico. Localiza-se na camada epitelial da mucosa, o que sugere o papel fulcral deste recetor na captação de Metformina (45).

Estudos recentes indicam que os transportadores que estão envolvidos no transporte de Metformina através da AP de enterócitos são o OCT1, PMAT e SERT, responsáveis cada um por entre 25 a 15% do transporte de Metformina (43).

### 1.3. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação celular da Metformina permaneceu desconhecido durante alguns anos, no entanto, estudos recentes permitiram retirar algumas conclusões acerca deste (37).

Relativamente ao mecanismo de ação da Metformina, sabe-se que este fármaco tem um efeito hipoglicemiante, consequência da inibição da produção hepática de glucose e da sensibilização dos tecidos periféricos ao efeito da insulina (37).

### 1.4. Fígado

Sabe-se que a Metformina atua a nível hepático, de modo a melhorar os níveis de glucose (36).

Em murganhos *knockout* para OCT1, a absorção hepática de Metformina é praticamente nula (36), pelo que a ação desta na redução de glucose sanguínea pós-prandial foi ineficaz (46).

Por outro lado, estudos realizados em humanos demonstraram uma redução da gluconeogénese hepática, mediada pela Metformina, tendo esta redução um impacto diminuto na captação periférica de glucose mediada pela insulina (36).

Em estudos controlados através de placebo, verificou-se um impacto não significativo da Metformina na produção de glucose endógena (47).

Por fim, vários estudos em hepatócitos fornecem evidência para o papel da Metformina tanto na redução da gluconeogénese ao nível do fígado, como da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina (36).

#### 1.4.1. Gluconeogénese Hepática

A Metformina é conhecida por inibir a gluconeogénese hepática através de vários mecanismos representados na Figura 6 (48). Tendo assente que a gluconeogénese é um processo do qual resulta um gasto de energia (consome seis equivalentes de ATP por cada molécula de glucose que é sintetizada), é necessário que os hepatócitos equilibrem o gasto de ATP e a síntese do mesmo ao nível da mitocôndria (36).

A Metformina acumula-se dentro da mitocôndria, uma vez que este fármaco possui carga global positiva, o que promove a sua entrada para a célula, e posteriormente para o interior da mitocôndria (36).

A inibição do Complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria, por ação da Metformina, e que consequentemente suprime a produção de ATP, é uma das ações deste fármaco mais extensamente estudada (49).

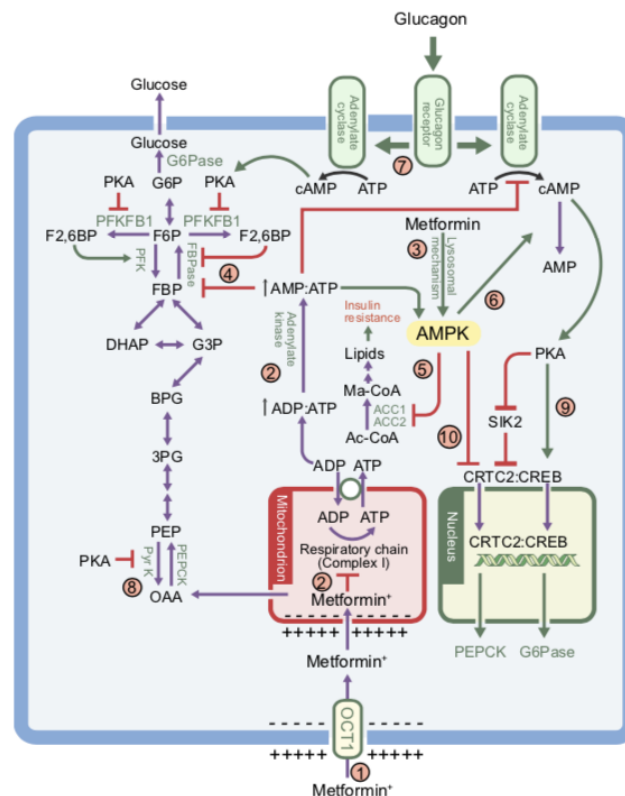
Uma outra consequência da inibição da cadeia respiratória, para além da modulação da produção de ATP, é a alteração do rácio  $NAD^+ : NADH$  (50).

O glucagon é também responsável pela gluconeogénese hepática, sendo que a sua secreção excessiva pelas células- $\alpha$  pancreáticas em doentes com DM2 é um dos elementos cruciais da patogénese desta síndrome (36).

O glucagon, ao ligar-se aos recetores dos hepatócitos, ativa a adenilato ciclase, promovendo a formação de cAMP, que por sua vez estimula a Proteína Cinase A (PKA), conduzindo à produção hepática de glucose (36).

Estudos postulam que a Metformina enfraquece o efeito do glucagon após a sua ligação aos recetores dos hepatócitos, reduzindo a produção de cAMP nessas células (51).

A Metformina, ao inibir o Complexo I da cadeia respiratória, conduz ao acúmulo de AMP, que por sua vez inibe a adenilato ciclase, e conseqüentemente, a produção de cAMP. A redução da quantidade de cAMP inibe a atividade da PKA, diminuindo a gluconeogénese ao nível do fígado (51).



**Figura 6: Mecanismos pelos quais a Metformina afeta o metabolismo do fígado.** (1) A captação de Metformina pelos hepatócitos é catalisada pelo OCT1. (2) A Metformina inibe o Complexo I mitocondrial, impedindo a produção de ATP, aumentando as relações citoplasmáticas de Adenosina Difosfato (ADP):ATP e AMP:ATP, ativando a AMPK. (3) A AMPK pode ser ativada por um mecanismo lisossomal. (4) Aumentos na razão AMP:ATP também inibe a frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase), resultando na inibição da gluconeogénese e da adenilato ciclase, reduzindo a produção de cAMP. (5) A AMPK ativada fosforila as isoformas ACC1 e ACC2 de Acetil Coenzima A Carboxilase (ACC), inibindo a síntese e promovendo a oxidação dos ácidos gordos, reduzindo a quantidade de lipídios hepáticos e aumentando a sensibilidade à insulina hepática. (6) A AMPK também fosforila e ativa a 3', 5'-fosfodiesterase cíclica 4B (PDE4B), reduzindo assim o cAMP. (7) O aumento de cAMP induzido pelo glucagon ativa a PKA, promovendo a gluconeogénese pela fosforilação e inativação de frutose-2,6-bisfosfatase (PFKFB1), causando uma diminuição na frutose-2,6-bisfosfato (F2,6BP), um ativador alostérico da fosfofrutocinase (PFK) e inibidor de FBPase. (8) PKA também fosforila e inativa a isoforma hepática da enzima glicolítica piruvato cinase (Pyr K) e (9) fosforila a proteína de ligação ao cAMP do fator de transcrição (CREB), induzindo assim a transcrição dos genes que codificam as enzimas gluconeogénicas PEPCK e G6Pase. (10) A fosforilação do co-ativador transcripcional regulado por CREB-2 (CRTC2) pelo AMPK, ou por cinases relacionadas a AMPK, permite que o CRTC2 seja retido no citoplasma, antagonizando os efeitos de PKA na transcrição de PEPCK e G6Pase. PKA inibe a Cinase induzível por sal 2 (SIK2) por fosforilação direta. In Rena G. et al, *Diabetologia*, 2017 (36).

Nos últimos tempos foi proposto um novo alvo mitocondrial da Metformina (36), representado na Figura 7. A produção endógena de glucose, principalmente a nível hepático, foi inibida passados 60 minutos após a administração de Metformina intravenosa em ratinhos, tendo sido verificado um aumento da razão lactato:piruvato, o que indica alterações no mecanismo de reoxidação do NADH (forma reduzida do Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (NAD)) citoplasmático (52).

O *Shuttle* do Glicerolfosfato (SG3P) é um dos dois sistemas que transportam equivalentes redutores do citoplasma para o interior da mitocôndria, de modo a favorecer a reoxidação (52).

Em ensaios em células, verificou-se que a Metformina inibe a Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase Mitocondrial (mGPD). Esta enzima é o componente chave na integração das vias metabólicas dos hidratos de carbono, e dos lípidos (53).

Em suma, o SG3P permite a entrada do NADH, produto da glicólise citoplasmática, na mitocôndria, onde ocorre a regeneração do  $NAD^+$  (forma oxidada do NAD) citoplasmático e a produção de ATP (36).

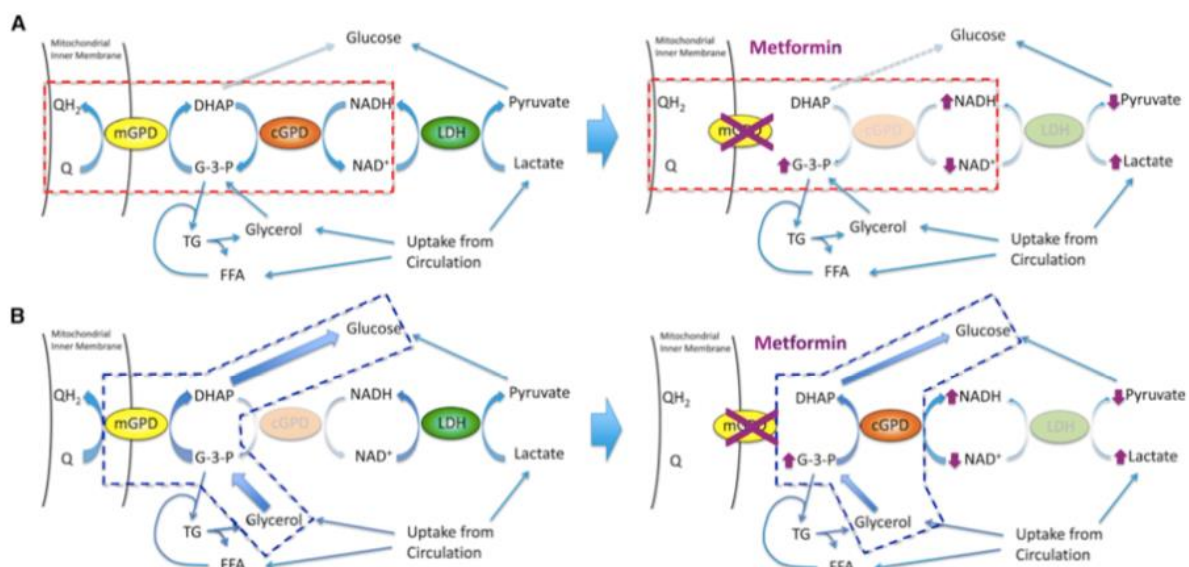
A conversão de Glicerol-3-Fosfato (G3P) em Dihidroxiacetona Fosfato (DHAP) é dificultada pela inibição de mGPD, inibindo também a gluconeogénese a partir do glicerol (36).

A redução dos níveis de  $NAD^+$  resulta na acumulação do lactato, uma vez que a sua transformação em piruvato é negligenciada, e a gluconeogénese hepática é inibida (48).

Esta acumulação de lactato ao nível celular é bastante recorrente em doentes em tratamento farmacológico com Metformina (37).

Contudo, a inibição do SG3P aparenta não ser suficiente para ter impacto na gluconeogénese, uma vez que o *shuttle* malato/aspartato compensa a inibição do SG3P, a menos que o potencial da membrana mitocondrial seja também anulado (52).

Portanto, tanto a inibição do mGPD como do Complexo I da cadeia respiratória contribuem para o efeito redutor da glucose sanguínea pela Metformina (36).



**Figura 7: A ação da Metformina e a incorporação do lactato na glucose.** a) A ação da Metformina inibe o mGPD, aumentando o NADH citosólico e bloqueando a incorporação do lactato na glucose. Se o mGPD utilizar

predominantemente o SG3P, a inibição pela Metformina retarda a remoção de NAD, aumentando a razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólico. (b) Se a conversão de glicerol em glucose for significativa, a inibição do mGPD pela Metformina pode condicionar a acumulação de G3P, favorecendo a oxidação de DHAP pela cGPD (Glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica). In Baur J.A. et al, Cell Metab, 2014 (52).

### 1.4.2. Ativação da AMPK

A capacidade da Metformina de ativar a AMPK pode ser explicada pela inibição da função mitocondrial. A AMPK é ativada por aumento do rácio AMP:ATP e ADP:ATP, o que indica um mecanismo de restauração do desequilíbrio energético celular, através da ativação das vias catabólicas e supressão dos vias anabólicas (36).

As moléculas de AMP ativam a AMPK diretamente através da ligação da subunidade- $\gamma$  da enzima, ou indiretamente, inibindo a sua desfosforilação (54).

A Metformina inibe o Complexo I da cadeia respiratória, reduzindo o ATP intracelular. A quantidade de AMP aumenta, estimulando a AMPK. Esta cinase é ativada mesmo quando o défice de ATP é baixo, promovendo uma *down-regulation* das vias metabólicas consumidoras de energia, como a síntese de proteínas e lípidos (49).

Contudo, a AMPK pode também ser ativada por depleção dos níveis de glucose e por concentrações reduzidas de Metformina, por mecanismos envolvendo a formação de complexos proteicos lisossomais (56).

Assim, é possível concluir que a AMPK pode ser ativada pela Metformina através de mecanismos que envolvem quer o lisossoma, quer a mitocôndria (36).

Com a estimulação da AMPK existe um aumento da translocação membranar do GLUT, reforçando o transporte de glucose para o interior da célula. Consequentemente, a produção de ATP aumenta através de uma maior captação de glucose da corrente sanguínea, do aumento da glicólise e da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos (54).

A Metformina é também responsável por processos de autofagia através da ativação da AMPK. A autofagia é um processo catabólico, onde inicialmente, parte do citoplasma é circundada pelo autofagossoma, que posteriormente se une a um lisossoma, digerindo os componentes macromoleculares do citoplasma (37).

Sabe-se que a autofagia é um processo necessário para a sobrevivência das células em condições de stress, pelo que, a sua indução pela Metformina pode reduzir os processos inflamatórios, associados à obesidade (37).

### 1.4.3. AMPK e a Resistência à Insulina

A Metformina, quando utilizada por períodos longos, pode aumentar a sensibilidade hepática à insulina, sendo este processo mediado pela AMPK. Esta fosforila duas isoformas de ACC, a ACC1 e ACC2, inibindo esta enzima chave na síntese de lípidos, e favorecendo a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos (57).

Em estudos realizados em murganhos com *knock-in* de resíduos alanina não fosforilável em substituição dos resíduos de serina (ACC1-S79A e ACC2-S212A), verificou-se o aumento da

síntese ácidos gordos, e níveis elevados de diacilglicerol e triacilglicerol tanto no tecido hepático, como muscular (37).

Estes apresentavam intolerância à glucose e resistência insulínica, mesmo quando expostos a um regime alimentar normal. Quando expostos a uma dieta rica em gorduras, os murganhos controlou tornaram-se também hiperglicémicos e intolerantes à glucose (37).

No entanto, após a exposição de ambos os grupos ao tratamento com Metformina, houve uma melhoria dos níveis do grupo controle, enquanto que no grupo *knock-in* não existiu qualquer alteração (57).

Estes resultados indicam que a Metformina aumenta a sensibilidade à insulina, por fosforilação da ACC1 e da ACC2. Sabendo que a fosforilação de ACC é suprimida pelo *knock-out* da AMPK, os efeitos de sensibilização da Metformina à insulina a longo prazo, demonstram ser mediados pela AMPK (36).

## 1.5. Intestino

Entre os órgãos alvo da Metformina encontra-se o intestino (58), que através da ação deste fármaco vê o metabolismo anaeróbio da glucose aumentado nos enterócitos (36).

Estudos recentes referem o intestino como principal local de ação da Metformina, como representado na Figura 8, em detrimento do fígado, pois este último pode não ter um papel tão relevante para a ação da Metformina em doentes com DM2 (47).

A Metformina induz a secreção do GLP-1 pelas células-L do ID. O GLP-1 é uma hormona incretina, que em condições fisiológicas é responsável pelo incremento da secreção de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas, aquando da ingestão de alimentos (37).

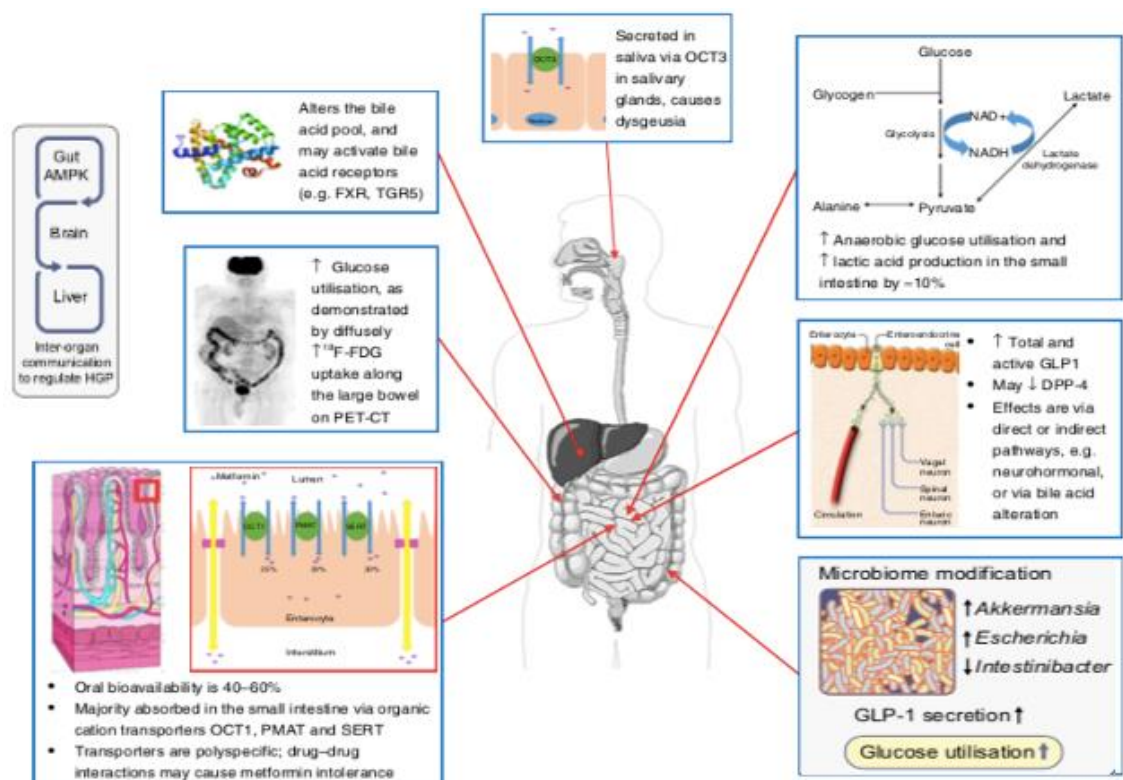
Quando o GLP-1 se liga ao recetor da célula- $\beta$ , estimula a secreção de insulina, consoante os níveis de GP, impedindo o surgimento de situações de hipoglicémia. (37)

Estudos indicam que a Metformina reduz a atividade do SGLT-1 e aumenta a quantidade de GLUT-2 na AP do jejuno. Estes sugerem que a localização do GLUT-2 na AP é mediada pela fosforilação de AMPK (59).

Sabe-se que a Metformina aumenta a absorção e utilização da glucose no intestino, o que propicia um aumento da produção de lactato ao nível dos enterócitos (39).

É sabido que a Metformina promove um incremento da utilização de glucose ao nível intestinal, sendo este processo visível numa Tomografia por Emissão de Positrões (PET), onde doentes em tratamento farmacológico com Metformina demonstram a existência da captação intestinal, predominantemente ao nível do cólon, de Fluorodeoxiglucose (FDG) (60).

Este aumento da captação de FDG é acompanhado de um aumento simultâneo da fosforilação de AMPK apenas nos enterócitos do cólon, onde se verifica uma quase-ausência de glucose ao nível do lúmen, remetendo para um aumento da captação no cólon e do metabolismo da glucose sistémica por influência deste fármaco (60).



**Figura 8: A Metformina e o trato gastrointestinal.** A Metformina é absorvida via OCT, PMAT e SERT, promovendo a alteração da microbiota intestinal. In McCreight L.J. et al, Diabetologia, 2016 (33).

### 1.5.1. Péptido Semelhante ao Glucagon 1

O GLP-1 é secretado pelas células-L, que se encontram distribuídas ao longo do intestino, principalmente ao nível do íleo. Este é degradado pela Dipeptidilpeptidase-4 (DPP4) ao nível da mucosa intestinal e da circulação portal (33).

A administração de Metformina demonstrou amplificar a concentração do GLP-1 pelo aumento da sua secreção pelas células-L, e/ou pela redução da sua degradação pela DPP4. (33)

Vários estudos sugerem que quando a terapêutica com Metformina é feita concomitantemente com um inibidor da DPP4 existe um aumento na concentração de GLP-1 (61).

Estudos mais recentes reforçam o efeito direto da Metformina nas células-L, onde existe um aumento na expressão do gene que codifica o pró-glucagon (62).

### 1.5.2. Ácidos Biliares

A Metformina aumenta a quantidade de ácidos biliares no intestino, uma vez que a absorção ao nível do íleo se encontra reduzida (33).

Verifica-se então uma alteração ao nível da circulação enterohepática, que consequentemente compromete a homeostasia do colesterol e da glucose (33).

A absorção de ácidos biliares ao nível do jejuno é um processo predominantemente passivo, não saturável e dependente da concentração, ocorrendo o oposto ao nível do íleo, em que a absorção é um processo ativo (33).

O Recetor Farnesoid X (FXR) envolvido na absorção ileal, síntese e secreção hepática de ácidos biliares, permite que a AMPK se ligue a si, reprimindo-o por meio de fosforilação direta, o que reduz a sua atividade transcripcional, e conseqüentemente a absorção dos ácidos biliares (63).

A Metformina, sendo um ativador da AMPK, pode potenciar os efeitos sobre a quantidade de ácidos biliares através deste recetor, conduzindo a uma redução na absorção dos mesmos. Este mecanismo permitiu que fosse sugerido também como tratamento farmacológico para a redução dos níveis de colesterol (33).

A alteração da absorção dos ácidos biliares origina também um aumento na secreção de GLP-1 (64), sendo que foi observada uma absorção reduzida destes ácidos aquando da ação concomitante da Metformina, sendo este um efeito deste fármaco nos enterócitos (33).

### **1.5.3. Eixo Intestino-Cérebro**

Outro mecanismo ainda pouco estudado da Metformina envolve um eixo que relaciona a exposição intestinal à Metformina, ao nível do duodeno, à inibição da produção da glucose hepática por meio de neurónios eferentes do núcleo do trato solitário através da ativação dos recetores AMPK e GLP-1. Este eixo é designado como eixo intestino-cérebro (65).

Estudos recentes indicam que a Metformina influencia o eixo intestino-cérebro. Nestes estudos foi avaliado o efeito da infusão intraduodenal de Metformina na produção de AMPK da mucosa duodenal e posterior produção de glucose ao nível hepático (65).

Verificou-se a necessidade de aumentar a taxa de infusão de glucose de modo a que existisse manutenção da euglicémia durante os 60 minutos iniciais da administração intraduodenal de Metformina (65).

Contudo, quando a Metformina foi infundida ao nível da veia porta hepática, não existiu qualquer aumento na taxa de infusão de glucose, não tendo havido diminuição na produção de glucose hepática (65).

Com base nestes pressupostos, foi levantada a questão de que a Metformina teria um efeito ativador sobre os recetores GLP-1, de modo a aumentar a atividade da PKA nos aferentes vagais ao nível do intestino (36).

Estes aferentes promovem a transmissão para os recetores N-metil-D-aspartato (NMDA), sinalizando as fibras eferentes do nervo vagal hepático, o que permite uma redução da glucose que é produzida a nível hepático (36).

Para averiguar o efeito pré-absortivo da Metformina, a via neuronal foi bloqueada através de antagonistas do GLP-1 e inibidores da PKA, tendo-se verificado uma perda parcial deste efeito (36).

Assim, é possível destacar mais uma vez a importância do ID como local de ação da Metformina, dando ênfase a esta nova via de ação da Metformina, o eixo intestino-cérebro (36).

#### 1.5.4. Microbiota Intestinal

A Microbiota intestinal e o seu respetivo genoma microbiano são atualmente um dos alvos de pesquisa mais frequente, uma vez que se tem vindo a verificar que estes constituem fatores ambientais que contribuem para o estabelecimento de algumas patologias como a obesidade, síndrome metabólica e DM2 (33).

Estudos da microbiota intestinal em mulheres com DM2, tratadas com Metformina, verificaram que estas apresentavam um aumento acentuado da concentração da bactéria *Akkermansia muciniphila* e um aumento também das células caliciformes, produtoras de mucina (66).

Estudos mais recentes indicam um aumento dos níveis de *Escherichia spp.* e o oposto nos níveis de *Intestinibacter spp.* no intestino, após a administração de Metformina em doentes com DM2 (36).

Estes estudos reforçam que as alterações da microbiota intestinal se devem ao uso de Metformina e não à DM2 em si. Com o aumento dos níveis de *Escherichia spp* e *Akkermansia muciniphila* e a diminuição dos níveis de *Intestinibacter spp*, existe um aumento da secreção de GLP-1 e conseqüentemente de insulina (36).

## 2. Péptidos: Uma Perspetiva Futura

Como foi já referido anteriormente, a prevalência global da DM tem vindo a aumentar a uma velocidade considerada alarmante (3).

Este estado patológico de hiperglicémia leva ao desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares, sendo, portanto, de extrema importância o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de modo a reestabelecer normoglicémia (67).

Estudos realizados em humanos e roedores demonstram que uma alimentação rica em proteínas promove uma melhoria da homeostasia da glucose, contudo, os mecanismos que promovem esta normalização dos níveis de glucose permanecem desconhecidos (67).

Relatos de 1913 postulam que a ingestão de proteína proveniente da clara de ovo não resultou num aumento dos níveis de glicémia no sangue em indivíduos saudáveis (16).

No entanto, estudos posteriores indicam que a concentração de glucose não aumenta após a ingestão de uma refeição altamente proteica em indivíduos saudáveis ou com DM2, tendo-se verificado por vezes uma diminuição desses valores em situação pós-prandial, em indivíduos com DM2 (68).

Verificou-se também que a ingestão de uma dieta rica em proteínas aumenta os níveis de hormonas produzidas ao nível do intestino, como colecistocininas (CCK) e GLP-1, e que o Transportador de péptidos 1 (PepT1) promove a deteção de proteínas do ID de forma a regular a produção de glucose, tendo sido relatado que este mecanismo envolve o eixo intestino-cérebro (67).

Estudos mais recentes indicam que os mecanismos mediados pelo PepT1 promovem a homeostasia da glucose. A inibição deste transportador reverte a capacidade pré-absortiva da infusão de caseína de modo a incrementar a tolerância à glucose e anular a produção desta (67).

O papel na regulação da glucose pelo PepT1 no ID de ratos saudáveis é expresso pela interrupção da homeostasia da glucose após uma refeição proteica quando existe inibição deste transportador (67).

Relativamente aos mecanismos de deteção proteica mediados pelo PepT1, estes promovem a normalização dos níveis de glucose numa situação de resistência insulínica precoce e obesidade (67).

A demonstração que os péptidos existentes na composição do feijão preto inibem a absorção de glucose, indica que esta via pode ser transversal a outros péptidos (69).

### 2.1. Péptidos e Proteínas

Até ao início dos anos 50, os produtos resultantes da digestão proteica eram designados como AAs livres, tendo sido a estes associados alguns mecanismos de transporte. No entanto, posteriormente foram realizados alguns estudos relativamente aos produtos de digestão de proteínas no lúmen do intestino, tendo-se verificado que estes eram maioritariamente

associações de AAs, como dipéptidos e tripéptidos, sendo que a absorção dos mesmos era feita ao nível do ID (70).

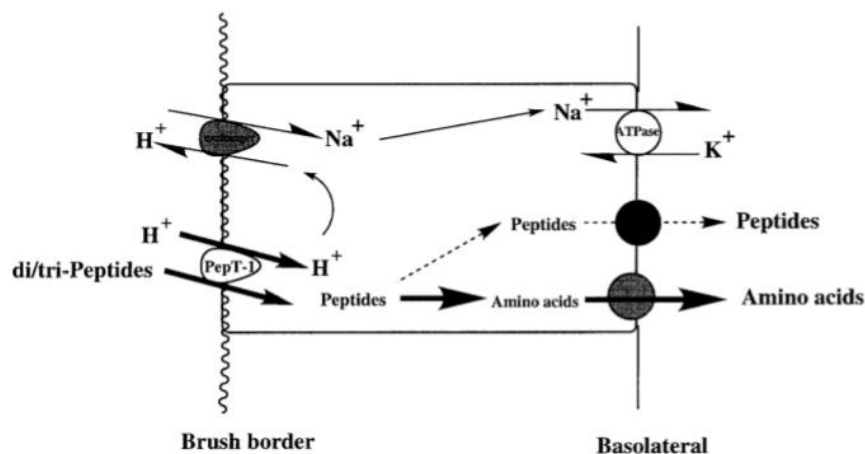
Estudos em humanos verificaram que existe um processo de captação competitiva entre AAs livres e dipéptidos, através mecanismos de transporte diversos, observados em patologias associadas a alterações no transporte de AAs, tendo-se verificado que quando se encontravam na sua forma livre, os AAs tinham uma absorção diminuta relativamente aos dipéptidos que apresentaram um incremento de absorção nesta forma (71).

### 2.1.1. Transportador de Péptidos

Tendo por base a dominância de absorção de dipéptidos, colocou-se a hipótese de existir um sistema exclusivo para o transporte das formas conjugadas de AAs, representado na Figura 9 (71).

Estudos realizados em animais de experiência e humanos validaram esta hipótese através da clonagem do transportador de oligopéptidos intestinais (71).

Foi também demonstrado por estudos fisiológicos e moleculares que o PepT1, está presente na AP dos enterócitos, não fazendo parte da constituição da BL dos mesmos (71).



**Figura 9: Transportador PepT1.** Processos que estão envolvidos na função do transportador intestinal de di e tripéptidos. In Adibi S.A., *Gastroenterology*, 2004 (71).

A contrário de outros transportadores, o PepT1 apresenta um grande leque de substratos, produzidos através das proteínas da dieta (72).

Por outro lado, este transportador apresenta uma dependência relativamente do gradiente de prótons aquando da absorção dos oligopéptidos ao nível do enterócito, uma vez que este é um co-transportador de péptidos e Ião Hidrogénio (H<sup>+</sup>), ao contrário de outros transportadores que dependem do gradiente de Na<sup>+</sup> (73).

O transporte de dipéptidos e tripéptidos através das células epiteliais do intestino envolve: um transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que se localiza na membrana luminal, de modo a manter o pH intracelular alcalino; um transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase na BL, que promove a manutenção do

potencial de membrana negativo no interior da célula; e algumas peptidases citoplasmáticas, que previnem a acumulação de péptidos (71).

Estas enzimas convertem os dipéptidos e tripéptidos em AAs livres, sendo estes utilizados pelos enterócitos e posteriormente libertados para a circulação portal (74). Os polipéptidos que não são hidrolisados pelas peptidases existentes no citoplasma são transportados pela BL para a circulação portal através de um transportador de polipéptidos, díspar do PepT1 (71).

O facto de serem utilizados tanto o gradiente de  $Na^+$  como o de  $H^+$  como forças motrizes para a absorção ativa de AAs e dipéptidos, permite ao organismo manter um aporte proteico adequado uma vez que estes processos absorptivos podem ocorrer de maneira paralela, não existindo um mecanismo competitivo (74).

O PepT1 é expresso na AP dos enterócitos intestinais, nas células do túbulo proximal do rim e nas células epiteliais do ducto biliar (75).

Possui uma alta capacidade, porém uma baixa afinidade (75), sendo expresso principalmente ao nível das microvilosidades apicais dos enterócitos intestinais.

Ao nível do rim o PepT1 reabsorve péptidos resultante do filtrado do túbulo proximal, tendo uma ação conjunta com o PepT2, um transportador semelhante ao PepT1 (76).

Ao longo do ID verificam-se variações na capacidade de absorção tanto de AAs como de polipéptidos (74). A capacidade de absorção dos dipéptidos e tripéptidos é superior ao nível do ID proximal, podendo este facto ser explicado pela maior atividade das peptidases citosólicas neste segmento (71).

Ao nível da BL dos enterócitos verifica-se a existência de sistemas de transporte de AAs, sendo que os mecanismos dependentes de  $Na^+$  permitem o aporte de AAs para as células intestinais, e por outro lado, os mecanismos independentes permitem o transporte para a corrente sanguínea (74).

O PepT1 tem também um papel relevante na absorção oral de fármacos que contenham estruturas semelhantes aos péptidos, nomeadamente antibióticos da classe das Penicilinas e das Cefalosporinas. Este facto permitiu envolver este transportador na absorção de alguns fármacos, aumentando a sua biodisponibilidade ao nível do intestino (76).

As Sulfonilureias foram identificadas como fármacos inibidores do PepT1 (77).

### **2.1.2. Influência de Péptidos na Homeostasia da Glucose**

Com base em estudos anteriores foram referenciados vários mecanismos através dos quais a ingestão de alimentos com elevado teor proteico podem promover uma melhoria da tolerância à glucose, através do aumento da secreção insulínica, diminuição do teor de hidratos de carbono na dieta e uma taxa e esvaziamento gástrico reduzida, o que permite um aparecimento mais retardado da glucose no sangue (78).

Por outro lado, um aumento da ingestão proteica ativa o eixo intestino-cérebro através da ativação de recetores opióides que aumentam a gluconeogénese no fígado, controlando a ingestão de alimentos (79).

Foram conduzidos alguns estudos em roedores que mostram a influência de uma dieta hiperproteica na melhoria da homeostasia da glucose. Verificou-se que o aumento da ingestão de proteína durante algumas semanas, permite melhorar o peso corporal, a percentagem de tecido adiposo, a sensibilidade insulínica e os níveis de HbA1c (80).

Num outro estudo de 5 semanas de alimentação hiperproteica em doentes diabéticos, verificou-se uma manutenção do peso corporal, embora uma melhoria da tolerância à glucose (68).

Esta descoberta indica que dietas ricas em proteína permitem uma regulação da homeostasia da glucose independentemente dos seus efeitos ao nível do peso corporal e da ingestão de alimentos. A ingestão de uma dieta rica em proteínas a curto prazo permite reduzir os níveis de glucose pós-prandial quando comparada com a ingestão de uma dieta rica em hidratos de carbono (67).

Assim, é possível inferir uma relação entre uma dieta hiperproteica e a redução dos níveis de glucose no sangue, e conseqüente controlo glicémico em doentes com DM2. Esta melhoria no controlo da homeostasia da glucose resulta da redução da percentagem de hidratos de carbono na dieta (81).

O aumento da percentagem de proteína diminuiu a glicémia pós prandial, o que sugere que a influência na regulação da glucose após a ingestão aguda de proteína provem da presença dessa mesma proteína (81).

Os mecanismos de deteção de proteínas ao nível do intestino ativam o eixo intestino-cérebro, em que a libertação de péptidos ao nível do intestino estimula ramos aferentes do nervo vago (67).

Existem diversos recetores sensoriais do intestino que permitem a ativação do eixo que regula a ingestão de alimentos, sendo um deles o PepT1, que como já referimos anteriormente é um transportador expresso na AP de células neuroendócrinas do intestino, sendo considerado um transportador primário de oligopéptidos (82).

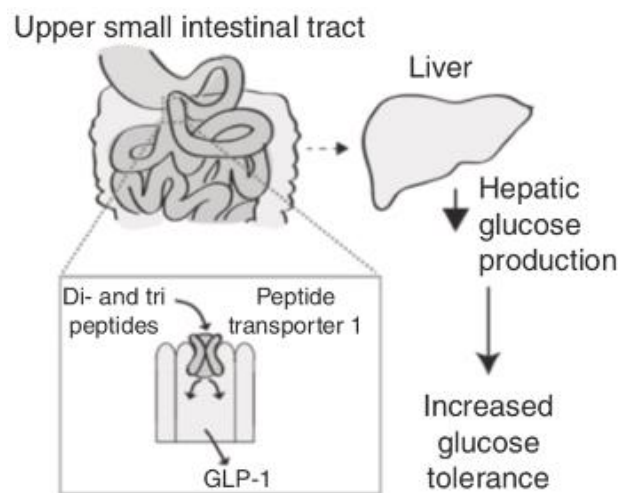
A ativação PepT1 por substratos não metabolizáveis permite a despolarização da membrana, resultando na ativação dos péptidos intestinais (83), e, por outro lado, a sua inibição suprime a ativação das fibras aferentes vagais após uma infusão de proteínas hidrolisadas (84).

Os estudos disponíveis sugerem que os mecanismos de deteção das proteínas intestinais apresentam um papel crucial na relação entre uma dieta rica em proteínas e uma melhoria da tolerância à glucose, tanto em roedores e humanos, saudáveis e com DM2. Assim, a administração aguda de proteínas no ID promove um incremento da tolerância à glucose através de mecanismos mediados tanto pelo PepT1 como pelo GLP-1 (67).

Estudos anteriores demonstraram que a ativação do PepT1 promove a libertação de GLP-1 (83). Posteriormente verificou-se que a ingestão de proteínas através da dieta aumenta os níveis de péptidos circulantes no intestino, como a CCK, o GLP-1 e o Péptido YY (PYY) (85). Foi ainda demonstrado que o PYY está envolvido na relação entre a ingestão de proteína e a saciedade e percentagem de tecido adiposo (86).

Para além disso, é também importante reforçar que na ingestão de proteína e lípidos na mesma quantidade calórica, a proteína promove uma maior estimulação da libertação de GLP-1 e PYY (85).

Sendo o PepT1 um transportador exclusivo de dipéptidos e tripéptidos (81), é possível inferir que estes são responsáveis pelos efeitos observados na regulação da homeostasia da glicose, como se esquematiza na Figura 10 (67).



**Figura 10: Absorção de péptidos intestinais.** A absorção de di e tripéptidos ao nível do ID permite a libertação de GLP-1, reduzindo a produção de glicose hepática, e aumentando a tolerância a esta. In Dranse H.J. et al., *Nat Commun*, 2018 (67)

Num estudo recente foram utilizadas diferentes abordagens, tanto químicas como moleculares, tendo sido possível realçar um outro papel do PepT1 ao nível metabólico no ID. Verificou-se que tanto o aumento da quantidade de proteína na dieta, como o jejum, incrementaram a expressão do PepT1 (67).

Neste estudo foi possível inferir que a ação do PepT1 na regulação da homeostasia da glicose só é relevante em situação pós-prandial de uma refeição hiperproteica (83).

Helen et al. demonstraram que fazendo um *knock-down* em 40% do PepT1, existe uma supressão da capacidade dos péptidos em diminuir a glicémia pós-prandial (67).

Caso exista uma redução na expressão do PepT1, a despolarização da membrana é suprimida, não ocorrendo a secreção de GLP-1, e conseqüente redução do seu papel enquanto glucoregulador. No entanto é necessário que este mecanismo seja mais aprofundadamente investigado (67).

Este estudo revelou ainda que este mecanismo dependente do PepT1 é funcional mesmo em roedores que apresentem resistência insulínica, obesidade e hiperglicemia, o que reforça mais uma vez a relevância dos mecanismos de deteção proteica no intestino (67).

A expressão deste transportador é regulada por diversos parâmetros como o desenvolvimento (87), o ritmo circadiano a hábitos alimentares (88), insulina (89), leptina (90) e algumas patologias como a doença inflamatória intestinal (91).

Assim, este mecanismo viável, mesmo em caso de doença metabólica, deve ser investigado mais aprofundadamente no controlo da homeostasia da glicose via deteção de péptidos intestinais (67).

## 2.2. *High-protein/low-carb Diet*

Nos últimos anos, o interesse nas *high-protein/low-carb diet* (HP/LC) tem vindo a aumentar, uma vez que as diferentes quantidades de hidratos de carbono e proteínas na dieta têm efeitos diversos sobre a homeostasia da glucose (81).

Estudos indicam que a glucose absorvida após a ingestão de alimentos ricos em proteínas, lípidos e frutose ou galactose tem um efeito diminuído sobre os níveis de glucose no sangue. Assim, uma dieta com um teor diminuído de hidratos de carbono resulta numa concentração reduzida de glicémia em jejum (81).

De modo a compreender como uma dieta pobre em hidratos de carbono poderia desencadear uma glicémia pós-prandial e em jejum mais baixas, em doentes com DM2, estudos recentes utilizaram uma dieta *low-carb* não cetogénica e altamente proteica, sendo o teor de hidratos de carbono perto dos 20% (81).

Neste estudo, a dieta pobre em hidratos de carbono reduziu não só a glucose pós-prandial, mas também a glucose em jejum. Além disso, também se verificou uma redução da HbA1c após 5 semanas deste tipo de dieta (81).

Assim, é possível inferir que esta dieta tem a capacidade de normalizar os níveis de glucose em doentes com DM2. No entanto, este estudo apenas contemplou participantes do sexo masculino, pelo que são necessárias pesquisas mais alargadas (81).

Esta diminuição dos níveis de glicémia pós-prandial pode ser explicada pela menor ingestão de hidratos de carbono, e conseqüentemente, menor percentagem de glucose a ser absorvida após uma refeição (81).

Contudo, o mecanismo que leva a esta redução na concentração de glucose é ainda incerto, podendo ser relacionada com a diminuição das reservas de glicogénio, reduzindo a glucogenólise (81).

Porém, atualmente sabe-se que a gluconeogénese permanece constante mesmo que as quantidades de hidratos de carbono não se mantenham iguais (92).

Neste estudo, a dieta hiperproteica deu origem a uma redução da concentração de insulina, coerente com a redução de glucose derivada da dieta alimentar e os níveis de glucagon aumentaram (81).

Estudos anteriores relataram que a proteína e a glucose são igualmente potentes no que diz respeito à estimulação da secreção de insulina (92), tendo sido observado um efeito sinérgico aquando da administração concomitante de proteína e glucose (68).

Neste estudo verificou-se um aumento das concentrações de insulina em doentes com DM2, após a estimulação com diferentes fontes proteicas (68).

O aumento da secreção de insulina resultou numa diminuição das concentrações de glucose, o que sugere que um incremento do teor proteico da dieta promove uma diminuição da glucose. Assim, este tipo de dieta pode ser fundamental no auxílio do controle da glucose por parte de indivíduos com DM2 (68).

Tal como no estudo anterior, foi utilizado um período de tempo de 5 semanas, uma vez que este intervalo de tempo corresponde ao tempo necessário para que a Hb1Ac se reduza em 50% (68).

A dieta hiperproteica resultou na diminuição da glicémia após as refeições, sendo mais evidente após o jantar, uma vez que tanto a secreção de insulina como de glucagon se encontram aumentadas. Este fenómeno designa-se como *Staub-Traugott* e representa um aumento da sensibilidade à insulina após uma segunda refeição (68).

A concentração de glucose pré-prandial apresentou-se menor relativamente aos valores de glucose após jejum noturno, sendo esta situação comum em indivíduos com DM2 (93).

Tal como em estudos anteriores, o glucagon apresentou um aumento significativo (81). Embora fosse espectável que esse aumento se traduzisse num aumento da glicémia através da estimulação tanto da glucogenólise como da gluconeogénese, o mesmo não se verificou com esta dieta, o que coloca em questão o papel do glucagon ao nível da produção e regulação da glucose no fígado (92).

Relativamente às concentrações séricas de Lipoproteínas de Baixa densidade (LDL), Lipoproteínas de Alta densidade (HDL) e colesterol total (CT), estas permaneceram inalteradas mesmo numa dieta hiperproteica (94). Contudo, após as 5 semanas desta dieta, as concentrações de triacilglicerol em jejum reduziram, possivelmente pela diminuição de hidratos de carbono da dieta (68).

Por fim, tal como permitem inferir vários estudos, uma dieta rica em proteínas e baixa em hidratos de carbono permite um melhor controlo da homeostasia da glucose em doentes com DM2 (81).

## VIII – Conclusões

A DM é uma condição patológica caracterizada por níveis elevados de glucose na corrente sanguínea, devido a uma desregulação quer da produção de insulina, da sua ação e da produção endógena de glucose.

Segundo a OMS, em 2030 a DM será a sétima causa de morte no mundo, devido à sua incidência crescente. Esta patologia é classicamente classificada em vários tipos atendendo ao mecanismo fisiopatológico subjacente.

A DM2, o tipo mais prevalente, é mais comumente observada em adultos, estando intimamente relacionada com a obesidade, inatividade física e dieta alimentar inadequada.

Relativamente ao tratamento da DM2, a primeira abordagem passa por alterações no estilo de vida. No entanto, quando estas não são suficientes é necessário adicionar uma terapêutica farmacológica, sendo a Metformina o tratamento de primeira linha.

Estudos evidenciaram o papel Metformina quer ao nível da redução da gluconeogénese hepática, quer da sensibilização dos tecidos periféricos.

Um outro órgão alvo da Metformina é o intestino, tendo sido demonstrado em estudos que este fármaco é eficientemente absorvido ao nível da AP dos enterócitos através de vários transportadores bidirecionais. A Metformina aumenta o metabolismo anaeróbio ao nível dos enterócitos, promovendo uma diminuição da absorção de glucose.

A Metformina inibe o Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, provocando um défice de produção de energia. Esta redução de ATP promove um aumento dos níveis de AMP, inibindo a gluconeogénese. Por outro lado, o aumento de AMP ativa a AMPK, promovendo também a inibição da gluconeogénese e da síntese lipídica.

Por outro lado, descobertas recentes fornecem evidência científica de que alguns péptidos intestinais podem modular os níveis de GP.

Estudos reforçam o papel do PepT1 nesta modulação, uma vez que a ativação deste através da deteção de proteínas ao nível intestinal promove a libertação de GLP-1, permitindo a regulação dos níveis de glucose. Caso ocorra uma redução na expressão do PepT1, a despolarização da membrana é suprimida, inibindo a secreção de GLP-1 e de insulina.

Assim, é possível inferir uma relação entre uma dieta hiperproteica e a redução dos níveis de glucose no sangue, e conseqüente controlo glicémico em doentes com DM2.

Nos últimos anos tem-se vindo a verificar um interesse crescente sobre o conceito de dieta HP/LC, ou seja, com elevado teor de proteico e baixo teor em hidratos de carbono, pois as proteínas têm diversos efeitos sobre a homeostasia da glucose. Estudos recentes reforçam esta ideia, visto que a glucose absorvida após uma refeição rica em proteínas é reduzida.

Em suma, existem ainda muitos mecanismos passíveis de ser mais aprofundadamente investigados, de modo a serem formuladas novas estratégias terapêuticas da DM2, não só farmacológicas como não farmacológicas.

## IX – Referências Bibliográficas

1. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. HARRISON'S Principles of Internal Medicine. In McGraw-Hill Education; 2018. p. 2850–75.
2. Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Salpea P. IDF Diabetes Atlas. 2019.
3. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLOS Med. 2006;
4. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. Diabetes Care. 2020;43(January):S14–31.
5. Gardete Correia L, Boavida JM, Fragoso de Almeida J, Anselmo J, Ayala M, Massano Cardoso S, et al. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes 2016. Soc Port Diabetol. 2016;1(1):32.
6. Drozdowski L, Thomson ABR. Intestinal sugar transport. World J Gastroenterol. 2006;12(11):1657–70.
7. Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. J Clin Invest. 2003;111(7):931–43.
8. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. J Intern Med. 2007;261(1):32–43.
9. Wright EM, Martín MG, Turk E. Intestinal absorption in health and disease - Sugars. Bailliere's Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003;17(6):943–56.
10. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Br J Nutr. 2003;89(1):3–9.
11. Araújo JR, Martel F. Regulação da absorção intestinal de glicose. Arq Med. 2009;23(2):35–43.
12. Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, et al. Na +-D-

- glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes*. 2012;61(1):187–96.
13. Thomson ABR, Wild G. Adaptation of Intestinal Nutrient Transport in Health and Disease. *Dig Dis Sci*. 1997;42:453–88.
  14. Chen L, Tuo B, Dong H. Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. *Nutrients*. 2016;8(1):1–11.
  15. Santer R, Hillebrand G, Steinmann B, Schaub J. Intestinal glucose transport: Evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. *Gastroenterology*. 2003;124(1):34–9.
  16. Röder P V., Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One*. 2014;9(2):20–2.
  17. Turk E, Martín MG, Wright EM. Structure of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter gene SGLT1. *J Biol Chem*. 1994;269(21):15204–9.
  18. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: The role of GLUT2. *Annu Rev Nutr*. 2008;28(May):35–54.
  19. Ait-Omar A, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Le Gall M, Cotillard A, Gilet J, et al. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: A study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes*. 2011;60(10):2598–607.
  20. Harada N, Inagaki N. Role of sodium-glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney. *J Diabetes Investig*. 2012;3(4):352–3.
  21. Miyamoto K, Hase K, Tagagi T, Fuji T, Taketani Y, Minami H, et al. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. *Biochem J*. 1993;295(1):211–5.
  22. Nakkrasae LI, Thongon N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Transepithelial calcium transport in prolactin-exposed intestine-like Caco-2 monolayer after combinatorial knockdown of TRPV5, TRPV6 and Ca v1.3. *J Physiol Sci*.

- 2010;60(1):9–17.
23. Morgan EL, Mace OJ, Affleck J, Kellett GL. Apical GLUT2 and Cav1.3: Regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *J Physiol*. 2007;580(2):593–604.
  24. Morgan EL, Mace OJ, Helliwell PA, Kellett GL. A role for Cav1.3 in rat intestinal calcium absorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;(312(2)):487–93.
  25. Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: A major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*. 2005;54(10):3056–62.
  26. Ghezzi C, Calmettes G, Morand P, Ribalet B, John S. Real-time imaging of sodium glucose transporter (SGLT1) trafficking and activity in single cells. *Physiol Rep*. 2017;5(3):1–17.
  27. Drozdowski LA, Iordache C, Clandinin MT, Todd Z, Gonnet M, Wild G, et al. Maternal dexamethasone and GLP-2 have early effects on intestinal sugar transport in their suckling rat offspring. *J Nutr Biochem*. 2009;20(10):771–82.
  28. Kellett GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol*. 2001;531(3):585–95.
  29. Boavida JM, Duarte A, Ferreira Vicente Li, Almeida Ruas M, Carneiro de Melo P. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. Norma da Direcção-Geral da Saúde. 2013;1–15.
  30. Direcção-Geral da Saúde. Abordagem Terapêutica Farmacológica na Diabetes Mellitus Tipo 2 no Adulto. Norma da Direcção-Geral da S nº 052/2011. 2015;1–28.
  31. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2015;58(3):429–42.
  32. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes: Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment. *Diabetes Care*. 2017;40(Supplement 1):S64–74.

33. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 2016;59(3):426–35.
34. Howlett HC., Bailey CJ. Galegine and antidiabetic plants. In: *Metformin - the gold standart*. 2007. p. 3–9.
35. Bailey CJ, Day C. Metformin: Its botanical background. *Pract Diabetes Int*. 2004;21(3):115–7.
36. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577–85.
37. Wróbel MP, Marek B, Kajdaniuk D, Rokicka D, Szymborska-Kajane A, Strojek K. Metformin — a new old drug. *Endokrynol Pol*. 2017;68(4):482–96.
38. Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;12:1–12.
39. Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JHB. Metformin and the intestine. *Diabetologia*. 2008;51(8):1552–3.
40. Buse JB, DeFronzo RA, Rosenstock J, Kim T, Burns C, Skare S, et al. The primary glucose-lowering effect of metformin resides in the gut, not the circulation: Results from short-term pharmacokinetic and 12-week dose-ranging studies. *Diabetes Care*. 2016;39(2):198–205.
41. Proctor W, Bourdet D, Thakker D. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metab Dispos*. 2008;36:1650–1658.
42. Müller J, Lips KS, Metzner L, Neubert RHH, Koepsell H, Brandsch M. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol*. 2005;70(12):1851–60.
43. Han T, Proctor WR, Costales CL, Cai H, Everett RS, Thakker DR. Four cation-selective transporters contribute to apical uptake and accumulation of metformin in Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;352(3):519–28.

44. Lee N, Duan H, Hebert MF, Liang CJ, Rice KM, Wang J. Taste of a pill: Organic cation transporter-3 (OCT3) mediates metformin accumulation and secretion in salivary glands. *J Biol Chem.* 2014;289(39):27055–64.
45. Zhou M, Xia L, Wang J. Metformin Transport by a Newly Cloned Proton-Stimulated Organic Cation Transporter (Plasma Membrane Monoamine Transporter) Expressed in Human Intestine. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:1956–62.
46. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1422–31.
47. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetologia.* 2006;49(3):434–41.
48. Klip A, Leiter LA. Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care.* 1990;13(6):696–704.
49. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348(3):607–14.
50. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2000;275(1):223–8.
51. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 2013;494:256–260.
52. Baur JA, Birnbaum MJ. Control of gluconeogenesis by metformin: Does redox trump energy charge? *Cell Metab.* 2014;(20):197–9.
53. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang X, Macdonald J, Jurczak M, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature.* 2014;510(7506):542–6.

54. Hur KY, Lee MS. New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig*. 2015;(6):600–9.
55. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: Old or new insights? *Diabetologia*. 2013;56(9):1898–906.
56. Zhang CS, Li M, Ma T, Zong Y, Cui J, Feng JW, et al. Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metab*. 2016;24(4):521–2.
57. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med*. 2013;19(12):1649–54.
58. Bailey CJ, Mynett KJ, Page T. Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br J Pharmacol*. 1994;112:671–5.
59. Sakar Y, Meddah B, Faouzi MYA, Cherrah Y, Bado A, Ducroc R. Metformin-induced regulation of the intestinal d-glucose transporters. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(3):301–7.
60. Massollo M, Marini C, Brignone M, Emionite L, Salani B, Riondato M, et al. Metformin temporal and localized effects on gut glucose metabolism assessed using <sup>18</sup>F-FDG PET in mice. *J Nucl Med*. 2013;54(2):259–66.
61. Migoya EM, Bergeron R, Miller JL, Snyder RNK, Tanen M, Hilliard D, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors administered in combination with metformin result in an additive increase in the plasma concentration of active GLP-1. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;(88):801–8.
62. Kim MH, Jee JH, Park S, Lee MS, Kim KW, Lee MK. Metformin enhances glucagon-like peptide 1 via cooperation between insulin and Wnt signaling. *J Endocrinol*. 2014;220(2):117–28.
63. Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T. Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: Evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*. 2008;149(5):2341–51.

64. Beysen C, Murphy EJ, Deines K, Chan M, Tsang E, Glass A, et al. Effect of bile acid sequestrants on glucose metabolism, hepatic de novo lipogenesis, and cholesterol and bile acid kinetics in type 2 diabetes: A randomised controlled study. *Diabetologia*. 2012;55(2):432–42.
65. Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, Zadeh-Tahmasebi M, Rutter GA, Filippi BM, et al. Metformin activates a duodenal Ampk and a neuronal network to lower glucose production. *Nat Med*. 2015;21(5):506–11.
66. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):9066–71.
67. Dranse HJ, Waise TMZ, Hamr SC, Bauer P V., Abraham MA, Rasmussen BA, et al. Physiological and therapeutic regulation of glucose homeostasis by upper small intestinal PepT1-mediated protein sensing. *Nat Commun*. 2018;9(1).
68. Gannon MC, Nuttall FQ, Saeed A, Jordan K, Hoover H. An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(4):734–41.
69. Mojica L, Luna-Vital DA, Gonzalez de Mejia E. Black bean peptides inhibit glucose uptake in Caco-2 adenocarcinoma cells by blocking the expression and translocation pathway of glucose transporters. *Toxicol Reports*. 2018;5(April):552–60.
70. Matthews DM, Adibi SA. Peptide absorption. *Gastroenterology*. 1976;71(1):151–61.
71. Adibi SA. The Oligopeptide Transporter (Pept-1) in Human Intestine: Biology and Function. *Gastroenterology*. 2004;126(1):332–40.
72. Adibi SA. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(5 48-5):779–88.
73. Shiraga T, Miyamoto KI, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H<sup>+</sup>/peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*. 1999;116(2):354–62.

74. Ganapathy V, Brandsch M, Leibach FH. Intestinal transport of amino acids and peptides. In: *The physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd ed. Raven press; 1994. p. 1773–93.
75. Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, et al. Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry*. 1995. p. 6456–63.
76. Majumdar S, Mitra AK. Chemical modification and formulation approaches to elevated drug transport across cell membranes. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006;3(4):511–27.
77. Faria TN, Timoszyk JK, Stouch TR, Vig BS, Landowski CP, Amidon GL, et al. A Novel High-Throughput PepT1 Transporter Assay Differentiates between Substrates and Antagonists. *Mol Pharm*. 2004;(1(1)):67–76.
78. Karamanlis A, Chaikomin R, Doran S, Bellon M, Bartholomeusz FD, Wishart JM, et al. Effects of protein on glycemic and incretin responses and gastric emptying after oral glucose in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(5):1364–8.
79. Duraffourd C, De Vadder F, Goncalves D, Delaere F, Penhoat A, Brusset B, et al. Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell*. 2012;150(2):377–88.
80. Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M. Effect of a Low-Carbohydrate Diet on Appetite, Blood Glucose Levels, and Insulin Resistance in Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Ann Intern Med*. 2005;(142):403–11.
81. Gannon MC, Nuttall FQ. Effect of a High-Protein, Low-Carbohydrate Diet on Blood Glucose Control in People With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2004;53:2375–82.
82. Groneberg DA, Döring F, Eynott PR, Fischer A, Daniel H. Intestinal peptide transport: Ex vivo uptake studies and localization of peptide carrier PEPT1. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(3 44-3):697–704.
83. Diakogiannaki E, Pais R, Tolhurst G, Parker HE, Horscroft J, Rauscher B, et al. Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-

- coupled uptake and the calcium-sensing receptor. *Diabetologia*. 2013;56(12):2688–96.
84. Darcel NP, Liou AP, Tomé D, Raybould HE. Activation of vagal afferents in the rat duodenum by protein digests requires PepT1. *J Nutr*. 2005;135(6):1491–5.
85. Van Der Klaauw AA, Keogh JM, Henning E, Trowse VM, Dhillon WS, Ghatti MA, et al. High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release. *Obesity*. 2013;21(8):1602–7.
86. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, et al. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab*. 2006;4(3):223–33.
87. Shen H, Smith DE, Brosius FC. Developmental expression of PEPT1 and PEPT2 in rat small intestine, colon, and kidney. *Pediatr Res*. 2001;49(6):789–95.
88. Pan X, Terada T, Okuda M, Inui KI. The diurnal rhythm of the intestinal transporters SGLT1 and PEPT1 is regulated by the feeding conditions in rats. *J Nutr*. 2004;134(9):2211–5.
89. Thamotharan M, Bawani SZ, Zhou X, Adibi SA. Hormonal regulation of oligopeptide transporter Pept-1 in a human intestinal cell line. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1999;276(4 45-4):821–6.
90. Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Péranski G, et al. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest*. 2001;108(10):1483–94.
91. Ziegler TR, Fernández-Estívariz C, Gu LH, Bazargan N, Umeakunne K, Wallace TM, et al. Distribution of the H<sup>+</sup>/peptide transporter PepT1 in human intestine: Up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(5):922–30.
92. Gannon MC, Nuttall JA, Damberg G, Gupta V, Nuttall FQ. Effect of protein ingestion on the glucose appearance rate in people with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(3):1040–7.

93. Gannon MC, Nuttall FQ, Westphal SA, Fang S, Ercan-Fang N. Acute metabolic response to high-carbohydrate, high-starch meals compared with moderate-carbohydrate, low-starch meals in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1998;(21(10)):1619–26.
94. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglycerolemia: Historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(2):412–33.