



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

ALINE FRANCO DA ROCHA

**EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE A  
PRODUÇÃO DE BETAHIDROXIBUTIRATO EM PACIENTES COM  
PRÉ-DIABETES OU DIABETES MELLITUS TIPO 2 TRATADOS  
COM EMPAGLIFLOZINA**

ALINE FRANCO DA ROCHA

**EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE A  
PRODUÇÃO DE BETAHIDROXIBUTIRATO EM  
PACIENTES COM PRÉ-DIABETES OU DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 TRATADOS COM EMPAGLIFLOZINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientador: Professor Drº. Alexandre José Faria Carrilho.

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Franco da Rocha, Aline.

EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE BETAHIDROXIBUTIRATO EM PACIENTES COM PRÉ-DIABETES OU DIABETES MELLITUS TIPO 2 TRATADOS COM EMPAGLIFLOZINA / Aline Franco da Rocha. - Londrina, 2018.  
66 f. : il.

Orientador: Alexandre José Faria Carrilho.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes Mellitus tipo 2 - Tese. 2. Empaglifozina - Tese. 3. GH - Tese. I. José Faria Carrilho, Alexandre. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. . III. Título.

ALINE FRANCO DA ROCHA

**EFEITO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE  
BETAHIDROXIBUTIRATO EM PACIENTES COM PRÉ-DIABETES OU  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 TRATADOS COM EMPAGLIFLOZINA.**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Drº. Alexandre José Faria Carrilho  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Drº. Vinicius Daher Alvares Delfino  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Drº. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Drª. Maria Lúcia Correa-Gianella  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa Drª. Gisele Lopes Bertolini  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de novembro de 2018.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!  
Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o  
seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

Com esta citação agradeço a Deus por ser meu  
sustento em tudo, especialmente nos estudos.

## AGRADECIMENTOS

Minha sincera gratidão,

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Alexandre José Faria Carrilho, que foi fundamental tanto na pesquisa como na construção de mais uma fase da minha vida acadêmica e profissional. Sua paciência e empenho guardarei como exemplo a seguir.

À minha família por ser o alicerce da minha educação, caráter e acompanhar diariamente todas as fases de desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os pacientes que doaram seu tempo e se disponibilizaram a participar deste trabalho.

Aos companheiros de pesquisa, Paulo Sergio Pereira Júnior e Gabriela Calefi, que se empenharam junto comigo nas extensas manhãs de experimento.

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Cotta de Faria, Érica Ivana Gomes e demais colaboradores do Laboratório de Lípidos - Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental – NMCE da UNICAMP pela colaboração e empenho nas dosagens laboratoriais.

Aos professores Dr<sup>o</sup>. Vinicius Daher Alvares Delfino, Dr<sup>o</sup>. Waldiceu Aparecido Verri Junior, Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Correa-Gianella e Dr<sup>a</sup>. Gisele Lopes Bertolini, membros da banca examinadora por se disponibilizarem a colaborar com este trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, que me deram a oportunidade e condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, pelo conhecimento compartilhado.

À Sandra Lage e a todos os funcionários da secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, pelo auxílio durante este período de trabalho.

ROCHA, Aline Franco. **Efeito do hormônio de crescimento sobre a produção de betahidroxibutirato em pacientes com pré-diabetes ou *diabetes mellitus* tipo 2 tratados com empagliflozina.** 2018. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** Fármacos inibidores do receptor SGLT2 reduzem a glicemia ao provocarem glicosúria, porém aumentam as concentrações plasmáticas de glucagon e betahidroxibutirato. O glucagon atua no fígado e não tem efeito relevante sobre a lipólise periférica e a liberação de ácidos graxos livres como substrato para cetogênese, ação essa atribuída ao GH. **Objetivo:** avaliar a participação do GH no aumento da produção de betahidroxibutirato em pacientes com pré-diabetes ou DM2 tratados com empagliflozina 25mg ao dia. **Materiais e métodos:** Ensaio clínico com seguimento por 28 dias, do qual participaram 17 Indivíduos com mais de 18 anos, homens e mulheres, com pré-diabetes ou DM2, índice de massa corporal entre 25 e 40 kg/m<sup>2</sup>, HbA1c > 5,7 e < 11%. Foram excluídos os pacientes que: utilizavam antidiabéticos orais exceto metformina, com presença de microalbuminúria ou doença renal crônica, gestação, cirurgia bariátrica prévia, doença hepática ou cardíaca com repercussão no controle glicêmico, disfunção tireoidiana descontrolada. **Intervenção:** o estudo foi dividido em 3 testes. Obtiveram-se amostras de sangue nos tempos: -60, 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 minutos, primeira amostra em jejum e as seguintes após refeição padronizada nos 3 testes: 1. baseline, 2. tratamento com empagliflozina (10mg/ 21 dias) e 3. tratamento com empagliflozina (10mg/ 28 dias) + bloqueio do GH pelo pegvisomanto 30mg. Foram mensurados os valores de insulina, glicose, triglicerídeos, glucagon, GH, colesterol total e frações, AGL, betahidroxibutirato e IGF-1. **Resultados:** o uso da empagliflozina por 21 dias reduziu os valores plasmáticos de glicose, insulina, triglicerídeos e aumentou os valores plasmáticos de glucagon e betahidroxibutirato. A administração de pegvisomanto restaurou as concentrações de betahidroxibutirato a valores plasmáticos semelhantes aos do baseline. **Conclusão:** nossos dados sugerem que o GH desempenha um papel permissivo no aumento das concentrações plasmáticas de β-hidroxibutirato em pacientes tratados empagliflozina.

**Palavras-chave:** *Diabetes mellitus* tipo 2. Empagliflozina. GH. Betahidroxibutirato

ROCHA, Aline Franco. **The role of growth hormone on the  $\beta$ -hydroxybutyrate levels in prediabetic or type 2 diabetic patients treated with empagliflozin.** 2018. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

#### ABSTRACT

**Context:** SGLT2 receptor inhibitor drugs reduce glycemia by causing glycosuria, but increase plasma concentrations of glucagon and  $\beta$ -hydroxybutyrate. Glucagon acts on the liver and has no relevant effect on peripheral lipolysis and the release of free fatty acids as a substrate for ketogenesis, an action attributed to GH. **Objective:** to evaluate the participation of GH in increasing the production of  $\beta$ -hydroxybutyrate in pre-diabetic or DM2 patients treated with empagliflozin 25mg daily. **Design:** Clinical trial with follow-up for 28 days. **Participants:** 17 individuals over 18 years of age, men and women, with pre-diabetes or DM2, body mass index between 25 and 40 kg/m<sup>2</sup>, HbA1c > 5.7 and <11%, exclude use of oral antidiabetics, except metformin, presence of microalbuminuria or chronic renal disease, gestation, previous bariatric surgery, liver or heart disease that has repercussion on glycemic control, thyroid dysfunction uncontrolled. **Intervention:** The study was divided into 3 trials. Blood samples were obtained at the times: -60, 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 minutes, the first fasting sample and the following after standard meal in the 3 tests: 1. baseline, 2. treatment with empagliflozine (10mg / 21 days) and 3. treatment with empagliflozin (10mg / 28 days) + blockade with HGH by pegvisomanto 30mg. **Main Outcome Measures:** The values of insulin, glucose, triglycerides, glucagon, HGH, total cholesterol and fractions, AGL,  $\beta$ -hydroxybutyrate and IGF-1 were measured. **Result:** The use of empagliflozin for 21 days reduced the plasma values of glucose, insulin, triglycerides and increased the plasma values of glucagon and  $\beta$ -hydroxybutyrate. Pegvisomant administration restored  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations to plasma baseline values. **Conclusion:** our data suggest that GH plays a permissive role in increasing plasma concentrations of  $\beta$ -hydroxybutyrate in patients treated with empagliflozin.

**Keywords:** Type 2 *diabetes mellitus*. Empagliflozin. GH.  $\beta$ -hydroxybutyrate.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

DM	<i>diabetes mellitus</i>
DM <sub>2</sub>	<i>diabetes mellitus</i> tipo 2
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGL	cido graxo livre
GH	hormônio do crescimento
HbA1c	hemoglobina glicada
ACCE	American College of Clinical Endocrinology
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM <sub>1</sub>	<i>diabetes mellitus</i> tipo 1
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
LDL	lipoproteína de baixa densidade
HDL	lipoproteína de alta densidade
ATP	adenosina trifosfato
K <sup>+</sup>	potássio
Ca <sup>+2</sup>	cálcio
GLUT4	proteína transportadora de glicose 4
IR	receptor de insulina
IRS	substrato do receptor de insulina
PI3K	fosfatidilinositol 3 quinase
Akt/PKB	proteína quinase B
PDK-1	proteína quinase 1 dependente de fosfoinositídeo
PKC	proteína quinase C
LPL	lipoproteína lipase
HSL	lipase hormônio sensível
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
I/G	razão insulina/glucagon
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
G6Pase	glicose 6-fosfatase
PKA	proteína quinase A
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
GHR	receptor do GH

GHRH	hormônio de liberação do GH
STAT5	transdutores de sinal e ativadores das proteínas de transcrição 5
PPAR $\gamma$	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
mTor	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
IKKB	inibidor do fator nuclear kappa B
NF $\kappa\beta$	fator nuclear kappa B
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
IL-6	interleucina 6
GSK3	glicogênio sintase 3
GLUT-1	proteína transportadora de glicose 1
SGLT	cotransportadores de sódio-glicose
SGLT1	cotransportadores de sódio-glicose 1
SGLT2	cotransportadores de sódio-glicose 2
Na <sup>+2</sup>	sódio
FDA	Food and Drug Administration
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
CANVAS	Estudo de Avaliação Vascular da Canaglifozina
Kg/m <sup>2</sup>	quilogramas/metro ao quadrado
ANOVA	análise de variância

## LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Representação esquemática da célula $\beta$ -pancreática e o mecanismo de secreção de insulina	16
Fig.2. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina.	17
Fig.3. Representação esquemática da interação do GH-GHR e seus efeitos biológicos	27
Fig.4. Representação esquemática da interação do GH- GH-A- GHR e efeitos biológicos	27
Fig. 5. Mecanismo anti-diabetogênico dos inibidores do SGLT2	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	DIABETES MELLITUS.....	13
1.2	INSULINA.....	15
1.2.1	PAPEL REGULADOR METABÓLICO DA INSULINA.....	16
1.3	Condições Comuns Associadas à Resistência Insulínica no DM2.....	18
1.4	GLUCAGON.....	20
1.5	RAZÃO INSULINA/GLUCAGON.....	21
1.6	HORMÔNIO DO CRESCIMENTO.....	22
1.6.1	Ação do Hormônio do Crescimento no Metabolismo .....	20
1.6.2	GH e Resistência Insulínica.....	23
1.7	PEGVISOMANTO.....	26
1.8	INIBIDORES DO SGLT2.....	28
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	35
4.1	PACIENTES.....	35
4.1.1	Ética.....	35
4.1.2	População e Amostragem.....	35
4.1.3	Critérios de Inclusão .....	35
4.1.4	Critérios de Não-inclusão.....	35
4.2	PROTOCOLO DO ESTUDO .....	36
4.2.1	Recrutamento .....	36
4.2.2	Avaliação Clínica.....	36
4.2.3	Protocolo .....	36
4.2.4	Exames Laboratoriais.....	37
4.2.5	Análise Estatística.....	38

<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>57</b>
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	<b>58</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>59</b>
	ANEXO A – Autorização Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná.....	<b>61</b>
	ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos..	<b>62</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

*Diabetes mellitus* (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação, na secreção de insulina ou em ambas(1). A hiperglicemia persistente está associada a complicações crônicas micro e macrovasculares, aumento de morbidade, redução da qualidade de vida e elevação da taxa de mortalidade(2). Atinge proporções epidêmicas, com estimativa de 415 milhões de portadores de DM no mundo atualmente e com prevalência ainda em ascensão(3).

A classificação do DM tem sido baseada em sua etiologia, assim o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM. Possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genético e ambiental. Geralmente, o DM2 acomete indivíduos a partir da quarta década de vida, embora se descreva, em alguns países, aumento na sua incidência em crianças e jovens. Trata-se de doença poligênica, com forte herança familiar ainda não completamente esclarecida, cuja ocorrência tem contribuição significativa de fatores ambientais. Dentre eles, hábitos dietéticos, inatividade física e obesidade destacam-se como os principais fatores de risco(4).

No processo de instalação do DM, as alterações fisiopatológicas estão presentes antes que as concentrações glicêmicas atinjam concentrações sanguíneas supranormais. A condição na qual os valores glicêmicos estão acima dos valores de referência, mas ainda abaixo dos valores diagnósticos para o DM, denomina-se pré-diabetes(1). A resistência à ação da insulina já está presente e, na ausência de medidas de combate aos fatores de risco modificáveis, ela evolui para a doença clinicamente manifesta. A Associação Americana de Diabetes (ADA) previamente havia atribuído os termos “glicemia de jejum alterada” e “tolerância à glicose diminuída” a essas condições de risco aumentado de doença cardiovascular e complicações em longo prazo. A maioria dos casos de pré-diabetes são assintomáticos e o diagnóstico deve ser feito com base em exames laboratoriais(1). O desenvolvimento e a perpetuação da hiperglicemia característica do DM2 ocorrem concomitantemente com outras alterações hormonais, como o aumento do glucagon, resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina, aumento da produção hepática de glicose, disfunção incretínica, aumento de lipólise e consequente aumento de ácidos graxos livres circulantes (AGL), aumento da reabsorção

renal de glicose e graus variados de deficiência na síntese e na secreção de insulina pela célula  $\beta$ -pancreática(4).

A concentração plasmática de glicose precisa ser fisiologicamente mantida dentro de uma faixa estreita de valores, apesar das variações existentes devido às exigências e fornecimento de nutrientes. Assim, a glicose presente no plasma é proveniente de várias fontes como: absorção intestinal da dieta, degradação do glicogênio no fígado ou ainda pela sua formação hepática a partir de outros compostos de carbono, tais como lactato, piruvato, aminoácidos e glicerol. Em condições normais, as concentrações de glicose no estado pós-prandial e jejum são determinadas pelas ações da insulina e do glucagon. Acrescenta-se ainda as ações de outros hormônios como cortisol, hormônio do crescimento (GH) e catecolaminas que interferem nas concentrações de glicose e outros suprimentos energéticos do organismo em situações de estresse. Portanto, alterações nas ações destes hormônios regulatórios podem resultar em desbalanço da homeostase da glicose(5).

Em todo este processo, a insulina tem um papel regulador central e quando há destruição das células  $\beta$ -pancreáticas ou resistência à sua ação nos tecidos, todas as vias metabólicas são afetadas, provocando as complicações agudas e crônicas nos portadores de DM(4). Apesar da evidência irrefutável do importante papel da hiperglicemia no desenvolvimento de complicações no DM e do grande número de agentes antidiabéticos disponíveis para o manejo dessa doença, a maioria dos indivíduos com DM2 ainda apresenta controle glicêmico inadequado. Mais da metade de todos os pacientes com DM2 nos Estados Unidos não conseguiram atender ao objetivo de controle glicêmico proposto pela ADA, que equivale a um valor de hemoglobina glicada (HbA1c) inferior a 7%, e um número ainda menor de indivíduos atingiu o objetivo do *American College of Clinical Endocrinologists* (ACCE) de HbA1c de 6,5% com as terapias existentes(1).

Desde o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), a HbA1c é considerada o exame padrão-ouro para avaliar o controle glicêmico do indivíduo com DM tipo 1 (DM1) pois é o melhor parâmetro preditor de complicações crônicas. Já o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) avaliou indivíduos com DM2. A determinação da HbA1c possibilita estimar quão elevadas as glicemias estiveram nos últimos 3 meses. Tal estimativa torna-se possível pelo fato de a glicose sanguínea ligar-se de maneira irreversível à hemoglobina durante o período de vida da hemácia, que tem essa duração. A porcentagem

da hemoglobina que sofreu glicação será tanto maior quanto maior a concentração de glicose sanguínea. Esse resultado expresso em porcentagem refere-se à média das glicemias diárias, sendo 50% correspondente ao mês que precedeu o exame e os outros 50% aos segundo e terceiro meses anteriores à coleta. Assim, o valor de HbA1c obtido corresponderá, sobretudo, ao controle glicêmico do último mês e, secundariamente, dos 2 e 3 meses precedentes (6).

Outro aspecto clínico a ser monitorizado no paciente DM é seu perfil lipídico, pois sabe-se que esse fator de risco, juntamente com hipertensão arterial, desempenha um papel importante na indução de doenças cardiovasculares. Em pacientes com DM1 em bom controle glicêmico, o perfil lipídico é muito semelhante à população geral. Em contraste, pacientes com DM2, mesmo com bom controle glicêmico, freqüentemente apresentam alterações no perfil lipídico, como elevação de triglicérides e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL). Em ambos, DM1 e DM2, o controle glicêmico insatisfatório aumenta as concentrações plasmáticas de triglicérides e diminui de colesterol HDL, com efeitos apenas modestos sobre os níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL)(7).

## 1.2 INSULINA

A insulina foi descoberta como um polipeptídeo em 1928 e sua sequência de aminoácidos foi identificada em 1952. É composta por duas cadeias (A e B) ligadas por pontes de dissulfeto contendo 51 aminoácidos, com peso molecular de 5802. Sua sequência gênica está codificada no braço curto do cromossomo 11(4). É um hormônio anabólico, secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas e tem como principais funções: regular as concentrações de glicose plasmática por facilitar sua captação celular, além estimular a lipogênese no tecido adiposo, a síntese proteica e a proliferação celular, contribuindo na regulação dos estoques energéticos do organismo(4).

A secreção pancreática da insulina ocorre com a entrada da glicose para dentro das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas. A enzima glicoquinase, então ativada, fosforila a glicose em glicose-6-fosfato com conseqüente produção de ATP e fechamento dos canais  $K^+$ -ATP dependentes. Ocorre então despolarização da membrana e ativação dos canais voltagem dependentes de  $Ca^{2+}$ , culminando com um aumento intracelular das concentrações de  $Ca^{2+}$  e secreção da insulina armazenada em vesículas(4).

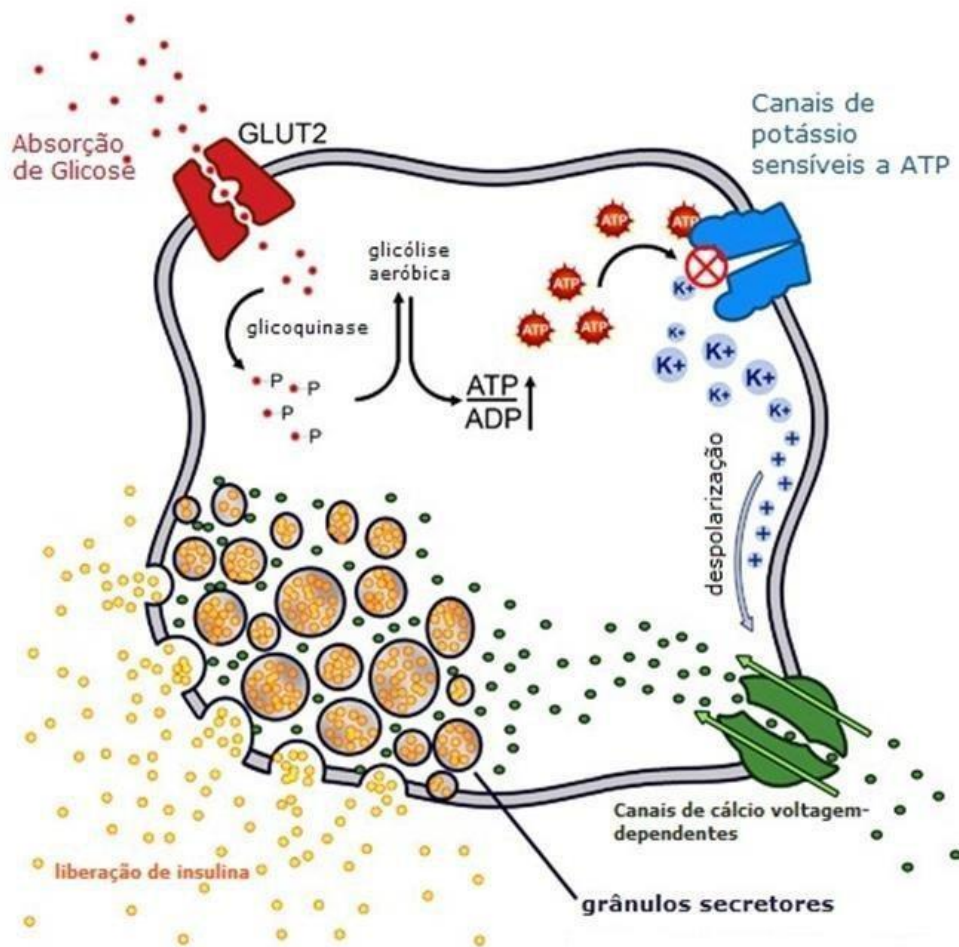


Fig 1. Representação esquemática da célula  $\beta$ -pancreática e o mecanismo de secreção de insulina.

### 1.2.1 Papel Regulador Metabólico da Insulina

A insulina é o principal hormônio regulador do suprimento de energia celular e do balanço de macronutrientes do organismo, direcionando os processos anabólicos do estado alimentado. Ela é um hormônio essencial para a captação de glicose pelos tecidos insulino-dependentes, sobretudo o músculo e o tecido adiposo<sup>8</sup>. O mecanismo pelo qual as células captam glicose é por difusão facilitada através de uma família de transportadores de hexose. Em muitos tecidos, sendo o músculo um excelente exemplo, o principal transportador usado para captação de glicose, o transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), é disponibilizado na membrana plasmática pela ação insulínica(8). Esta ação tem início com a ligação do hormônio ao seu receptor específico (IR) e o desencadeamento de uma cascata de eventos intracelulares de fosforilação. Uma alteração conformacional e autofosforilação do IR ocorre no momento da ligação levando ao recrutamento e fosforilação dos substratos de receptores de insulina (IRS), estas ativam principalmente a via fosfatidilinositol 3-quinase – proteína quinase B

(PI3K-Akt/PKB) levando à geração do segundo mensageiro PI3K. A PI3K ligada à membrana recruta e ativa a fosfoinositídeo 1-quinase (PDK-1), que fosforila e ativa a Akt e as proteínas quinases C (PKCs) atípicas. A Akt intermedia a maioria dos efeitos metabólicos da insulina, regulando a translocação do GLUT4, a lipogênese e a síntese de glicogênio(8).

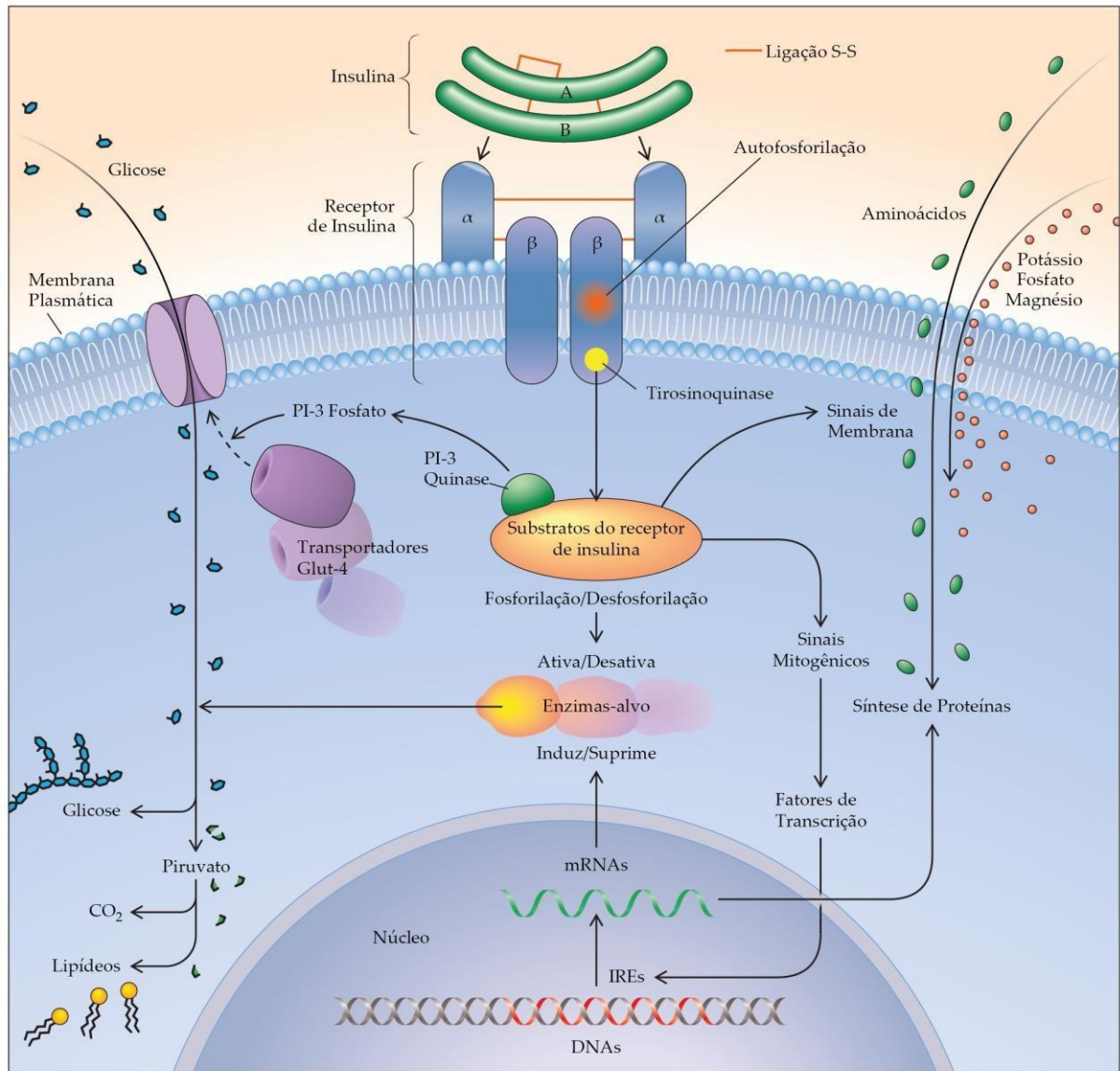


Fig 2. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina.

No tecido muscular, a insulina promove a entrada de glicose nas células que será utilizada na síntese de glicogênio pela ativação da enzima glicogênio sintase ou como fonte imediata de energia para a contração muscular. Além disso, a insulina suprime o catabolismo proteico muscular(9). Já no tecido adiposo, a insulina age estimulando a captação de glicose e a síntese de triglicerídeos via ativação da enzima lipoproteína lipase (LPL), também suprime a hidrólise de triglicerídeos e liberação de AGL e glicerol na circulação pela inibição da lipase hormônio sensível (HSL)(10). Porém, quando ocorre queda das concentrações plasmáticas de insulina durante o jejum ou quando existe resistência periférica a sua ação, as vias catabólicas são ativadas com mobilização de AGL e glicerol do tecido adiposo e de aminoácidos do tecido muscular(4).

As ações fisiológicas da insulina são moduladas pelas ações de outros hormônios, tais como: o hormônio do crescimento (GH), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), o glucagon, o cortisol e as catecolaminas. Esses hormônios conduzem processos metabólicos no estado de jejum promovendo a glicogenólise, a neoglicogênese e cetogênese hepática - glucagon; lipólise no tecido adiposo, neoglicogênese hepática e glicogenólise hepática e muscular – catecolaminas; o catabolismo proteico, a neoglicogênese hepática e a lipólise no tecido adiposo – cortisol; neoglicogênese hepática e lipólise – GH. Alterações na secreção e ou ação desses hormônios constitui um importante mecanismo de resistência às ações da insulina(11).

### 1.3. CONDIÇÕES COMUNS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA INSULÍNICA NO DM2

O conceito de resistência à insulina surgiu no final da década de 1930, quando pesquisadores administraram extrato de pâncreas purificado a indivíduos com hiperglicemia e observaram surpreendentes resultados quanto à variabilidade de resposta glicêmica entre eles. Grandes doses de insulina eram necessárias para o controle do DM leve não cetótico, especialmente em indivíduos mais idosos. De outro modo, pequenas doses de insulina eram adequadas para indivíduos jovens com formas mais intensas da doença e propensos à cetose(4). Dessa forma, define-se resistência à insulina quando uma concentração normal ou elevada de insulina produz uma resposta biológica atenuada, sobretudo a diminuição na captação de glicose pelos tecidos insulino-dependentes (4)<sup>12</sup>. Após o trabalho pioneiro ganhador do Prêmio Nobel de Yalow e Berson de desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio, as primeiras dosagens de insulina tornaram-se amplamente disponíveis no final da década de 1960. Subsequentemente, demonstrou-se que os pacientes com DM2

apresentavam concentrações normais ou aumentadas de insulina no plasma. Assim, uma incapacidade progressiva das células  $\beta$  em compensar a resistência insulínica resulta em hiperglicemia, anunciando o início da doença. A resistência à insulina normalmente precede o desenvolvimento do DM2 e é comumente encontrada em parentes de primeiro grau não afetados(4).

Evidências científicas demonstraram que a resistência à insulina, na maioria dos casos, manifesta-se na célula por meio de defeitos pós-receptor na sinalização da insulina. Ao ligar-se a subunidade alfa do IR, a insulina promove uma mudança conformacional na subunidade beta e inicia uma cascata de fosforilação de uma família de proteínas denominadas IRS. A partir daí ocorre ativação de uma complexa rede de proteínas intracelulares que irão determinar os efeitos intracelulares da insulina. As principais vias que ligam as proteínas do IRS às ações metabólicas da insulina passam pela ativação da PI3K e da Akt. O bloqueio dessas vias está intimamente relacionado à resistência insulínica e podem ocorrer em resposta às citocinas, aumento de AGL circulantes, hiperglicemia, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo(8).

Quando as células  $\beta$  pancreáticas não conseguem compensar a resistência à insulina, o pré-diabetes, e posteriormente o DM, se desenvolvem. À medida que a concentração plasmática de glicose aumenta, a função das células  $\beta$  se deteriora, diminuindo ainda mais a sensibilidade à glicose e piorando a hiperglicemia (4).

#### 1.4 GLUCAGON

Em humanos, o glucagon é secretado pelas células  $\alpha$  das ilhotas pancreáticas. Anatomicamente, elas estão justapostas às células  $\beta$ , que regulam negativamente sua secreção. A ativação dos nervos autonômicos que inervam a ilhota aumenta a secreção de glucagon para dentro da veia porta e, portanto, tem sua principal ação fisiológica no fígado para quebra do glicogênio(12).

O principal local de ação do glucagon é o fígado, por várias razões. Primeiro, o fígado é exposto a concentrações de glucagon que são duas a três vezes superiores às encontradas nos demais órgãos. O glucagon é secretado na veia porta e parcialmente extraído pelo fígado antes de ser diluído na circulação sistêmica, o que explica a baixa exposição dos demais órgãos a sua ação. Assim, as concentrações sistêmicas de glucagon estão geralmente abaixo daquelas necessárias para ativar os seus receptores no tecido adiposo para causar lipólise. Além disso, o glucagon não tem efeito apreciável na glicogenólise muscular. Por conseguinte, a resultante de sua ação fisiológica está restrita ao fígado, preponderantemente(13).

O glucagon liga-se ao seu receptor acoplado à proteína G e ativa a adenilato ciclase, levando a produção de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e de proteína quinase A (PKA). Como consequência, ocorre ativação das enzimas glicose-6-fosfatase (G6Pase), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicogênio fosforilase acarretando neoglicogênese, cetogênese e glicogenólise hepática(13). Estes efeitos mantêm a glicemia estável durante o jejum por meio da liberação hepática de glicose e estão fortemente exacerbados na cetoacidose diabética, na qual perde-se o efeito contrarregulador da insulina sobre o fígado(12).

## 1.5 RAZÃO INSULINA/GLUCAGON

No fígado, a razão insulina/glucagon (I/G) é o principal regulador do metabolismo dos carboidratos e lipídeos. O controle da glicemia depende de ações coordenadas entre a secreção de glucagon e insulina pelas células  $\alpha$  e  $\beta$ -pancreáticas, respectivamente. Ambas as células respondem de forma oposta às concentrações de glicose sanguínea, enquanto a hipoglicemia induz a secreção das células  $\alpha$ , a elevação da glicemia estimula a secreção das células  $\beta$ . A insulina age principalmente no músculo, fígado e tecido adiposo, com efeitos anabólicos, induzindo a incorporação da glicose nos tecidos por meio do acúmulo de glicogênio e gordura. De forma contrária, o glucagon induz efeitos catabólicos, principalmente por ativar a glicogenólise e neoglicogênese, resultando em aumento da glicemia. Uma função desregulada destes dois hormônios pode gerar descontrole glicêmico e está associado ao desenvolvimento do DM. O aumento do tônus de glucagon contribui para a manutenção da hiperglicemia em pacientes com DM(14):(13).

Um aumento na razão I/G favorece a estocagem de nutrientes ingeridos, inibe a produção hepática de glicose, a lipólise e proteólise. Por outro lado, um declínio na razão I/G acarreta efeito oposto, isto é: mobilização de nutrientes armazenados por meio do aumento da glicogenólise, da neoglicogênese, balanço de nitrogênio negativo, do aumento da produção de uréia, da liberação de AGL e glicerol do tecido adiposo. Em outras palavras, o aumento da razão I/G promove um ambiente anabólico, enquanto sua diminuição acarreta catabolismo (15).

## 1.6 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

O GH é um polipeptídeo de 22 KDa com 191 aminoácidos, 2 ligações dissulfeto e quatro hélices alfa. É sintetizado nas células somatotróficas da hipófise anterior e seu papel central é a regulação do crescimento e diferenciação celular, principalmente modulando a expressão gênica e o metabolismo em tecidos-alvo(16). Embora o GH possa ter efeitos diretos nos tecidos periféricos, a maior parte dos seus efeitos promotores de crescimento são mediados pelo IGF-1, um membro da família dos peptídeos semelhantes à insulina(16).

A ligação do GH à porção extracelular de seu receptor é seguida pela dimerização do receptor (GHR) e início da sinalização do GH. Uma vez que se liga ao receptor através do sítio 1, um segundo receptor idêntico é recrutado pelo sítio 2, levando à dimerização do receptor e subsequente ativação celular(16).

O gene do GH é expresso nas células somatotróficas da hipófise anterior. A secreção de GH ocorre de forma pulsátil devido à ação de dois fatores hipotalâmicos, hormônio de liberação do GH (GHRH), que estimula sua secreção, e a somatostatina, que a inibe. A secreção de GH também é estimulada pela grelina, um secretagogo endógeno que é secretado principalmente pelo trato gastrointestinal. No plasma, o GH está ligado à proteína de ligação do hormônio do crescimento (GHBP), que é uma forma truncada solúvel do GHR. Assim, o GH na circulação existe nas formas livre e ligada, sendo a predominância de cada uma dependente do padrão pulsátil da sua secreção (17).

A hipótese da somatomedina, na sua forma original, afirmou que o GH promove indiretamente o crescimento somático através da produção de um fator segregado chamado somatomedina-C, conhecido também como IGF-1(17). Este, por sua vez, inibe a secreção de GH por feedback negativo. Em resumo, o GH secretado pela hipófise anterior promove a síntese e liberação de IGF-1 principalmente pelo fígado. Este será então o principal efetor nas células periféricas dos efeitos anabólicos de GH<sup>18,19</sup>.

### 1.6.1 Ação do Hormônio do Crescimento no Metabolismo

Os primeiros dados publicados sobre os efeitos metabólicos do GH podem ser datados de 1948 e sugerem que este induz preferencialmente a lipólise e inibe a proteólise em camundongos em jejum(18). Deste modo, os efeitos metabólicos do GH são direcionados ao tecido adiposo, fígado e músculo esquelético com foco no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos(17).

No tecido adiposo, o GH exerce um efeito lipolítico predominantemente no tecido adiposo visceral e, em menor grau, no tecido adiposo subcutâneo, pelo aumento da atividade da HSL resultando em aumento do efluxo de AGL. Por outro lado, o GH exerce pouco ou nenhum efeito sobre a degradação dos triglicerídeos plasmáticos pela lipoproteína lipase periférica (LPL). O GH também desempenha um papel na adipogênese, estimulando a diferenciação de pré-adipócitos pequenos em adipócitos grandes e maduros, além de estar associado a uma maior capacidade de armazenamento de triglicerídeos e maior capacidade lipolítica através da ativação da via transdutores de sinal e ativadores das proteínas de transcrição  $\gamma$ /receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama (STAT5 / PPAR $\gamma$ ). Ademais, suprime a captação de glicose no tecido adiposo onde atua como contrarregulador da insulina(17).

Contrariamente aos seus efeitos no tecido adiposo, o GH induz a captação de AGL no fígado aumentando a atividade da LPL e/ou a expressão da lipase hepática. Além disso, a administração de GH promove o armazenamento de triglicerídeos no fígado, levando a esteatose hepática. Três mecanismos possíveis podem estar envolvidos neste processo: a inibição da lipólise intra-hepática, a inibição da oxidação lipídica e o estímulo à lipogênese. Existem dados experimentais em apoio a essas três hipóteses(17).

O GH estimula a captação de AGL pelo músculo esquelético, principalmente pelo aumento da expressão de LPL. Estes são utilizados na geração de energia pela oxidação lipídica ou armazenados como triglicerídeo intramiocelular(17). A administração de GH a indivíduos saudáveis diminuiu a oxidação de carboidratos e aumentou concomitantemente a oxidação lipídica(17). Além disso, a ação do GH na sinalização de insulina e metabolismo de carboidratos no músculo esquelético não pode ser claramente definida mas pode incluir o aumento da expressão de p85a, um regulador negativo da sinalização de insulina(17). O GH tem um efeito anabólico líquido sobre o metabolismo das proteínas, pois tanto estimula a síntese protéica quanto suprime a proteólise. Também surgiu a hipótese de que o aumento

induzido por GH no influxo de AGL fornece ATP e NADH para a neoglicogênese, revogando a necessidade de utilização de aminoácidos e conseqüentemente a proteólise. Esta teoria tem sido apoiada por estudos que mostram que o GH aumenta a oxidação lipídica em humanos e roedores<sup>18,20</sup>. Um possível mecanismo de síntese de proteína induzida pelo hormônio foi demonstrado na linha celular de hepatoma de rato H4IIE, onde o GH ativou a via de sinalização proteína alvo da rifampicina em mamíferos (mTOR), uma clássica via estabelecida envolvida na síntese de proteínas(17).

Em resumo, o GH e o seu principal efector, o IGF-1, desempenham um papel importante na regulação dos substratos energéticos, promovendo o anabolismo proteico no estado pós-alimentar e, durante o jejum prolongado, mobilizando os AGL para serem utilizados como substrato energético, preservando assim as reservas vitais de proteínas(18).

### 1.6.2 GH e Resistência Insulínica

Nos estudos em humanos, descobriu-se que quantidades anabólicas de GH não causam aumento na glicemia de indivíduos saudáveis, mas podem diminuir a sensibilidade à insulina(18). Quando GH exógeno é infundido em indivíduos saudáveis por 4 horas, uma redução abrupta de 40% na captação de glicose dos músculos do antebraço é registrada, juntamente com uma diminuição mais lenta de 50% na oxidação da glicose e um aumento proporcional na utilização de glicose não-oxidativa(18). A diminuição rápida na captação de glicose pelo músculo pode ser devido ao efeito direto do GH ou secundário ao aumento local da utilização de lipídeos(18). Alternativamente, estudos *in vitro* demonstraram aumento da neoglicogênese a partir de alanina, ou mais provavelmente, do lactato no córtex renal canino incubado com GH(18).

O GH possui efeitos conhecidos como diabetogênicos, exemplificados pela alta prevalência de DM em pacientes com acromegalia(17). Estudos com administração aguda e crônica do hormônio comprovaram a indução da resistência à insulina pelo aumento da produção hepática de glicose, diminuição da captação da glicose por tecidos periféricos, diminuição do consumo muscular de glicose, aumento da captação e oxidação de intermediários lipídicos pelo músculo (19).

Foi proposto que as ações antagônicas à insulina do GH no turnover da glicose poderiam ser causadas pelo aumento da disponibilidade de AGL, resultando na competição do substrato. O provável mecanismo parece ser secundário a clássica estimulação da lipólise

pelo GH e subsequente competição dos substratos no ciclo glicose-ácido graxo, conhecido como ciclo de Randle (20). Este mecanismo, proposto pelo autor em 1963, sugere que o aumento da oxidação de AGL inibe a captação da glicose estimulada pela insulina devido ao acúmulo intracelular de citrato e G6Pase. Posteriormente, Shulman e colaboradores em 2002 demonstraram que ao invés de um aumento, houve uma diminuição intracelular de glicose e glicose-6-fosfatase. Assim, o aumento da oxidação dos AGL por tecidos periféricos favorece o acúmulo intracelular de metabólitos lipídicos como Acetil-CoA e diacilglicerol que atuam ativando serinas/treoninas quinases como a PKC, inibidor do fator nuclear kappa B (IKKB), fator nuclear kappa B (NFκB); as mesmas ativadas por citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina 6 (IL-6). Estas, por sua vez, favorecem a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina e bloqueiam a ativação da PI3K na cascata intracelular de ativação do IR, com conseqüente prejuízo na translocação do GLUT4. A Glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) e a PKB/Akt são duas outras proteínas-chave da via intracelular de sinalização da insulina que são inativadas pelo aumento da oxidação do AGL(21).

No fígado, este aumento da oxidação mitocondrial do AGL resulta na ativação da neoglicogênese. Portanto, a oxidação mitocondrial de AGL provoca acúmulo de Acetil- CoA, com subsequente ativação da piruvato carboxilase (PC), fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e adenosina trifosfato (ATP) utilizados na via neoglicogênica. Em pacientes com DM2, a autorregulação hepática é alterada, levando a um aumento na produção hepática de glicose na presença do aumento de AGL. Durante um clamp euglicêmico/hiperinsulinêmico, a infusão de triglicérides e heparina, que elevou as concentrações plasmáticas de AGL, aumentou a produção hepática de glicose e alterou a capacidade da insulina em suprimir essa produção, caracterizando a resistência à insulina no fígado. Mecanismos envolvidos na desregulação da sinalização da insulina pelos AGL são muito semelhantes aos descritos no músculo esquelético (20).

Embora ainda não completamente esclarecido, acredita-se que o principal mecanismo de resistência à insulina induzida pelo GH seja decorrente, direta ou indiretamente, do aumento da lipólise periférica e da conseqüente liberação de AGL. Por esse mecanismo, ocorreria ativação da lipase hormônio-sensível primariamente no tecido adiposo visceral, tendo como resultado o aumento do fluxo de AGL para circulação(17). Este aumento induziria resistência insulínica nos tecidos por inibir a atividade do IRS-1 e

subsequente falha na ativação da PI3K no músculo e tecido adiposo. Enquanto isso, o aumento dos AGL no hepatócito resultaria em promoção da oxidação lipídica e acúmulo de acetil-CoA, responsável por estimular enzimas da neoglicogênese: a piruvato carboxilase, a PEPCK e G6Pase. Por fim, ocorreria liberação de glicose pelo fígado promovendo hiperglicemia(22).

### 1.7 PEGVISOMANTO

A descoberta do antagonista do GHR, o pegvisomanto, começou há 15 anos com a elucidação da relação estrutura-função do GH e seu receptor. A glicina na terceira  $\alpha$  hélice do GH é particularmente importante para atividade biológica deste hormônio. Se substituído por vários outros aminoácidos, o GH é convertido de estimulador do crescimento em um supressor do crescimento ou antagonista de sua ação(16). Dessa forma, o pegvisomanto é um análogo de GH que inclui a substituição de um único aminoácido na posição 120 dentro do local de ligação 2, o que impede a ativação de seu receptor. As alterações adicionais incluíram 8 substituições de aminoácidos dentro do sítio de ligação 1 que aumentam as suas propriedades de ligação, a sua meia-vida e reduz a imunogenicidade da molécula. Estas alterações na molécula antagonista de GH resultaram na substituição original de Glicina 120 no local 2 bem como oito mutações no sítio 1, que mantém a ligação do GHR sem ativa-lo, proporcionando propriedades antagônicas com meia-vida estendida de 100 horas(16) (figuras 1 e 2).

O pegvisomanto é, portanto, um análogo do GH que funciona como antagonista competitivo e reversível do GHR. Teoricamente, o bloqueio com o pegvisomanto poderia servir como controle negativo nos estudos de sinalização do GH. Pela primeira vez, o bloqueio específico de GHR foi usado em um experimento de sinalização de GHR humano. Utilizou-se a hipótese que o pegvisomanto serviria como um controle negativo do GH, evitando qualquer impacto da secreção espontânea de GH durante o estudo (23).

Uma única injeção de pegvisomanto suprimiu rapidamente os níveis de IGF-1 em 31% e aumentou a secreção de GH(16). O uso potencial de um antagonista de GH para indicações clínicas resultantes de níveis elevados de GH, como a acromegalia, ou daqueles em que o GH ou IGF-1 podem desempenhar um papel fisiopatológico foi amplamente descrito(16). O pegvisomanto diminuiu os níveis de IGF-1 em 97% dos 90 pacientes acromegálicos tratados por mais de 12 meses usando até 40 mg/dia. Também foram corrigidos, no todo ou em parte, as alterações metabólicas encontradas na acromegalia, como resistência à insulina, hiperglicemia e elevação dos AGL no plasma(16).

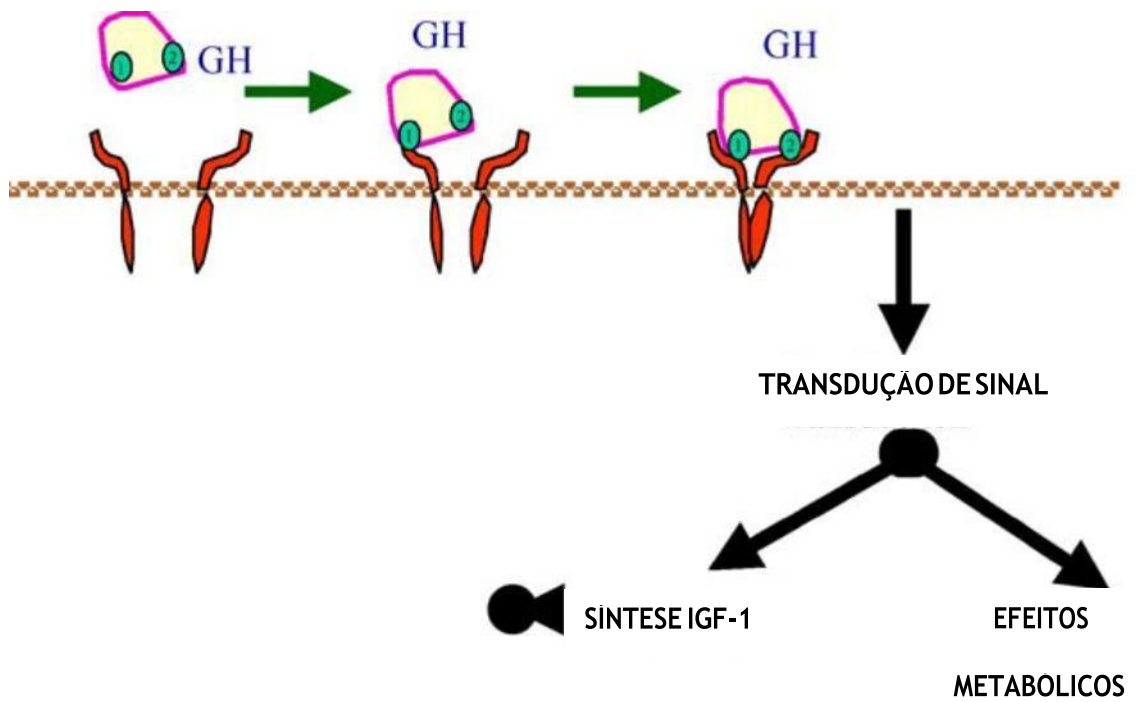


Fig. 3. Representação esquemática da interação do GH-GHR e seus efeitos biológicos (16)

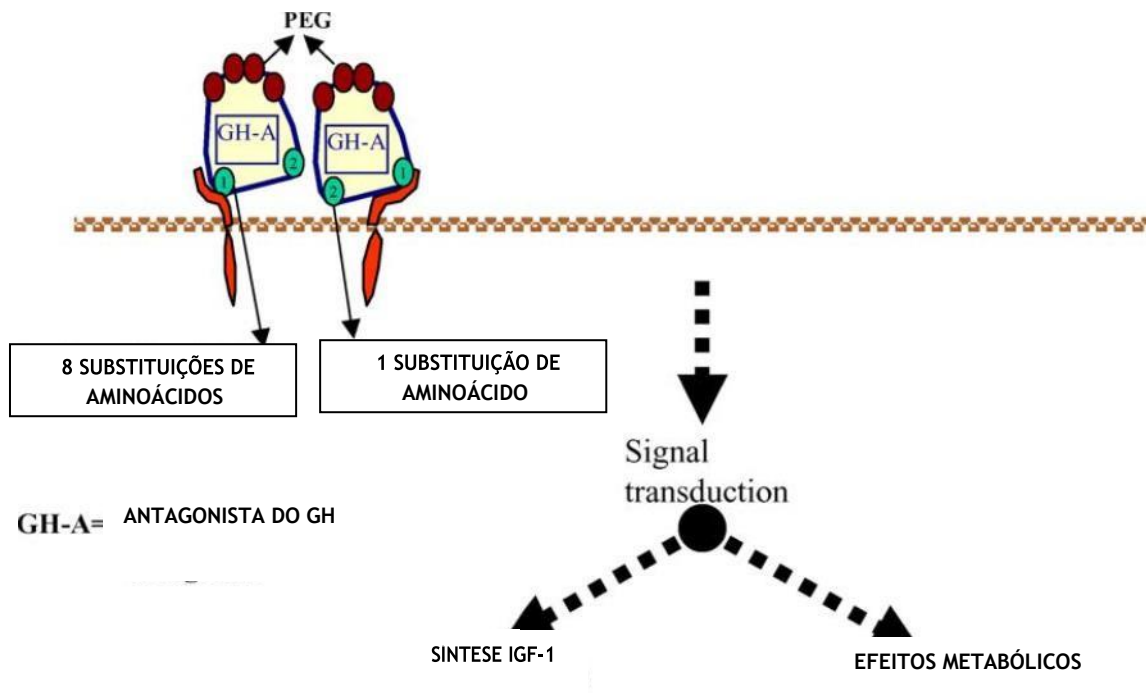


Fig. 4. Representação esquemática da interação do GH- GH-A- GHR e efeitos biológicos.

## 1.8 INIBIDORES DO SGLT2

Indivíduos saudáveis são capazes de manter a homeostase da glicose, regulando sua produção, reabsorção e utilização. A importância deste mecanismo é evidente, pois variações extremas na ingestão de glicose resultam em flutuações relativamente pequenas em suas concentrações plasmáticas(24). Apesar da glicose presente no plasma ser livremente filtrada pelo glomérulo, sua excreção urinária é mínima, tornando a glicosúria um marcador de doença renal. Indivíduos com hiperglicemia estão expostos a complicações resultantes das altas concentrações de glicose e os rins tentam compensar o aumento excessivo destas concentrações pela glicosúria. Diariamente, cerca de 180g de glicose são filtradas pelos glomérulos e reabsorvidas quase integralmente pelo túbulo contorcido proximal, sendo então devolvida para a circulação. Isto é realizado por transportadores passivos, o GLUT e por cotransportadores ativos, os cotransportadores de sódio-glicose (SGLT). A glicosúria somente ocorre se a capacidade máxima das proteínas transportadoras de glicose (350 mg de glicose/min) for excedida (25).

Existem seis SGLT identificados, dos quais dois, o SGLT1 e o SGLT2 são considerados mais importantes(24). Nas células epiteliais do intestino delgado e do túbulo renal a glicose é transportada acoplada ao  $\text{Na}^+$  pelos SGLT, elevando a concentração intracelular do substrato, para então ocorrer um efluxo a favor de gradiente na membrana basolateral dessas células. O SGLT1 é um transportador de alta afinidade e baixa capacidade e, portanto, responsável por apenas uma pequena fração da reabsorção renal de glicose. Ele acopla o co-transporte de 2 íons  $\text{Na}^+$  para cada molécula de glicose e está localizado principalmente em células do intestino delgado, mas também no rim e no coração. Funciona predominantemente como um transportador sódio-glicose/galactose e mutações no gene do SGLT1 resultam em má absorção de glicose e galactose no intestino(26). Em contrapartida, o SGLT2 é um transportador de baixa afinidade e alta capacidade, que acopla o transporte de 1 íon  $\text{Na}^+$  para cada molécula de glicose e é encontrado quase exclusivamente no túbulo contorcido proximal do rim. Este é responsável pela reabsorção de aproximadamente 90% da glicose filtrada pelo glomérulo. Os demais 10% são reabsorvidos pelo SGLT1 no segmento distal (S3) do túbulo proximal. Mutações no gene que codifica o SGLT2 são as causas da glicosúria renal tipo A e B, devido a diminuição ou mesmo ausência da atividade transportadora de glicose pelo SGLT2 e conseqüentemente, a excreção abundante de glicose pela urina, sem comprometimento da função renal (26) (figura 3).

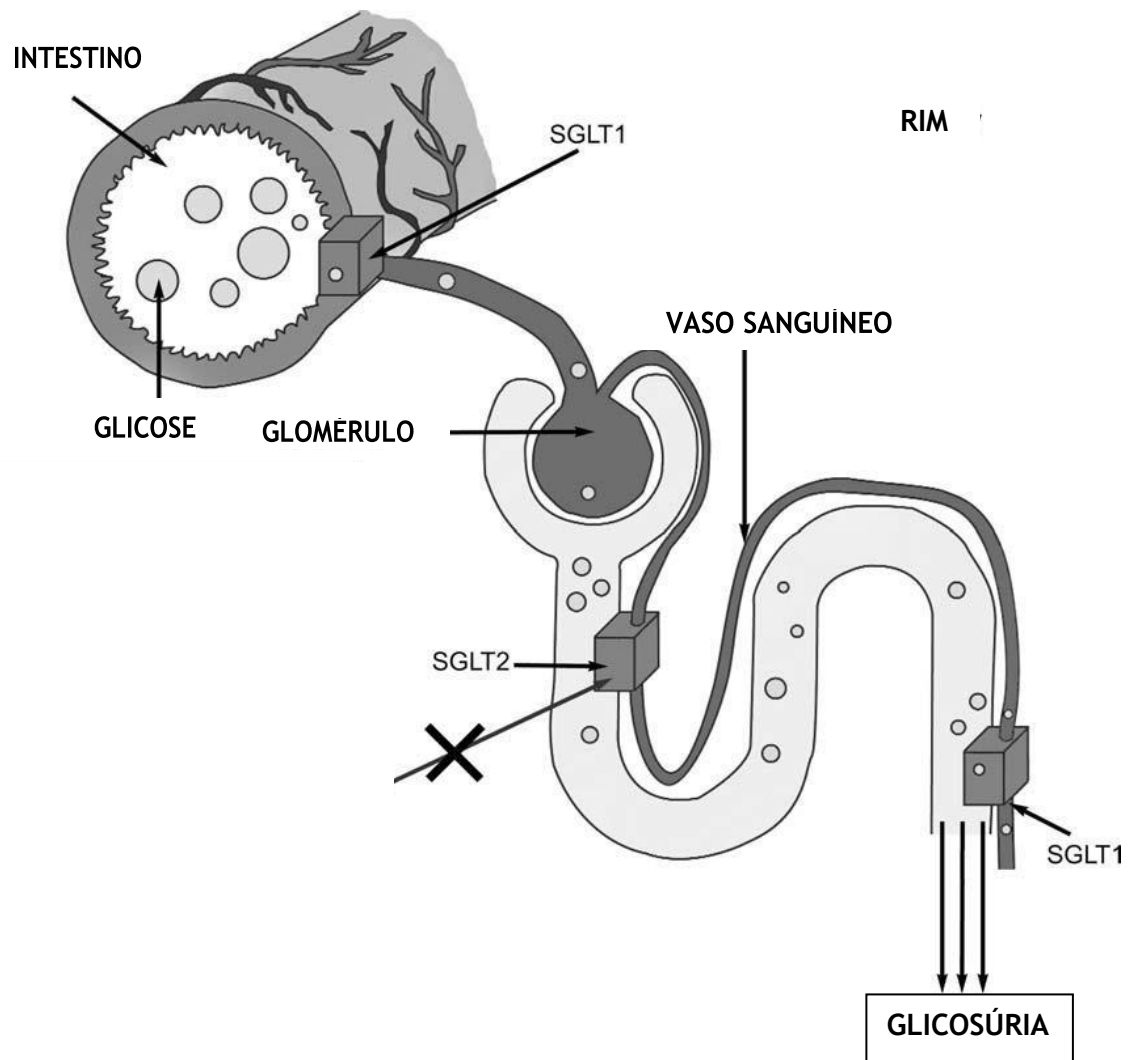


Fig.5. Mecanismo anti-diabetogênico dos inibidores do SGLT2 (26)

A ideia de bloquear a atividade do SGLT2 para induzir glicosúria terapêutica decorre da primeira demonstração de inibição competitiva pela florizina da captação de glicose em vesículas de borda em escova do rim humano normal. Estudos subsequentes demonstraram que a glicosúria crônica induzida pela florizina corrigiu a resistência à insulina e restaurou a função das células  $\beta$  no modelo de DM2 com rato pancreatectomizado. A deleção genética do SGLT2 melhorou a tolerância à glicose e a função das células  $\beta$ , sem ter comprometido a função renal em camundongos. Finalmente, a glicosúria renal familiar, uma condição rara devido à inativação de mutações privadas do gene que codifica o SGLT2 (SLC5A2), fornece um modelo humano de glicosúria euglicêmica crônica que parece estar associada à função renal preservada e, na melhor das evidências disponíveis, tolerância à glicose e peso corporal normais.

Com base nessas premissas, uma nova classe de agentes anti- hiperglicemiantes orais foi desenvolvida para uso clínico em pacientes com DM(26).

Atualmente, existem três medicações dessa classe comercializadas no Brasil: canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina. Considerando que todas têm o mesmo mecanismo de ação, os estudos em humanos têm demonstrado que as drogas apresentam capacidades semelhantes em reduzir a glicemia de jejum, a HbA<sub>1c</sub> em aproximadamente 0,7%, a pressão arterial sistêmica em 3 mmHg e o peso. Além dessas ações terapêuticas, essas drogas também aumentam o tônus endógeno do glucagon, possivelmente pela inibição dos receptores SGLT2 na célula alfa. Esse efeito se mostrou clinicamente relevante ao se detectar aumento do risco de cetoacidose diabética em pacientes DM1 ou mesmo DM2 muito insulino-pênico em uso da medicação(27).

A hipoglicemia é um efeito colateral potencial de vários agentes hipoglicemiantes. No entanto, como os inibidores de SGLT2 diminuem a concentração de glicose plasmática sem aumentar a secreção de insulina e sem inibir a resposta contrarreguladora, a hipoglicemia não é esperada com essa classe de drogas. De fato, os ensaios clínicos demonstraram que a prevalência de eventos hipoglicêmicos em indivíduos tratados com inibidores da SGLT2 foi semelhante aos que receberam placebo(24).

Como os inibidores da SGLT2 promovem a glicosúria, eles representam um risco para infecções do trato urinário. Pacientes diabéticos com controle insatisfatório apresentam glicosúria significativa, resta determinar se a glicosúria adicional promoverá o crescimento bacteriano. Em estudos clínicos, um pequeno aumento (3% a 5%) na taxa de infecções do trato urinário foi relatado em indivíduos que receberam inibidores de SGLT2 em comparação com placebo (88-90). A maioria dessas infecções envolvem o trato urinário inferior e respondem à antibioticoterapia padrão(24).

Baseado em alguns estudos e relatos de caso, o órgão americano responsável pelo controle de alimentos e fármacos - *Food and Drug Administration* (FDA) - publicou um alerta em 2015 sobre o risco dessas drogas precipitarem cetoacidose diabética com hospitalização(28). Dois pacientes com DM1 de longa data (23 e 27 anos, respectivamente)

apresentaram múltiplos episódios de cetoacidose enquanto recebiam canagliflozina, embora nenhum deles tivesse sido hospitalizado por cetoacidose diabética antes do início da terapia com inibidor de SGLT2. É importante ressaltar que ambos os pacientes relataram que seus médicos foram inicialmente confundidos pelo fato de a cetoacidose não ter sido acompanhada de hiperglicemia. Apesar da síndrome de cetoacidose euglicêmica estar bem documentada em outros contextos clínicos, parece que os inibidores de SGLT2 devem ser adicionados à lista de fatores que podem predispor essa condição. Embora Henry e colaboradores em 2016 não tenham observado nenhum episódio de cetoacidose diabética em um estudo de duas semanas com 70 pacientes portadores de DM1 tratados com dapagliflozina<sup>40</sup>, um estudo de duas semanas com apenas 29 indivíduos recebendo uma dose terapêutica 5 a 10 mg ao dia de dapagliflozina não excluiu inteiramente esse risco. Relatos de casos também começaram a aparecer descrevendo episódios de cetoacidose diabética ocorrendo em pacientes com DM2 tratados com inibidor de SGLT2. Por exemplo, 2 dias após o início da canagliflozina em combinação com metformina e glipizida, um paciente com DM2 apresentou-se ao departamento de emergência com cetoacidose euglicêmica associada a um *anion gap* de 19 mEq / L(29).

Esses relatos de casos de cetoacidose diabética em pacientes tratados com inibidor de SGLT2 levantam a questão de como essas drogas podem contribuir direta ou indiretamente na patogênese da cetoacidose. Talvez o mecanismo de promoção de cetose mais direto seja ilustrado pelos estudos com os de inibidores de SGLT2 em pacientes com DM1. Devido à propriedade redutora de glicose dos inibidores de SGLT2, os pesquisadores diminuíram a dose de insulina administrada aos pacientes para minimizar o risco de hipoglicemia, o que resultou no aumento da lipólise periférica e na diminuição do efeito anticetogênico da insulina sobre o fígado. Esse fato explicaria o aumento nas concentrações de corpos cetônicos circulantes(30). Outros possíveis mecanismos seriam: 1- a redução da depuração renal de corpos cetônicos pelo bloqueio do SGLT2, uma vez que a reabsorção de cetonas que ocorre via SMCT2 e SMCT1 é dependente do gradiente de Na<sup>+</sup> dirigido do lúmen para a célula do túbulo proximal. Visto que a glicosúria produzida pela inibição do SGLT2 é decorrente do co-transporte de Na<sup>+</sup>/glicose, este bloqueio farmacológico do transportador pode aumentar o teor de sódio fornecido à SMCT, facilitando a reabsorção do corpo cetônico(31) e 2- o aumento na produção de glucagon pela célula  $\alpha$  resultante da inibição do SGLT2<sup>38</sup>.

A cetogênese ocorre principalmente na mitocôndria dos hepatócitos. A oxidação dos ácidos graxos leva à formação de corpos cetônicos, incluindo acetoacetato e 3- $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ OHB). A magnitude da cetogênese depende, entre outras coisas, da oferta de AGL proveniente da atividade da HSL nos adipócitos, que por sua vez é inibida pela insulina e ativada pelo GH. Os AGL são absorvidos pelos hepatócitos e transformados pela  $\beta$ -oxidação em acetil-CoA e acetoacetil-CoA, estas duas moléculas são condensadas em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), para formar o  $\beta$ OHB mais estável. Nos hepatócitos, a enzima limitante da cetogênese é a HMG-CoA sintase mitocondrial (HMGCS), que pode ser estimulada pelo jejum e pelo glucagon, mas é inibida pela insulina. Como via alternativa, a acetil-CoA, formada a partir de ácidos graxos ou glicose, pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) por condensação com oxaloacetato. No entanto, quando a glicose é baixa e a gliconeogênese aumenta, oxaloacetato é usado para o último, e acetil-CoA é desviado do ciclo TCA para a formação de corpos cetônicos. Os corpos cetônicos caem na corrente sanguínea e são absorvidos em tecidos extra-hepáticos, como cérebro, córtex renal, coração e músculo, onde entram no ciclo TCA após a conversão para acetil-CoA. A inibição do SGLT2 reduz a concentração de glicose e aumenta a razão glucagon/insulina no plasma, contribuindo para a gliconeogênese e cetogênese no fígado(32).

Os inibidores do SGLT2 exibem efeitos variáveis no perfil lipídico, que incluem aumento do HDL e LDL(33) e reduções nos triglicerídeos(34)(35)(36)(37). Porém, uma meta-análise de dados agrupados demonstrou um aumento significativo das concentrações de HDL com a terapia com SGLT2 e sem alterações clinicamente relevantes no LDL e nos triglicerídeos(38). Um aumento consistente nos níveis de colesterol total, LDL e HDL foi demonstrado com os agentes SGLT2. No entanto, a proporção de LDL/HDL não se mostrou mais desfavorável(38). Considerando que o aumento do LDL está associado ao aumento no risco de doença cardiovascular, o Estudo de Avaliação Vascular da Canagliflozina (CANVAS) recomenda que os níveis de LDL sejam monitorados durante o tratamento com canagliflozina(35). As alterações metabólicas que resultam dessa alteração no perfil lipídico ainda não são bem compreendidas.

## 2 JUSTIFICATIVA

A empagliflozina reduz as concentrações sanguíneas de glicose através do bloqueio dos receptores SGLT2 no túbulo renal. Esta diminuição ativa mecanismos de contrarregulação da insulina, sobretudo o aumento no tônus do glucagon, com consequente ativação de glicogenólise, neoglicogênese e cetogênese no fígado. O aumento do tônus de glucagon também é explicado pelo bloqueio farmacológico dos receptores SGLT2 presentes nas células  $\alpha$ -pancreáticas, com o consequente aumento na liberação de glucagon<sup>38</sup>. Sabendo que o GH é um hormônio chave na indução de lipólise, com efeito proeminente na quebra de triglicerídeos em AGL e glicerol no tecido adiposo e consequente aumento da oferta desses substratos para o fígado, este hormônio pode ter um papel relevante como modulador da oferta de AGL ao fígado para posterior produção de  $\beta$ -hidroxibutirato em pacientes portadores de DM2 medicados com os inibidores do SGLT2.

Um estudo de caso em paciente com acromegalia, onde as concentrações de GH e IGF-1 estavam elevadas, verificou-se cetoacidose diabética após dois dias de uso do inibidor de SGLT2 para controle da hiperglicemia, reforçando a hipótese de que o GH tenha papel relevante como modulador da cetogênese hepática(39).

Portanto, propôs-se neste estudo avaliar o papel do GH sobre a produção de  $\beta$ -hidroxibutirato em pacientes portadores de pré-diabetes ou DM2 tratados com o inibidor de SGLT2 empagliflozina.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do GH sobre a concentração plasmática de betahidroxibutirato em pacientes com pré-diabetes ou DM2 tratados com empagliflozina.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar as alterações plasmáticas, após administração aguda de empagliflozina, nas concentrações de glicose, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, insulina, glucagon, GH, IGF-1, AGL e betahidroxibutirato em jejum e após ingestão de dieta padronizada.

Determinar as alterações plasmática, após uso diário de empagliflozina por 21 e 28 dias, nas concentrações de glicose, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, insulina, glucagon, GH, IGF-1, AGL e betahidroxibutirato em jejum e após ingestão de dieta padronizada.

Determinar as alterações plasmáticas, após uso diário de empagliflozina por 21, 28 dias e pegvisomanto, nas concentrações de glicose, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos, insulina, glucagon, GH, IGF-1, AGL e betahidroxibutirato em jejum e após ingestão de dieta padronizada.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES

#### 4.1.1 Ética

O estudo está de acordo com as normas internacionais propostas para investigação clínica da Declaração de Helsinki e com a resolução nº 510, de abril de 2016. O presente protocolo e o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, parecer número CEP 1.896.004/2017. (Anexo 2).

#### 4.1.2 População e Amostragem

O processo de amostragem foi por conveniência e ocorreu no primeiro semestre de 2017. Recrutou-se pacientes portadores de pré-diabetes ou DM2 que possuíam resultados de HbA1c nas bases de dados da Prefeitura de Londrina ou do Hospital Universitário de Londrina. Foi feito contato telefônico e solicitado a participação na pesquisa. Também foi lançado convite aos funcionários dessas instituições que preenchessem os critérios de inclusão previamente estabelecidos.

#### 4.1.3 Critérios de Inclusão

Indivíduos com idade acima de 18 anos, homens e mulheres, portadores de pré-diabetes ou DM2, com índice de massa corpórea entre 25 e 40 kg/m<sup>2</sup> e HbA1c > 5,7 e < 11% e que assinaram o TCLE foram incluídos no estudo.

#### 4.1.4 Critérios de Não-inclusão

Foram excluídos da pesquisa os pacientes que apresentassem as seguintes condições: 1- uso de insulina ou outro antidiabético oral, exceto metformina; 2- presença de microalbuminúria ou doença renal crônica; 3- gestação; 4- cirurgia bariátrica prévia; 5- doença hepática ou cardíaca que tenha repercussão sobre o controle glicêmico e 6- disfunção tireoidiana não controlada.

## 4.2 PROTOCOLO DO ESTUDO

### 4.2.1 Recrutamento

Foram analisados resultados de HbA<sub>1c</sub> nas bases de dados do Hospital Universitário de Londrina e da Prefeitura de Londrina, a partir destes resultados foi feito contato telefônico ou presencial para convite de participação na pesquisa. Os indivíduos que se enquadraram nos critérios de inclusão e não apresentavam critério de exclusão foram então selecionados. Dois pacientes foram posteriormente excluídos das análises, um devido a necessidade de insulinização durante o protocolo e outro por apresentar valores de glicemia ao início do teste indicativos de HbA<sub>1c</sub> muito acima dos valores admitidos nos critérios de inclusão.

### 4.2.2 Avaliação Clínica

Variáveis clínicas como idade, tempo de diagnóstico e medicações orais foram coletadas. Peso e altura foram medidos em posição ortostática com balança digital Filizola e antropômetro, respectivamente. O índice de massa corpórea foi calculado como peso em kilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado. A mensuração da pressão arterial foi realizada por método auscultatório, estando o paciente sentado de acordo com as orientações das Sociedades Brasileiras de Cardiologia, Hipertensão e Nefrologia (2010). Os pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva foram considerados como hipertensos, independente dos níveis pressóricos apresentados na avaliação clínica.

### 4.2.3 Protocolo

Foi utilizado a empagliflozina 25 mg (Jardiance® - Boehringer Ingelheim). Os 17 indivíduos foram acompanhados por 28 dias e passaram por três testes consecutivos, a saber: teste 1 – primeiro dia de estudo, considerado o baseline; teste 2 - aos 21 dias de tratamento com empagliflozina 25 mg e teste 3 - aos 28 dias de tratamento com empagliflozina 25 mg e aplicação de pegvisomanto 30 mg por via subcutânea 36 horas prévias ao teste.

Teste 1 (basal): após jejum de 10 horas, com os pacientes em repouso, foi estabelecido acesso venoso periférico em fossa antecubital para coleta de amostras sanguíneas sequenciais. Foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue nos tempos -60, 0, 30, 60,

90, 120, 180 e 240 minutos. Ao início do teste, os pacientes receberam uma dose de placebo (1 cp via oral, ingerido com água) no tempo -60, imediatamente após a primeira coleta. Dez minutos antes da coleta no tempo 0, todos os pacientes receberam uma refeição padrão a ser ingerida em aproximadamente 10 minutos, composta por 1 ovo cozido, 50 g de queijo parmesão e 125 g de pão branco (francês), que corresponde a 710 kcal (58% de carboidrato, 24% de gordura e 18% de proteína). Ao final da coleta, no último tempo (240 min), os pacientes receberam 28 comprimidos de empagliflozina 25 mg, com orientação para uso de 1 comprimido ao dia, às 8:00h, todas as manhãs.

As amostras de sangue coletadas foram transferidas para tubos contendo EDTA, gel separador de soro ou fluoreto, foram mantidas em gelo e posteriormente centrifugadas a 8°C para obtenção do plasma. As dosagens de: insulina, glicose, triglicerídeos, glucagon, hormônio do crescimento e colesterol total e frações foram realizadas no mesmo dia. Para as determinações de AGL e betahidroxibutirato, amostras de plasma foram acondicionadas em freezer à -70°C para posterior dosagem. O IGF-1 foi mensurado apenas no tempo -60. Quando necessário transporte, este foi realizado em acondicionamento com gelo seco para evitar descongelamento das amostras.

Teste 2. No 21º dia após o teste 1, o mesmo procedimento foi repetido, tendo como única diferença a ingestão de empagliflozina 25 mg no tempo -60, em substituição ao placebo.

Teste 3- No 28º dia após o teste 1, o procedimento foi semelhante ao teste 2, tendo sido precedido pelo uso subcutâneo de pegvisomanto 30 mg, 36 horas antes da realização do teste.

#### 4.2.4 Exames Laboratoriais Basais

A glicose foi mensurada pelo método hexoquinase glicose 6-fosfatase desidrogenase descrito por Kunst et al (1983), utilizando-se a espectrofotometria enzimática UV lida na absorbância entre 340 a 383 nm. A concentração de triglicerídeos foi mensurado pelo método enzimático de quimioluminescência lido à 510-700nm. O colesterol total foi mensurado pela técnica de quimioluminescência descrita por Stadtman et al (1957) e aprimorada por Rautela e Liedtke (1978) lida à 452, 540 e 700nm. O HDL foi mensurado pelo método de espectrofotometria enzimático colorimétrico lido à 600/700nm. Todos os ensaios foram realizados no analisador automático Dimension RXL (Estados Unidos), com reagentes procedentes da Siemens Healthcare Diagnostics Incorporation (Estados Unidos).

Para estimar o valor de LDL e VLDL foi utilizada a fórmula de Friedewald, na qual o valor de colesterol VLDL é o resultado dos triglicerídeos dividido por cinco e o LDL resulta da subtração do valor de HDL e de VLDL do colesterol total.

A insulina foi mensurada por imunoensaio de quimioluminescência pelo analisador automático Architect com reagentes procedentes do laboratório Abbott (Estados Unidos). O GH e o IGF-1 foram mensurados por ensaio de quimioluminescência e o glucagon por radioimunoensaio.

O AGL foi mensurado por método enzimático colorimétrico lido à 550nm. Foi adicionado a este o orlistat, um inibidor de lipase. O  $\beta$ -hidroxibutirato foi mensurado por método cinético enzimático UV da 3-hidroxibutirato desidrogenase lido a 340nm no analisador automático RX Monza com reagentes procedentes da Randox Laboratories Limited (Reino Unido).

### 3.2.5 Análise Estatística

As variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade da distribuição das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre as médias dos grupos que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, segundo o teste de Barlett, foi pesquisada pela análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido de teste pós-hoc de Tukey, com nível de significância adotado de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas no software R versão 3.4.2 e as figuras com auxílio do programa GraphPad Prism versão 4.02.

## 5 ARTIGO

### ARTIGO

Growth hormone effect inhibition with pegvisomant decreases the plasma levels of  $\beta$ -hidroxibutirate in prediabetic or type 2 diabetic patients treated with empagliflozin.

#### Abstract

Context: Specific inhibitors of the renal sodium–glucose cotransporter 2 drugs improve hyperglycemia due to glycosuria, but also increase plasma glucagon tonus and  $\beta$ -hydroxybutyrate production; as a consequence, these drugs can induce ketoacidosis. On the other hand, growth hormone promotes peripheral lipolysis and increases substrate for ketogenesis.

Objective: To evaluate the role of growth hormone on the production of  $\beta$ -hydroxybutyrate in type 2 diabetes mellitus patients treated with empagliflozin 25 mg.

Design: Clinical trial with follow-up for 28 days.

Participants: 17 Individuals over 18 years of age, men and women, with pre-diabetes or type 2 diabetes, body mass index between 25 and 40 kg/m<sup>2</sup> and HbA1c > 5.7 and <11%. Exclusion criteria were: oral antidiabetics, except metformin, presence of microalbuminuria or chronic renal disease, gestation, previous bariatric surgery, liver or heart disease that has repercussion on glycemic control, uncontrolled thyroid dysfunction.

Intervention: The study was divided into 3 trials. Blood samples were obtained at the times: -60, 0, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes, the first fasting sample and the following after standard meal in the 3 tests: 1. baseline, 2. treatment with empagliflozin (25 mg/21 days) and 3. treatment with empagliflozin (25 mg / 28 days) preceded by pegvisomant 30 mg subcutaneous.

Main Outcome Measures: The plasma concentrations of insulin, glucose, triglycerides, glucagon, GH, total cholesterol and fractions, free fatty acids,  $\beta$ -hydroxybutyrate and insulin-like growth factor 1, IGF-1 were measured.

Result: The use of empagliflozin for 21 days reduced the plasma levels of glucose, insulin, triglycerides and increased glucagon and  $\beta$ -hydroxybutyrate. Pegvisomant administration restored the plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate levels to baseline, and, as expected, reduced the IGF-1 levels.

Conclusion: We concluded that GH has a permissive role in promoting the  $\beta$ -hydroxybutyrate production by the increased glucagon tonus caused by the empagliflozin administration to type 2 DM.

## INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is associated with severe medical complications and its overall prevalence is increasing among adults (1). The main metabolic alteration due to type 2 DM is hyperglycemia, which is associated with hyperinsulinemia, peripheral insulin resistance, glycogenolysis, hepatic gluconeogenesis, increased lipolysis and circulating free fatty acids (FFA) (2). A recent class of hypoglycemic drugs are the SGLT2 inhibitors, which act by blocking  $\text{Na}^+$  / glucose co-transport in the renal tubules resulting in glycosuria and adjustment plasma hyperglycemia (3).

This drugs can produce some alterations in the metabolism of the patient with type 2 DM, such as the increase of the glucagon tonus and hepatic ketogenesis, similar that found in type 1 DM (4). Based on the pathophysiology of ketogenesis, it is known that an increase of substrate is required for ketone bodies production, in this case FFA. In general, glucagon concentrations reaching the peripheral adipose tissue are not able to produce effective lipolytic activity (5), whereas growth hormone (GH) is known for this function of peripheral lipolysis (6).

A case report of a patient with acromegaly who had increased plasma concentrations of GH and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and initiated the use of empagliflozin showed a ketoacidosis in two days of drug use confirming a supposed drug-mediated ketogenic environment evidenced by the increase of tonus of the glucagon, glucagon / insulin ratio, lipolysis and available FFA with a consequent increase in hepatic ketogenesis (7).

Therefore, this study proposes to investigate the role of GH in increased  $\beta$ -hydroxybutyrate levels found in type 2 diabetic patients under treatment with empagliflozin.

## SUBJECTS AND METHODS

### Subjects

Nineteen individuals over 18 years of age, men and women, with prediabetes or type 2 DM, body mass index between 25 and 40 kg/m<sup>2</sup>, HbA1c > 5.7 and <11%, were recruited into the study. The exclusion criteria were the following: 1- use of insulin or any other oral antidiabetics, except metformin; 2- presence of microalbuminuria or chronic renal disease; 3- pregnancy; 4- previous bariatric surgery; 5- liver or heart diseases that have repercussion on glycemic control; 6- thyroid dysfunction and 7- no signature of the consent form. The protocols were approved by the Regional Ethical Committee, which included written and oral consent from each participant.

### Study Protocol

Nineteen patients were submitted to three consecutive tests. Test 1 (baseline) on the first day of study, test 2 at 21 days of treatment with empagliflozin 25 mg daily and test 3 at 28 days of treatment with empagliflozin 25 mg daily preceded by the subcutaneous administration of pegvisomant 30 mg 36 hours before the test (figure 1).

Test 1- After a 10-hour fasting with the patients at rest, peripheral venous access was established in the arm for the collection of sequential blood samples (-60, 0, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes). Patients received placebo at time -60, immediately after the first collection. Ten minutes before collection at time 0, all patients received a standard 10-minute meal consisting of 1 boiled egg, 50 g parmesan cheese and 125 g white bread, corresponding to 710 kcal (58% carbohydrate, 24% fat and 18% protein). At the end of the last collection (240 min), patients received 28 tablets of empagliflozin 25 mg, with guidance for use of 1 tablet daily in the morning. Blood samples collected in tubes containing EDTA, serum separator gel or fluoride, and were kept on ice until centrifuged at 8 °C to obtain the plasma. The measurements of glucose, triglycerides, total cholesterol and fractions were done in the same day. Plasma samples were freezed at -80°C for further dosage of insulin, glucagon, GH, FFA,  $\beta$ -hydroxybutyrate and somatomedin C (IGF-1).

Test 2- Approximately 21 days after test 1, the same procedure was repeated, with the patients had been taking empagliflozin 25 mg for 21 days.

Test 3- Approximately 28 days after test 1, the procedure similar to test 2 was repeated, preceded by the subcutaneous administration of pegvisomant 30 mg 36 hours before the test.

#### Analyzes

Glucose, triglycerides, total cholesterol and HDL cholesterol was measured by commercially available kits in automatized equipment (Dimension, Siemens, USA). LDL cholesterol were calculated by the Friedewald formula. Insulin was determined by chemiluminescence immunoassay (Architect, abbott, USA). GH and IGF-1 were measured by chemiluminescence assay and glucagon by radioimmunoassay. FFA were measured by enzymatic colorimetric method read at 550nm. B-hydroxybutyrate was measured by enzymatic UV kinetic method of 3- hydroxybutyrate dehydrogenase read at 340 nm. (RX Monza, Randox, UK).

## Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The normal distribution of the clinical and laboratory variables studied was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. The difference between the means of the groups that presented normal distribution and homogeneity of variance, according to the Barlett test, was analyzed by ANOVA of repeated measures followed by Tukey post hoc test. The level of significance used was  $p < 0.05$ . The analyzes were performed in software R version 3.4.2 and the figures with the aid of the program GraphPad Prism version 4.02.

## RESULTS

Seventeen patients (twelve women and five men) completed the study. Two patients were excluded of the analysis because acute uncontrolled diabetes. Among these, six patients were pre-diabetics and 11 diabetics. The mean age of patients was  $55.64 \pm 4.54$  years old, HbA1c was  $7.13 \pm 1.53$  mg/dL, BMI was  $30.37 \pm 4.93$  kg/m<sup>2</sup> and 10 patients were under metformin use. As expected, the plasma glucose concentrations significantly decreased ( $159.79 \pm 14.82$  mg/dL to  $135.58 \pm 14.84$  mg/dL,  $p < 0.05$ ) on 21 days of empagliflozin treatment (table 1). The additional 7 days of treatment with empagliflozin combined with pegvisomant did not add significant drop in glycemia. Plasma concentrations of triglycerides and total cholesterol decreased significantly at 28 days of the protocol when compared to baseline ( $200.24 \pm 26.44$  mg/dl to  $189.29 \pm 26.44$  mg/dL and  $206.56 \pm 10.19$  mg/dL to  $204.07 \pm 10.19$  mg/dL,  $p < 0.05$  respectively). HDL and LDL cholesterol concentrations did not change with the treatment (table 1).

Plasma insulin concentrations decreased significantly at 21 days of treatment with empagliflozin ( $24.59 \pm 2.58$  mg/dL to  $19.66 \pm 2.62$  mg/dL,  $p < 0.05$ ) without any additional fall at 28 days of protocol. There was an increase in plasma glucagon concentrations at 21 days of

empagliflozin treatment ( $179.93 \pm 8.32$  mg/dL to  $194.29 \pm 8.39$  mg/dL,  $p < 0.05$ ), without further increased by pegvisomant administration. Plasma concentrations of FFA, as well as the insulin/glucagon ratio, significantly decreased ( $0.64 \pm 0.06$  mg/dL to  $0.51 \pm 0.06$  mg/dL and  $0.134 \pm 0.01$  mg/dL to  $0.105 \pm 0.01$  mg/dL respectively,  $p < 0.05$ ) on 21 days of treatment with empagliflozin, without any additional fall at day 28. The plasma concentrations of  $\beta$ -hydroxybutyrate increased ( $0.16 \pm 0.04$  mg/dl to  $0.25 \pm 0.04$  mg/dl,  $p < 0.05$ ) on 21 days of treatment with empagliflozin, but the blockade of the GH receptor by pegvisomant reversed the levels similar to the baseline (table 1).

## DISCUSSION

In this study, the daily use of empagliflozin 25 mg improved glycemic control at 21 days of treatment, as expected. According to animal model studies with diabetic Zucker rats, a single dose of empagliflozin 1 or 3 mg/kg reduced fasting plasma glucose levels, HbA1c values and improved glucose tolerance in response to the challenge with glucose compared to placebo, with no occurrence of hypoglycemia (8). In type 2 DM patients, a single dose of empagliflozin 25 mg orally reduced the area under the curve of glucose in 12% (9). In another study, treatment with dapagliflozin (5, 25 and 100 mg/day) for 14 days showed a significant reduction in fasting plasma levels and also the area under curve of glucose during the oral glucose tolerance test in subjects with type 2 DM (10). Empagliflozin reduced the insulinemia at 21 days of treatment as a result of improved glycemic control. In another study, empagliflozin administered as a single dose in type 2 DM patients diminished the insulin secretion but increased the hepatic glucose production and the glucagon tonus, promoting a 25% decrease in insulin/glucagon ratio (11). In agreement with this, our study also reproduced the increase in glucagon tonus already previously demonstrated in a study with human islet cells exposed to SGLT2 inhibitor dapagliflozin, which founded an increase

in glucagon secretion by 83%, possibly as a consequence of the direct SGLT2 inhibition on alpha cells (12).

In a study with acute (3 hours) and chronic (4 weeks) administration of empagliflozin 25 mg, the glucagon concentrations remained elevated (11). Glucagon acts at the liver increasing endogenous glucose production (EPG) and promoting  $\beta$ -hydroxybutyrate production, which has FFA as substrate. GH promotes peripheral lipolysis and FFA release to liver to be used as substrate for  $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. Taken together, the SGLT2 inhibitors promote a ketogenesis environment, as they decrease the plasma glucose and insulin and increase the glucagon tonus by blocking the SGLT2 receptor in alpha cells. As a consequence, there are increase in the glucagon/insulin ratio and in the  $\beta$ -hydroxybutyrate production. Furthermore, the diabetic ketoacidosis induced by the SGLT2 inhibitors occurred in a normoglycemia environment because the glucosuria (13).

Considering that GH promotes peripheral lipolysis and FFA release, it is reasonable suppose that GH has a key role in this phenomenon. When we blocked the GH action with pegvisomant, we found a significant decrease in  $\beta$ -hydroxybutyrate production, which returned to baseline levels even under empagliflozin administration. These findings strongly suggest that GH has a permissive role in promoting ketogenesis during empagliflozin treatment. In line with this hypothesis, Quarella et al published a case report of ketoacidosis induced by empagliflozin in a diabetic patient with unrecognized acromegalia (14).

The main GH effect on lipid metabolism is the increase of FFA. It remains unsolved if GH directly impacts on hepatic ketogenesis. Some studies suggest yes, but the increase in the supply of liver precursors such as FFA is probably more important (15). In our study, the FFA plasma levels decreased at 21 and 28 days of empagliflozin treatment, probably due to improve in insulin sensitivity in the adipose tissue. As the same time, the plasma levels of  $\beta$ -hydroxybutyrate

increased substantially at 21 days of empagliflozin treatment and returned to baseline values when GH action was blocked by pegvisomant. We expected, but could not find a correlation between FFA and  $\beta$ -hydroxybutyrate plasma levels; however, we could speculate that the main drive in ketone body production by the liver is the insulin/glucagon ratio, not the FFA plasma concentration. In this context, the peripheral lipolysis induced by GH should modulate ketone production by increasing substrate disposal, which in a high glucagon tone environment, contribute to ketogenesis (16).

Another mechanism described in the literature for the increase of circulating  $\beta$ -hydroxybutyrate is the reduction of renal clearance of ketone bodies with SGLT2 blockade. Renal glucose uptake occurs in the proximal tubule and is mediated to the apical membrane by SGLT2 and SGLT1 cotransporters. SGLT2, expressed in the initial portion of the proximal tubule, mediates approximately 97% of renal glucose reabsorption, while SGLT1 in the distal portion of the proximal tubule reabsorbs the remaining approximately 3% under euglycemic conditions. This recapture occurs by  $\text{Na}^+$ /glucose co-transport. The genes encoding their expression are respectively SLC5A2 and SLC5A1, belonging to the same gene family SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12). Already the ketone reabsorption that occurs via SMCT2 and SMCT1 is dependent on the  $\text{Na}^+$  gradient directed from the lumen to the proximal tubule cell. Since glycosuria produced by the inhibition of SGLT2 is via  $\text{Na}^+$ /glucose co-transport mechanism, this pharmacological blockade of the transporter may increase the sodium content delivered to SMCT, facilitating renal recapture and consequent plasma increase of ketone bodies (17). However, we think that this mechanism does not explain our results, since the  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations decreased after the GH action had been blocked by pegvisomant even under empagliflozin administration.

Related to lipid metabolism, we found a decrease in triglycerides and total cholesterol at 28 days. On the other hand, our study did not show the HDL and LDL changes described in the literature. Canagliflozin 100 and 300 mg/day when used as monotherapy for 26 weeks resulted in a significant increase of approximately 7% in HDL versus placebo and 5% in LDL versus placebo. The same study showed reductions in plasma triglyceride concentrations around 15% (18). Another similar study that combined the use of canagliflozin with metformin demonstrated similar results (19, 20). However, a study of a meta-analysis showed only the significant increase in HDL levels with SGLT2 therapy and no clinically relevant changes in LDL and triglycerides (21). Although the increase in plasma HDL and the decrease in plasma concentrations of triglycerides can be explained by the improvement in weight loss and/or glycemic control, the cause of LDL increase with the use of SGLT2 inhibitors remains unknown, as well as the impact of these small changes in the lipid profile in cardiovascular events (22). In this study, we think that the drop in total cholesterol and triglycerides were consequence of the improve in insulin sensivity and also that we cannot find the described changes in HDL and LDL because low number of patients studied.

## CONCLUSION

The empagliflozin administration improved glycemic control in type 2 DM and additionally decreased plasma triglyceride, FFA levels and insulin. On the other hand, empagliflozin increased plasma glucagon,  $\beta$ -hydroxybutyrate levels and reduced insulin/glucagon ratio. The block of GH action with GHR antagonist pegvisomant restored the plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate to baseline levels, even under empagliflozin administration, suggesting that GH has a permissive role in promoting the ketogenesis environment under empagliflozin treatment.

The main limitation of this study would be the number of patients limited to the clinical study.

## REFERENCES

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(1):81-90.
2. Care D, Suppl SS. Obesity management for the treatment of type 2 diabetes: Standards of medical care in Diabetesd2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S65-S72. doi:10.2337/dc18-S007.
3. International Diabetes Federation. Idf Diabetes Atlas. 2015. 1-527. Available from: [http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html%5Cnhttps://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Atlas\\_Full\\_0.pdf%5Cnw ww.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html%5Cnhttps://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf%5Cnw ww.ecuadorencifras.gob.ec)
4. Perkins BA, Cherney DZI, Partridge H, Soleymanlou N, Tschirhart H, Zinman B, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition and glycemic control in type 1 diabetes: Results of an 8-week open-label proof-of-concept trial. *Diabetes Care*. 2014;37(5):1480–3.
5. Taborsky G.. The Physiology of Glucagon. *J Diabetes Sci Technol* 2010 Nov 1; 4(6):1338–44.
6. Møller N, Otto J, Jørgensen L. Effects of Growth Hormone on Glucose , Lipid , and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocr Rev* 2009 Apr ;30(2):152–77.
7. Quarella M, Walser D, Brändle M, Fournier JY, Bilz S. Rapid Onset of Diabetic Ketoacidosis after SGLT2 inhibition in a patient with unrecognized acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1451–3.
8. Thomas L, Grempler R, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Klein T, et al. Long- term treatment with empagliflozin, a novel, potent and selective SGLT-2 inhibitor, improves glycaemic control and features of metabolic syndrome in diabetic rats. *Diabetes, Obes Metab*. 2011;14(1):94–6.
9. Neumiller JJ. Empagliflozin : a new sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Context*. 2014 Jun 11; 3: 1–15.

10. Komoroski, B. *et al.* Dapagliflozin, a Novel, Selective SGLT2 Inhibitor, Improved Glycemic Control Over 2 Weeks in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009; 85: 513–519.
11. Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest.* 2014; 124(2): 499–508.
12. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med.* 2015; 21(5): 512–7.
13. Henry RR, Rosenstock J, Edelman S, Mudaliar S, Chalamandaris AG, Kasichayanula S, et al. Exploring the potential of the SGLT2 inhibitor dapaglif lozin in type 1 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Diabetes Care.* 2015; 38(3): 412–9.
14. Quarella M, Walser D, Brändle M, Fournier JY, Bilz S. Rapid Onset of Diabetic Ketoacidosis after SGLT2 inhibition in a patient with unrecognized acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102(5): 1451–3.
15. Berneis K, Keller U. Metabolic actions of growth hormone: direct and indirect. *Baillieres Clin Endo Metab* 1996 Jul; 10(3): 337–52.
16. Rosenstock J, Ferrannini E. Euglycemic diabetic ketoacidosis: A predictable, detectable, and preventable safety concern with sgl2 inhibitors. *Diabetes Care.* 2015; 38(9): 1638-1642.
17. Vallon V. The Mechanisms and Therapeutic Potential of SGLT2 Inhibitors in Diabetes Mellitus. *Annu Rev Med. Annual Reviews;* 2015 Jan 14; 66(1): 255–70.
18. Stenlöf K, Cefalu WT, Kim KA, Alba M, Usiskin K, Tong C, et al. Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes, Obes Metab.* 2013; 15(4): 372–82
19. Rosenstock J, Aggarwal N, Polidori D, Zhao Y, Arbit D, Usiskin K, et al. Dose-ranging effects of canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, as add-on to

- metformin in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012; 35: 1232–8.
20. Feingold KR, Grunfeld C. Role of Glucose and Lipids in the Cardiovascular Disease of Patients with Diabetes. 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278947/>
  21. Kalra S, Ghosh S, Aamir A, Ahmed MT, Amin M, Bajaj S, et al. Safe and pragmatic use of sodium–glucose co-transporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: South Asian Federation of Endocrine Societies consensus statement. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017; 21(1): 210.
  22. Neal B, Perkovic V, De Zeeuw D, Mahaffey KW, Fulcher G, Stein P, et al. Rationale, design, and baseline characteristics of the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study (CANVAS) - A randomized placebo-controlled trial. *Am Heart J*. 2013; 166(2): 217–223.

## FIGURES

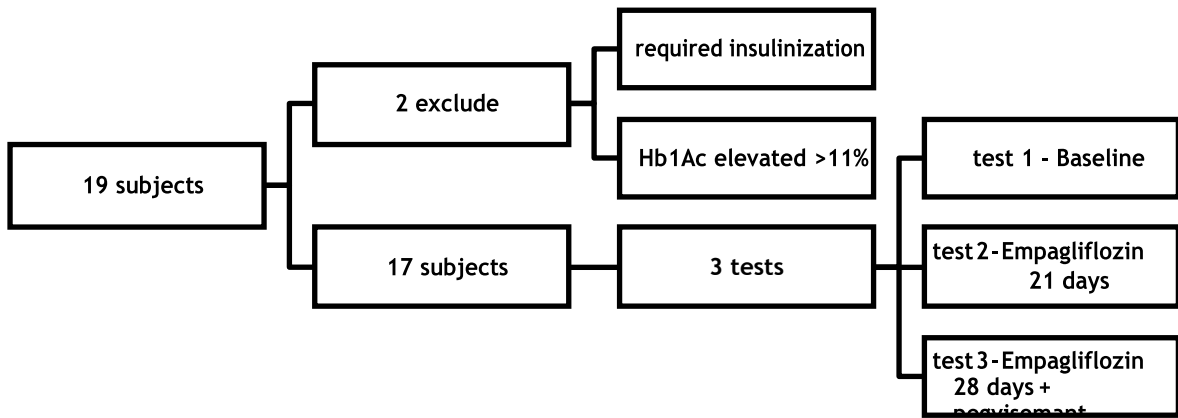


Fig1: Schematic presentation of the study protocol. The 17 subjects underwent three consecutive tests, one on the first day of study, the baseline, one at 21 days of treatment with empagliflozin 25 mg and the last at 28 days of treatment with 25 mg of empagliflozin and subcutaneous administration of pegvisomant 30 mg 36 hours before test.

**Table 1:** Epidemiological data

<b>Clinical data</b>	<b>Values</b>
N (F/M)	17 (12/5)
Age (yr)	55.64 ± 4.54
BMI (kg.m <sup>2</sup> )	30.37 ± 4.93
HbA1c (%)	7.13 ± 1.53
Metformin use (Y/N)	10/7

Data are mean ± SD, N: F:female, M: male; metformin use: Y:yes N: no.

<b>Curve averages 0 – 240min</b>	<b>Test 1</b>	<b>Test 2</b>	<b>Test 3</b>	<b>p-value</b>
<b>Glucose (mg/dl)</b>	159.79 ± 14.82	135.58 ± 14.84 <b>a</b>	132.98 ± 14.82 <b>a</b>	< 0.05
<b>Triglycerides (mg/dl)</b>	200.24 ± 26.44	202.00 ± 26.46	189.29 ± 26.44 <b>b</b>	< 0.05
<b>Total Cholesterol (mg/dl)</b>	206.56 ± 10.19	210.54 ± 10.20	204.07 ± 10.19 <b>b</b>	< 0.05
<b>LDL (mg/dl)</b>	128.70 ± 9.20	133.07 ± 9.21	129.36 ± 9.20	0.1167
<b>HDL (mg/dl)</b>	44.21 ± 2.68	44.59 ± 2.69	43.73 ± 2.68	0.2284
<b>Insulin (mg/dl)</b>	24.59 ± 2.58	19.66 ± 2.62 <b>a</b>	18.86 ± 2.58 <b>a</b>	< 0.05
<b>Glucagon (mg/dl)</b>	179.93 ± 8.32	194.29 ± 8.39 <b>a</b>	199.19 ± 8.39 <b>a</b>	< 0.05
<b>GH (mg/dl)</b>	0.28 ± 0.57	0.28 ± 0.58	11.16 ± 0.57 <b>b</b>	< 0.05
<b>FFA (mg/dl)</b>	0.64 ± 0.06	0.51 ± 0.06 <b>a</b>	0.49 ± 0.06 <b>a</b>	< 0.05
<b>β-hidroxybutirate (mg/dl)</b>	0.16 ± 0.04	0.25 ± 0.04 <b>a</b>	0.22 ± 0.04	< 0.05
<b>IGF-1 (mg/dl)</b>	146.00 ± 8.42	138.00 ± 8,54	126.87 ± 8.42 <b>b</b>	< 0.05
<b>I/G ratio</b>	0.134 ± 0.01	0.105 ± 0.01 <b>a</b>	0.091 ± 0.01 <b>a</b>	< 0.05

**Table 2.** Data are mean ± SD represents curve values of metabolic parameters in the test 1: baseline, test 2:21 days of treatment with empagliflozin 10 mg and test 3: 28 days of treatment with empagliflozin 10 mg and pegvisomant 30 mg 36hours before test 2. p values are from ANOVA + post hoc Tukey. Program R. (a) test 2 or 3 versus test 1 (b) test 3 versus test 2.

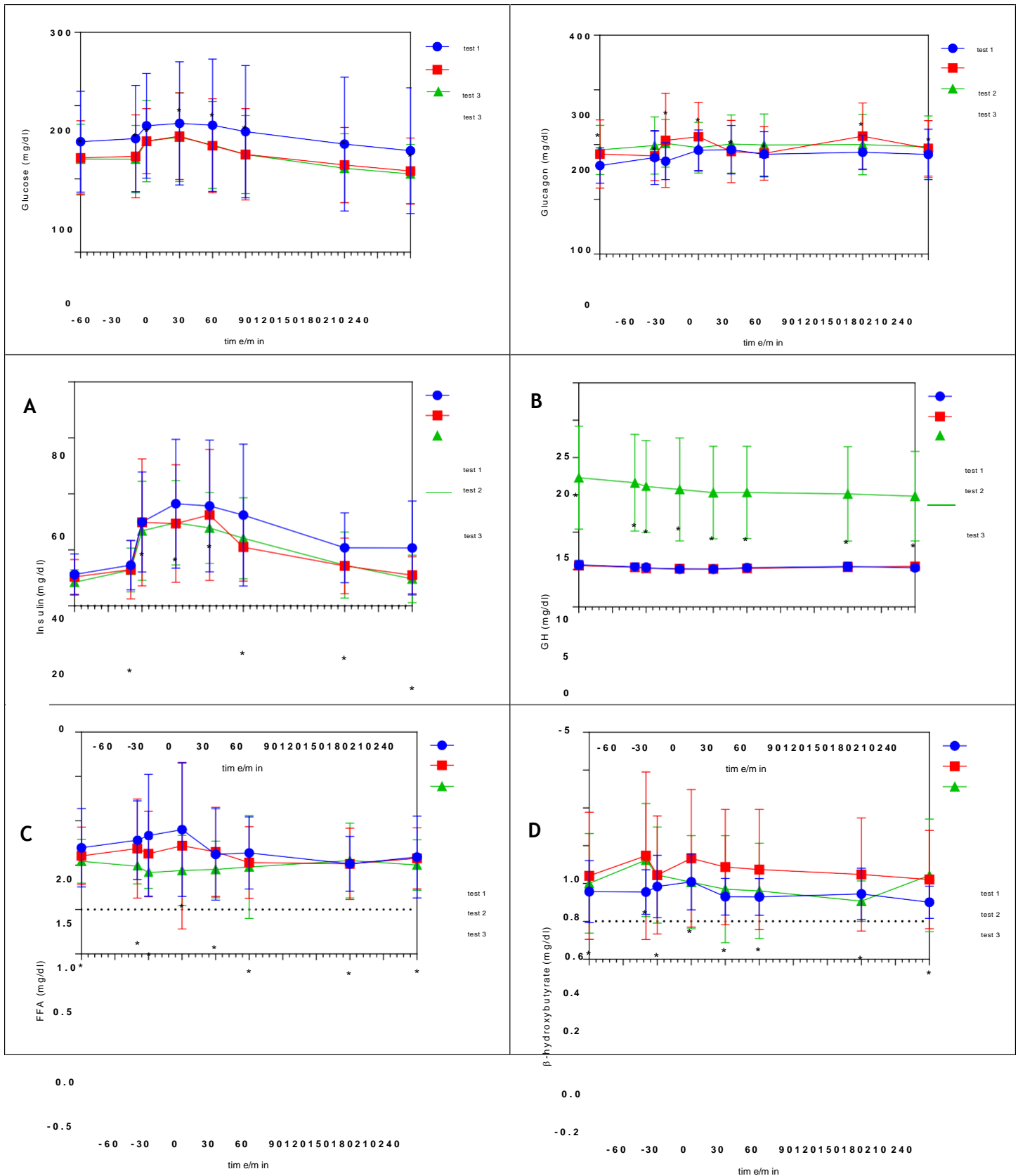


Fig 2. Plasma glucose, glucagon, insulin, GH, FFA and b-hydroxybutyrate levels well as estimated in 17 patients with type 2 DM at baseline, test 1: baseline, test 2: following 21 days of chronic empagliflozin administration and test 3: following 21 days of chronic empagliflozin administration and pegvisomanto 36 hours before test 2 in fasting and after mixed meal ingestion. Plots represent mean  $\pm$  SD. (\*) test 3 versus test 2 ( $p < 0.005$ ).

**REFERÊNCIAS**

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37(1): 81–90.
2. Care D, Suppl SS. Obesity management for the treatment of type 2 diabetes: Standards of medical care in Diabetes 2018. *Diabetes Care*. 2018 Jan; 41(Suppl 1):S65–72.
3. International Diabetes Federation. *Idf Diabetes Atlas*. 2015. 1-527. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html> [https://www.idf.org/sites/default/files/EN\\_6E\\_Atlas\\_Full\\_0.pdf](https://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf) [www.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.ecuadorencifras.gob.ec)
4. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Ver*. 2005 May; 26(2): 19–39.
5. Poretsky L. Principles of diabetes mellitus. *Princ Diabetes Mellitus*. 2010; 1–887.
6. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: AC Farmacêutica, 2017-2018. 3-383. Available from: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>.
7. Feingold KR, Grunfeld C. Role of Glucose and Lipids in the Cardiovascular Disease of Patients with Diabetes. 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278947/>
8. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jan; 6(1):125-138.
9. Mizgier ML, Casas M, Contreras-Ferrat A, Llanos P, Galgani JE. Potential role of skeletal muscle glucose metabolism on the regulation of insulin secretion. *Obes Rev*. 2014;15(7):587–97.
10. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes*. 2002;51(7):2005–2011.
11. Tappy L, Acheson K. Role of substrate competition in the pathogenesis of insulin

- resistance in man. *Eur J Endocrinol*. 1998;138(1):10–5.
12. Taborsky G.. The Physiology of Glucagon. *J Diabetes Sci Technol* 2010 Nov 1; 4(6):1338–44.
  13. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal Á. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: Role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*. 2008;199(1):5–19.
  14. Gaisano HY, MacDonald PE, Vranic M. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol*. 2012 Sep 4 ;3 :1–12.
  15. Unger RH. Glucagon and the Insulin : Glucagon Ratio in Diabetes and Other Catabolic Illnesses. *Diabetes*; 1971 Dec;20(12): 834-838.
  16. Surya SK, Barkan AL. GH Receptor Antagonist: Mechanism of Action and Clinical Utility. *Rev Endo Metab Disord*; 2005 Jan;6(1):5–13.
  17. Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. The intricate role of growth hormone in metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011 Sep 27 ;2 :1–11.
  18. Møller N, Otto J, Jørgensen L. Effects of Growth Hormone on Glucose , Lipid , and Protein Metabolism in Human Subjects. *Endocr Rev* 2009 Apr ;30(2):152–77.
  19. Møller N, Butler PC, Antsiferov MA, Alberti KGMM. *Diabetologia*. *Diabetologia*. 1989;32:105–10.
  20. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15 ;97(12):2859–2865.
  21. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(2):142–8.
  22. Kovacs P, Stumvoll M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 2005 Dec 1; 19(4):625–35.
  23. Nielsen C, Gormsen LC, Jessen N, Pedersen SB, Møller N, Lund S, et al. Growth

- hormone signaling in vivo in human muscle and adipose tissue: impact of insulin, substrate background, and growth hormone receptor blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul; 93(7): 2842–2850.
24. Abdul-Ghani MA, Norton L, DeFronzo RA. Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2011; 32(4): 515–31.
  25. Kanai Y, Lee W, You G, Brown D, Hediger MA. The Human Kidney Low Affinity Na<sup>+</sup>/glucose Cotransporter SGL 2. *J Clin Invest.* 1994 Jan; 93(1): 397–404.
  26. Idris I, Donnelly R. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: An emerging new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes, Obes Metab.* 2009; 11(2): 79–88.
  27. Clar C, Gill JA, Court R, Waugh N. Systematic review of SGLT2 receptor inhibitors in dual or triple therapy in type 2 diabetes. *BMJ Open.* 2012 Oct 18; 2(5).
  28. FDA warns that SGLT2 inhibitors for diabetes may result in a serious condition of too much acid in the blood. 2015 [5/15/2015]; Available from <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM446954.pdf>.
  29. Singh M, Kumar A. Risk Associates with SGLT2 inhibitors: Na Overview. *Curr Durg Saf.* 2018; 13(2): 84-91
  30. Taylor SI, Blau JE, Rother KI. SGLT2 inhibitors may predispose to ketoacidosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):2849–2852.
  31. Vallon V. The Mechanisms and Therapeutic Potential of SGLT2 Inhibitors in Diabetes Mellitus. *Annu Rev Med. Annual Reviews;* 2015 Jan 14; 66(1): 255–70.
  32. Qiu H. Ketosis and diabetic ketoacidosis in response to SGLT2 inhibitors: Basic mechanisms and therapeutic perspectives. 2017 Jul; 33(5): 1–9.
  33. Leiter LA, Yoon K, Arias P, Langslet G, Xie J, Balis DA, et al. Canaglif lozin Provides Durable Glycemic Improvements and Body Weight Reduction Over 104 Weeks Versus Glimperide in Patients With Type 2 Diabetes on Metformin: A Randomized, Double-Blind, Phase 3 Study. *Diabetes Care* 2015 Mar; 38(3): 355–64.

34. Henry RR, Rosenstock J, Edelman S, Mudaliar S, Chalamandaris AG, Kasichayanula S, et al. Exploring the potential of the SGLT2 inhibitor dapaglif lozin in type 1 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Diabetes Care*. 2015; 38(3): 412–9.
35. Neal B, Perkovic V, De Zeeuw D, Mahaffey KW, Fulcher G, Stein P, et al. Rationale, design, and baseline characteristics of the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study (CANVAS) - A randomized placebo-controlled trial. *Am Heart J*; 2013 Aug; 166(2):217–223.
36. Parkinson C, Drake WM, Roberts ME, Meeran K, Besser GM, Trainer PJ. A comparison of the effects of pegvisomant and octreotide on glucose, insulin, gastrin, cholecystokinin, and pancreatic polypeptide responses to oral glucose and a standard mixed meal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(4): 1797–804.
37. Stenlöf K, Cefalu WT, Kim KA, Alba M, Usiskin K, Tong C, et al. Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes, Obes Metab*. 2013; 15(4): 372–82.
38. Kalra S, Ghosh S, Aamir A, Ahmed MT, Amin M, Bajaj S, et al. Safe and pragmatic use of sodium–glucose co-transporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: South Asian Federation of Endocrine Societies consensus statement. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017; 21(1): 210.
39. Quarella M, Walser D, Brändle M, Fournier JY, Bilz S. Rapid Onset of Diabetic Ketoacidosis after SGLT2 inhibition in a patient with unrecognized acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(5): 1451–1453.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A

Hospital Universitário Universidade Estadual de Londrina

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias que também serão assinadas pela pesquisadora. Uma delas é do (a) senhor (a) e a outra é da pesquisadora. O (a) senhor (a) não é obrigado (a) a participar.

**Título do Projeto:** “Avaliação dos efeitos da administração aguda e crônica da empaglifozina sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídios em pacientes portadores de pré-diabetes ou diabetes mellitus tipo 2”.

**Pesquisadora responsável:**

Enfermeira, Doutoranda do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Aline Franco da Rocha; telefone: (43) 96529466; endereço: Rua Sidrack Silva, 116, Jd Aeroporto, CEP: 86.038-560, Londrina/PR.

**Pesquisador colaborador:**

Professor do Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Londrina – UEL: Drº Alexandre J. F. Carrilho.

Esta pesquisa pretende estudar o efeito do uso agudo e crônico da empaglifozina sobre a concentração plasmática dos hormônios que atua sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídios em pacientes portadores de pré-diabetes ou diabetes mellitus tipo 2.

Caso aceite participar, no dia que o (a) senhor (a) estiver em consulta médica no ambulatório do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina -UEL, nós vamos realizar um tratamento complementar ao já realizado de rotina com medicações auxiliares no tratamento do Diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia, neste caso a dapaglifozina, será necessário ingerir as medicações conforme orientado e será realizado duas coletas de sangue com intervalo de 1 meses entre elas. Importante dizer que estas medicações já estão em uso no mercado farmacêutico à tempo e que o propósito do estudo será apenas verificar propriedades farmacológicas adicionais relacionadas à estas para melhora do tratamento. Se o (a) senhor (a) não apresentar as características necessárias, a sua participação será encerrada neste momento.

Sua participação nesta pesquisa não trará gastos financeiros e todas as suas dúvidas sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas a qualquer momento pelas pesquisadoras, nos telefones citados acima. Teremos o compromisso de que o (a) senhor (a) será devidamente orientado (a) com relação ao tema, se isso for do seu interesse.

Não é esperado que o (a) senhor (a) receba benefícios diretos pela participação nesta pesquisa, entretanto, acreditamos com que este estudo contribuiremos para uma melhor avaliação do uso da dapaglifozina sobre a concentração plasmática dos hormônios que atua sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídios em pacientes portadores de pré-diabetes ou diabetes mellitus tipo 2.

Os riscos esperados pela sua participação nesta pesquisa são mínimos e podem estar relacionados com a possibilidade do (a) senhor (a) apresentar efeitos colaterais esperados no uso de tais medicações e já indicados na bula da dapaglofozina: como dor de cabeça, pressão baixa, infecção urinária e aumento da quantidade de urina. Além disso, garantimos que o (a) senhor (a) terá total liberdade para aceitar ou não participar desta pesquisa e de deixar de participar a qualquer momento sem precisar se justificar, retirando seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem ser prejudicado (a) no seu atendimento no Hospital das Clínicas e nem nenhuma outra forma de prejuízo.

Os resultados do estudo serão utilizados para fins científicos e serão divulgados em eventos, revistas e meios de comunicação, no entanto, o (a) senhor (a) terá a segurança de não ser identificado(a) em nenhum momento e de que será mantido o caráter confidencial de todas as informações relacionadas à sua privacidade.

Comprometemo-nos a prestar-lhe informação atualizada durante o estudo, mesmo que isso possa afetar sua vontade de continuar participando da pesquisa.

Se o (a) senhor (a) se sentir prejudicado por ter participado desta pesquisa, o (a) senhor (a) poderá buscar indenização de acordo com as leis vigentes no Brasil.

Em caso de dúvidas éticas, o (a) senhor (a) pode procurar a pesquisadora responsável, Aline Franco da Rocha, Rua Sidrack Silva, 116, CEP:86038-560, Londrina/PR, telefone 9652-9466, e-mail: [liny.afr@hotmail.com](mailto:liny.afr@hotmail.com) ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455 ou por e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

Pesquisador Responsável

RG:: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

## **ANEXOS**

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
DIRETORIA SUPERINTENDENTE  
**PARECER Nº153**  
**PROCESSO 3036.2016.22**

À Pesquisadora  
Aline Franco da Rocha

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DA DAPAGLIFOZINA SOBRE O METABOLISMO DOS CARBOHIDRATOS E LIPÍDIOS EM PACIENTES PORTADORES DE PRÉ-DIABETES OU DIABETES MELLITUS TIPO 2", apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo.

Informamos que o nosso **parecer é favorável** à realização do projeto acima nominado, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.

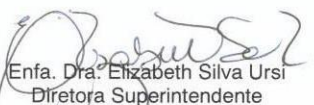
Atendendo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL (CEP/UEL) para posterior operacionalização.

Conforme **Ofício Circular da Diretoria Superintendente do HU nº 214/2015**, a cópia do parecer de aprovação do CEP/UEL deverá ser apresentado à Chefia e/ou Gerente das unidades envolvidas antes do início da coleta de dados.

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria, para ciência e divulgação.

Em 16/03/2016

  
Enfa. Dra. Elizabeth Silva Ursi  
Diretora Superintendente

Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa Científica (CAPEC) do HU  
Fone: (43) 3371-2301  
e-mail: pesquisahu@uel.br

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380-Fone (43) 3371-4000-PABX - Fax 328-4440 - Caixa Postal 6001 - CEP 86051-990 - www.uel.br  
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 -V.Operária - Fone (43) 3371-2000 PABX- Fax 3337-7495-CEP 86038-440- www.hu.uel.br

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos efeitos da administração aguda e crônica da dapaglifozina sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídios em pacientes portadores de pré-diabetes ou diabetes mellitus tipo 2.

**Pesquisador:** Aline Franco da Rocha

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 54364615.4.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.896.004

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de intervenção que será executado no Ambulatório do HC. Serão selecionados 15 pacientes com pré-diabetes ou diabetes mellitus tipo 2, com idade > 18 anos, índice de massa corpórea entre 25 e 40 kg/m<sup>2</sup> e HbA1c > 5,7 e < 11%. Os critérios de exclusão são: 1- uso de insulina ou outro antidiabético oral, exceto metformina; 2- presença de microalbuminúria ou doença renal crônica; 3- gestação; 4- cirurgia bariátrica prévia; 5- doença hepática ou cardíaca que tenha repercussão sobre o controle glicêmico; 6- disfunção tireoidiana não controlada. Estes pacientes serão submetidos a 3 testes: Teste 1- Após jejum de 10 horas, com os pacientes em repouso, será estabelecido acesso venoso periférico para coleta de amostras sanguíneas seqüenciais. Serão coletados aproximadamente 10 ml de sangue nos tempos -60, 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 minutos. Ao início do teste, os pacientes receberão uma dose de placebo (1 cp via oral, ingerido com água) no tempo -60, imediatamente após a primeira coleta. Após a coleta no tempo 0, todos os pacientes receberão uma refeição padrão a ser ingerida em 10 minutos, composta por 1 ovo cozido, 50 g de queijo parmesão e 125 g de pão branco (francês), que corresponde a 710 kcal (58% de carboidrato, 24% de gordura e 18% de proteína). Ao final da coleta no último

tempo (240 min), os pacientes receberão 28 comprimidos de dapaglifozina 10 mg, com orientação para uso de 1 cp ao dia, pela manhã. Teste 2- Aproximadamente 21 dias após o teste 1, o mesmo procedimento será repetido, tendo como única diferença a ingestão de dapaglifozina 10 mg no tempo -60, em substituição ao placebo.

Teste 3- Aproximadamente 28 dias após o teste 1, o procedimento semelhante ao teste 2 será repetido, sendo precedido pelo uso subcutâneo de somavert 30 mg, administrado 36 horas antes da realização do teste.

### **Objetivo da Pesquisa:**

#### Objetivo Primário

Avaliar o efeito da administração aguda e crônica da dapaglifozina sobre a concentração plasmática dos hormônios que atuam sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídios em pacientes portadores de pré-diabetes ou diabetes mellitus tipo 2.

#### Objetivo Secundário:

Avaliar as alterações nas dosagens de insulina, glicose, glucagon, triglicerídeos, colesterol total e frações, GH, ácidos graxos livres, betahidroxibutirato e somatomedina C.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Com relação aos riscos, a pesquisadora relata que: "Como o fármaco em teste já está em uso no mercado os riscos do uso são somente os efeitos colaterais já listados em bula, na fase de entrega do medicamento os sujeitos da pesquisa serão prontamente orientados sobre estes possíveis efeitos. Caso surgimento de efeitos colaterais os participantes da pesquisa serão prontamente atendidos pelo pesquisador responsável e orientador, enfermeiro e endocrinologista."

Com relação aos benefícios: Acrescentar uma nova medicação ao esquema terapêutico e avaliar a resposta a curto prazo.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante, uma vez que pretende investigar os efeitos da dapaglifozina no metabolismo intermediário podendo auxiliar no melhor controle do pre-diabetes ou diabetes tipo

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto preenchida e assinada adequadamente. Apresentou autorização do HU para coleta de dados. Apresentou TCLE em acordo com a resolução. Cronograma alterado com previsão para início em 02/02/2017, orçamento de R\$ 1.478,00 com financiamento do programa de pós-graduação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomenda-se aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:****Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_604059.pdf	20/12/2016 09:50:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	20/12/2016 09:47:31	Aline Franco da Rocha	Aceito
Outros	autorizacaohu.pdf	17/03/2016 12:06:14	Aline Franco da Rocha	Aceito
Outros	termosigiloeconfidencialidade.pdf	17/03/2016 12:03:18	Aline Franco da Rocha	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto2016.pdf	17/03/2016 12:02:05	Aline Franco da Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProtocoloSGTL2DM2.docx	06/10/2015 12:27:26	Aline Franco da Rocha	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 23 de Janeiro de 2017

---

Assinado  
por: Rosana Lopes  
(Coordenador)