

EFEITOS DA SITAGLIPTINA NA FUNÇÃO DE LINFÓCITOS DE PACIENTES DIABÉTICOS: AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E PERFIL DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.

Caroline Lais Stoppa (Bolsista FUNADESP/UNIAN-SP), e-mail: clscls09@gmail.com.
Marcelo Maia Pinheiro (Colaboradora), e-mail: drmarcelomaia@gmail.com, Susana Nogueira Diniz (Orientadora), e-mail: dinizsunana@gmail.com.

Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN) | Farmácia

Área: Imunologia – Subárea: Biologia Molecular

Introdução

A diabetes do tipo 1 (DM1) é uma doença crônica caracterizada pela destruição autoimune das células beta pancreáticas através da lesão celular por ativação dos linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, os quais interagem na geração da resposta imunológica, causando uma insulite com predominância de linfócitos T CD8+ (LIMA-MARTINEZ *et al.*, 2014).

Atualmente um dos principais objetivos no tratamento do diabetes mellitus seria preservar/regenerar a massa de células beta pancreáticas, seja através da terapia medicamentosa/insulínica intensiva, seja por terapias que regulem o sistema imune diminuindo assim a sua resposta inflamatória, a apoptose celular e ao mesmo tempo aumentando a regeneração e função das células beta (BONORA, 2008; SUEN; BURN, 2012; WAJCHENBERG, 2007). Em outubro de 2006 a Food and Drug Administration - FDA aprovou uma nova classe de medicamentos antidiabéticos para melhorar o controle glicêmico de doentes com DM tipo 2, os inibidores de DPP-4 (ROCHA; CARVALHO, 2009).

A DPP-4 também é conhecida como um antígeno de superfície celular CD26 (DPP-4/CD26) onde é expressa em linfócitos T, B, macrófagos e células natural killer (SUEN; BURN, 2012). Ao ser inibida acontece a supressão da proliferação celular das células T e da produção de citocinas inflamatórias do tipo TH1, pelo aumento da secreção de TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) resultando na modulação da resposta imune. O TGF- β 1 tem como função a melhora da diabetes mellitus autoimune, pela regulação da via de expansão das células T regulatórias CD4+CD25+ expressas por FOXP3 (TIAN *et al.*, 2011). A sitagliptina foi o primeiro inibidor de DPP-4 a ser comercializado para o tratamento das diabetes do tipo 2 tem como função aumentar de 2 a 3 vezes os níveis de GLP-1 e GIP (TAGLIAPIETRA, 2010).

Desta forma a hipótese deste estudo é buscar a possibilidade de modular a resposta autoimune de pacientes diabéticos tipo 1 recém diagnosticados através do bloqueio da DPP4/CD26 dos linfócitos pela ativação das células T regulatórias CD4+CD25+FoxP3+, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias Th1 e aumento da TGF- β , através do bloqueio da DPP-4/CD26 dos linfócitos pela sitagliptina.

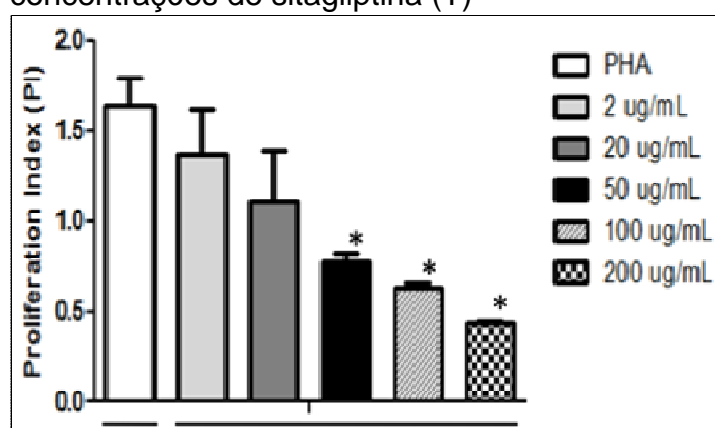
Material e Métodos

Os doadores voluntários foram submetidos a coleta de 30 mL de sangue periférico para realização da cultura de linfócitos. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ MS (parecer Nº 496.061 CEP-UNAIN). As células mononucleares foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll–Hypaque, e cultivadas em placas de 96 poços com RPMI, HEPES 2,9 g/L e Garamicina 30mg/mL, com 10% de soro fetal bovino inativado. As culturas foram divididas em 3 grupos: células controle não tratadas e não estimuladas com PHA, células estimuladas com PHA e células estimuladas com PHA e tratadas com sitagliptina. A proliferação celular foi avaliada pelo método do MTT que utiliza tetrazoliumbio-reduzido pelas células gerando um produto colorido chamado de formazona. A absorbância foi medida a 540nm no aparelho de ELISA. A produção da citocina TGF- β 1 foi medida no sobrenadante de cultura após 120 horas, por ELISA (TGF- β 1 humano Quantikine®ELISA Kit R&DSystems®), de acordo com os protocolos do fabricante. Para análise estatística utilizamos o test t de Student pareado com two-tailed, oneway Anova e o teste não paramétricos de Mann-Whitney. Os dados foram apresentados como média \pm DP e consideramos um nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento de PBMC de doadores humanos com sitagliptina nas doses de 2 (IP= $1,36 \pm 0,43$) e 20 $\mu\text{g/ml}$ (IP = $1,11 \pm 0,47$) não apresentou efeito na proliferação destas células. Somente doses iguais ou maiores que 50 $\mu\text{g/ml}$ de sitagliptina (100 $\mu\text{g/ml}$ IP = $0,55 \pm 0,03$; 200 $\mu\text{g/ml}$ IP = $0,52 \pm 0,02$) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao controle somente estimulado com PHA ($3320,42 \pm 1137,58$).

Figura 1: Índice de proliferação celular de culturas de PBMC tratadas com diferentes concentrações de sitagliptina (T)



PBMC) foram cultivadas na ausência (controle) e na presença de PHA e tratadas com sitagliptina nas concentrações de 2 a 200 $\mu\text{g/ml}$ por 120h. A proliferação celular foi avaliada e os resultados foram expressos como índice de proliferação (IP)

* = diferença significativa $p < 0,05$, ANOVA.

Fonte: Dados de pesquisa.

A análise dos níveis de TGF- β foi realizada pelo cálculo da razão entre os níveis desta citocina com o índice de proliferação, que indica de maneira indireta o número de células viáveis no meio de cultura, pois o aumento de TGF- β 1 estaria relacionada a inibição da proliferação de PBMC em estudos com inibidores da DPP-4. Os resultados mostraram um aumento estatisticamente significativo da relação dos níveis de TGF- β 1 versus Índice de Proliferação (IP) celular no grupo tratado com sitagliptina ($2627,97 \pm 1351,65$) quando comparado ao grupo estimulado com PHA sem tratamento com sitagliptina ($646,28 \pm 376,94$) indicando maior produção de TGF- β 1 por quantidade de célula viável no meio de cultura.

Quadro 1: Razão entre níveis de TGF- β 1/IP em culturas de PBMC estimuladas com PHA sem e com tratamento com sitagliptina 50 μ g/mL

	TGF- β 1(pg/ml)/IP	TGF- β 1(pg/ml)/IP ²	
Doadores	PHA	PHA+ Sita 50 μ g/mL	p
D4	898,06	4.302,2	0,0002
D5	1.174,31	3.939,07	0,0002
D6	528,01	2.103,8	0,0004
D7	797,31	2.964,22	0,0003
D8	265,57	1.624,09	0,0005
D9	214,45	834,32	0,0010

Os valores expressam o resultado da razão entre a média dos níveis de TGF- β 1/Índice de Proliferação (IP) em culturas de PBMC dos doadores D4-D9, estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), sem e com tratamento com sitagliptina 50 μ g/ml no final de 96 h. As medidas de TGF- β 1 foram realizadas em duplicata e expressos em pg/ml, e o IP em triplicata.

Fonte: Dados de pesquisa.

Conclusão

Os dados apresentados mostram que a sitagliptina pode regular a ativação da resposta imunológica em linfócitos humanos em doses acima de 50 μ g/mL, podendo indicar um possível uso terapêutico da sitagliptina como imunossupressor em doenças autoimune, como o DM1.

Agradecimentos

A FUNADESP e a Pos-Graduação da UNIAN

Referências

BONORA, E. Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible? *Nut. Metabol. Cardiovascular Dis.*, v.18, n.1, p.74-83, 2008.

LIMA-MARTINEZ, M. *et al.* One year remission of type 1 diabetes mellitus in a patient treated with sitagliptin. *Endocrinol. Diabetes Metabol. Case Reports.* 2014.

ROCHA, H.; CARVALHO, R. *O papel das incretinas no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2.* 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade do Porto. 2009.

SUEN, C.S.; BURN, P. The potential of incretin-based therapies in type 1 diabetes. *Drugdiscoverytoday*, v.17, n.1, p.89-95, 2012.

TAGLIAPIETRA, J.I. *Efeito da Sitagliptina nos potenciais evocados (somato-sensitivo e visual) e no controle metabólico do diabetes mellitus do tipo 2*. 2010. 263 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

TIAN, L. *et al.* Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinol.*, v.151, n.7, p.3049-3060, 2011.

WAJCHENBERG, B.L. β -cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocrine Rev.*, v.28, n.2, p.187-218, 2007.