



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto do Coração Edson Saad
Programa de Pós-Graduação em Cardiologia
Laboratório de Farmacologia Cardiovascular



**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM NOVO PROTÓTIPO
NAS COMPLICAÇÕES CARDIORENAIS EM MODELO ANIMAL DE
DIABETES TIPO 2**

Bryelle Eccard de Oliveira Alves

Tese de doutorado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Lídia Moreira Lima

Rio de Janeiro, RJ

Dezembro de 2018

Bryelle Eccard de Oliveira Alves

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM NOVO PROTÓTIPO NAS
COMPLICAÇÕES CARDIORENAIS EM MODELO ANIMAL DE DIABETES
TIPO 2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutora em Cardiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Lídia Moreira Lima

Rio de Janeiro, RJ

Dezembro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Bryelle Eccard de Oliveira

Avaliação farmacológica de um novo protótipo nas complicações cardiorenais em modelo animal de diabetes tipo 2 / Bryelle Eccard de Oliveira Alves. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2019.

132 f.: il; 31 cm.

Orientadores: Profa. Dra. Gisele Zapata-Sudo e Profa. Dra. Lídia Moreira Lima.

Tese (Cardiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Cardiologia, 2019.

Referências bibliográficas: f.85-95

1. Diabetes Mellitus Tipo 2. 2. Inibidores da Dipeptidil Peptidase IV. 3. Anti-Inflamatórios. 4. Doenças Cardiovasculares. 5. Nefropatias. 6. Ações Farmacológicas. 7. Ratos Wistar. 8. Experimentação Animal. 9. Cardiologia – Tese. I. Zapata-Sudo, Gisele. II. Lima, Lídia Moreira. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Cardiologia. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Sempre, primeiro Deus, a Ele toda glória e honra!!!

E então, ninguém se faz sozinho! Aos meus pais, eternos incentivadores e minha base, não tenho palavras para agradecer por ser quem são. Mais uma vez deixaram de viverem suas vidas para viverem junto comigo, mais uma vez. Ao meu esposo, por todo incentivo e paciência, por ser fazer um pai ainda mais presente nos momentos que precisei me ausentar, por isso e muito mais te amo! Aos meus filhos, ao mesmo tempo que pensava em desistir por causa deles, por eles encontrava forças para continuar, concluir e poder ser exemplo. Que Deus possa me dar sabedoria para conduzi-los e que no futuro sejam profissionais melhores que mamãe e papai!

Minha tia Déa e meu primo Ge por ter me recebido em sua casa, pelo carinho de sempre e foram parte importante para essa jornada se concretizar. Ao meu irmão, por ter deixado de morar sozinho e dividir comigo um teto novamente, sei o quanto abriu mão de si por mim, por isso muito obrigada! Mais que um conforto físico, era um conforto para meu coração, porque apesar de passar dias longe de meus filhos e marido, ainda assim estava com a minha FAMÍLIA!

A minha orientadora, por ter confiado este projeto a mim, mesmo com minhas limitações. Ao professor Takashi por suas orientações. A minha co-orientadora Lídia e ao aluno Eduardo, pelo suporte e cederem a substância utilizada no presente trabalho. Agradeço também aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, INCT-INOVAR, FAPERJ. Aos colegas do laboratório, cada um teve uma parte muito importante no meu aprendizado, cada um que passou ou estiveram até o fim, levo com muito carinho as lembranças e de uma certa forma deixaram uma centelha em mim. Mas não poderia deixar de ressaltar as LYNDAS! Amigas, Gizele e Anansa, obrigada por cada dia vivido com vocês, cada almoço, risada, desabafo, japonês, mexicano, Que a nossa amizade ultrapasse esta etapa concluída e se perdure para a vida, estarei aqui para o que der e vier! Espero vocês em Pádua!



“Estamos indo de volta pra casa!”

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

-Fernando Pessoa

RESUMO

Eccard Oliveira Alves Bryelle. "Avaliação farmacológica de novos protótipos nas complicações cardiorenais em modelo animal de diabetes tipo 2". Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Cardiologia). Faculdade de Medicina e Instituto do Coração Edson Saad da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução: Diabetes tipo 2 (DM2) é responsável por 85 a 90% dos casos de diabetes. Pacientes com DM2 que apresentam comprometimento renal têm um risco aumentado de mortalidade, especialmente consequente a doença cardiovascular (CV). O presente trabalho investigou o perfil farmacológico de um novo inibidor da enzima dipeptidil dipeptidase 4 (DPP4) que também produz atividade anti-inflamatória em ratos com disfunção cardíaca e renal induzida por diabetes. **Métodos:** O DM2 foi induzido em ratos Wistar machos após 2 semanas recebendo dieta rica em gordura [HFD (%) - 45 gordura, 35 carboidratos e 20 proteínas] seguida de injeção intravenosa de estreptozotocina (35 mg/kg). O grupo não diabético recebeu dieta regular [(%) 10 gorduras, 70 carboidratos e 20 proteínas] e injeção de veículo (tampão tribásico de citrato de sódio a 3%). Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (6 animais cada): normal + veículo, DM2 + veículo, DM2 + LASSBio-1772 (22,6 $\mu\text{mol/kg}$), DM2 + sitagliptina (22,6 $\mu\text{mol/kg}$) e DM2 + LASSBio-2124 (22,6 $\mu\text{mol/kg}$). Em todos os grupos experimentais, os seguintes parâmetros foram determinados: glicose plasmática, colesterol e triglicérides antes e após o tratamento com o veículo ou novo inibidor da DPP4. A resistência à insulina foi avaliada usando o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e a medida do nível sérico de insulina. A estrutura e a função renal foram avaliadas através da determinação do fluxo urinário, proteinúria e avaliação histológica dos tecidos glomerulares corticais e do epitélio tubular. O eletrocardiograma (ECG) foi registrado com o posicionamento de eletrodos na superfície do corporal dos animais. Parâmetros hemodinâmicos tais como frequência cardíaca, pressão arterial e pressão ventricular esquerda foram obtidos nos diferentes grupos experimentais. A reatividade vascular foi observada após a exposição dos anéis de aorta a concentrações crescentes de fenilefrina seguida de exposição a acetilcolina. Para análise histológica, os ápices cardíacos foram fixados em formalina de zinco e embebidos em parafina, para análise da presença de colágeno do ventrículo esquerdo. **Resultados:** O nível de glicose (mg/dL) foi aumentado de $100,8 \pm 3,14$ para $423,5 \pm 8,1$ enquanto a sitagliptina e LASSBio-2124 reduziram para $319,8 \pm 13,2$ e $279,7 \pm 17,8$, respectivamente. Com o tratamento LASSBio-1772 foi para $300,0 \pm 17,8$. Todas as substâncias reduziram o perfil lipídico dos animais diabéticos, em destaque o LASSBio-2124 que reduziu os níveis de colesterol e triglicérides (mg/dL) de $76,8 \pm 8,0$ para $42,7 \pm 3,2$ e de $229,7 \pm 25,4$ para $100,7 \pm 17,1$, respectivamente. No TOTG os grupos tratados com LASSBio-1772, sitagliptina e LASSBio-2124 apresentaram glicemia normal após 2 horas da ingestão de glicose. Níveis de insulina plasmática (pmol/L) diminuíram em animais diabéticos de $102,5 \pm 3,6$ para $36,5 \pm 0,6$ mas sitagliptina e LASSBio-2124 aumentaram para $71,2 \pm 8,7$ e $57,1 \pm 9,1$, respectivamente. Animais diabéticos apresentaram aumento do fluxo urinário de $9,0 \pm 0,1$ para $90,0 \pm 3,0$ (uL/min). O tratamento com LASSBio-2124 reduziu para $70,0 \pm 5,0$ (uL/min). A proteinúria (mg/24 h) diminuiu de $23,7 \pm 1,5$ (mg/24 h, nos animais diabéticos)

para $13,3 \pm 2,8$ com LASSBio-2124. LASSBio-2124 diminuiu o intervalo QTc, um marcador arritmogênico. Tanto a pressão sistólica como a diastólica final de VE aumentaram no grupo diabético e foram normalizadas após tratamento com sitagliptina e LASSBio-2124. LASSBio-2124 normalizou o relaxamento vascular induzido por acetilcolina sugerindo recuperação da lesão endotelial. Aumento no depósito de colágeno intersticial foi observado no VE de animais diabéticos quando comparado aos controles ($P < 0,05$) que foi reduzido após tratamento. Maior expressão de TNF- α e RAGE foi detectada em corações do grupo DM2 e recuperada com LASSBio-1772, sitagliptina e LASSBio-2124. **Conclusão:** O LASSBio-2124 além de apresentar efeito hipoglicemiante superior à sitagliptina; produziu reversão da disfunção cardiorenal. Este novo iDPP4 mostrou-se promissor como uma alternativa para o tratamento do DM2, bem como para retardar o surgimento de comorbidades através de possível ação cardioprotetora.

Palavras-chave: diabetes tipo 2, inibidor da Dipeptidil Peptidase 4, anti-inflamatório, cardiovascular, cardiorenal

ABSTRACT

Eccard Oliveira Alves Bryelle. "Pharmacological evaluation of new prototypes in cardiorenal complications in an animal model of type 2 diabetes". Rio de Janeiro, 2018. Thesis (Doctorate degree in Cardiology). Faculty of Medicine and Edson Saad Heart Institute from Federal University of Rio de Janeiro.

Introduction: Diabetes mellitus and type 2 (DM2) is responsible for 85 to 90% of cases. Patients with DM2 with renal impairment have an increased risk of mortality, especially caused by cardiovascular disease (CD). The present work investigated the pharmacological profile of a new inhibitor of the enzyme dipeptidil dipeptidase 4 (DPP4) with additional anti-inflammatory activity in rats with cardiac and renal dysfunction induced by diabetes. **Methods:** DM2 was induced in male Wistar rats after 2 weeks receiving high fat diet [HFD (%) - 45 fat, 35 carbohydrate and 20 protein] followed by intravenous injection of streptozotocin (35 mg/kg). Non-diabetic group received regular diet [(%)10 fat, 70 carbohydrate and 20 protein] and injection of vehicle (tribasic sodium citrate buffer 3%). Animals were randomly distributed in 5 groups (6 animals each): non-diabetic, DM2 + vehicle, DM2 + LASSBio-1772 (22.6 $\mu\text{mol/kg}$), DM2 + sitagliptin (22.6 $\mu\text{mol/kg}$), DM2 + compound (22.6 $\mu\text{mol/kg}$). In all experimental groups, the following parameters were determined: plasmatic glucose, cholesterol and triglyceride before and after treatment with either the vehicle or new inhibitor of DPP4. The insulin resistance was evaluated using the oral glucose tolerance test (OGTT) and the measurement of serum insulin level. Kidney structure and function were analyzed: urinary flow and proteinuria were determined; histological evaluation of cortical glomerular tissues and tubular epithelium were also observed. The electrocardiogram (ECG) was obtained by placing electrodes on the animal's body surface. At the end of the treatment, invasive measurements of the heart rate, blood pressure and left ventricular pressure were recorded. Vascular reactivity was investigated in aortic rings after exposure of increasing concentration of phenylephrine followed by acetylcholine. For histological analysis hearts were fixed in zinc formalin and embedded in paraffin to detect left ventricular collagen deposition. Protein expression of hearts from different groups were analyzed using western blot analysis. **Results:** Glycose level (mg/dL) was increased from 100.8 ± 3.1 to 423.5 ± 8.1 and sitagliptin reduced to 319.8 ± 13.2 and the LASSBio-2124 279.7 ± 17.8 . With LASSBio-1772 treatment it was 300.0 ± 17.8 . All of the substances reduced the lipid profile of diabetic animals, especially LASSBio-2124, which reduced cholesterol and triglyceride levels (mg / dL) from 76.8 ± 8.0 to 42.7 ± 3.2 and $229, 7 \pm 25.4$ for 100.7 ± 17.1 , respectively. At the end of OGTT, LASSBio-1772, sitagliptin and compound induced the return of glycemia to control value. Levels of plasmatic insulin (pmol/L) decreased in diabetic animals from 102.5 ± 3.6 to 36.5 ± 0.6 and increased to 71.2 ± 8.7 and 57.1 ± 9.1 after treatment with sitagliptin and LASSBio-2124. Diabetic animals showed an increase of urinary flow from 9.0 ± 0.1 to 90.0 ± 0.3 (uL/min) but the treatment with LASSBio-2124 reduced to 70.0 ± 5.0 (uL/min). Proteinuria (mg/24 h) has decreased to 23.7 ± 1.5 from 13.3 ± 2.8 with LASSBio-2124. LASSBio-2124 decreases the QTc interval, which is a predictor of increased

incidence of arrhythmias. The final systolic and diastolic VE pressure were increased in diabetic animals and both parameters were recovered by sitagliptin and LASSBio-2124. The compound improved acetylcholine-induced relaxation of vascular tissue indicating recovery of endothelium dysfunction. An increase in interstitial collagen was found in the LV free wall of diabetic animals when compared to controls ($P < 0.05$) which was reverted with treatment. Increased expression of TNF- α and RAGE observed in hearts from DM2 was reduced by LASSBio-1772, sitagliptin and LASSBio-2124. **Conclusion:** LASSBio-2124 showed anti-hyperglycemic effect superior to sitagliptin and decreased the cardiorenal dysfunction. This new iDPP4 could be an alternative of treatment of DM2, as well as to prevent comorbidities through possible cardioprotective action.

Keywords: type 2 diabetes, Dipeptidil Peptidase 4 inhibitor, anti-inflammatory, cardiovascular, cardiorenal

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	3
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	16
1 INTRODUÇÃO	21
2 JUSTIFICATIVA.....	45
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral.....	46
4 METODOLOGIA.....	47
4.1 Local da pesquisa.....	47
4.2 Comitê de ética.....	47
4.3 Animais e desenho experimental.....	47
4.4 Análise do distúrbio metabólico.....	47
4.5 Avaliação da função renal.....	50
4.6 Avaliação da função cardiovascular	50
4.7 Reatividade vascular	51
4.8 Análise histopatológica do coração e rim	52
4.9 Imunohistoquímica	53
4.10 Expressão de proteínas em tecido cardíaco	53
4.11 Análise estatística	54

5 RESULTADOS	56
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	83
8 REFERÊNCIAS.....	85
9 ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ações da insulina nas principais tecidos sensíveis à insulina	23
Figura 2. Sinalização da insulina na homeostase	24
Figura 3. Sinalização da insulina no diabetes	28
Figura 4. Efeitos vasculares da insulina	29
Figura 5. Análise do perfil glicêmico em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.....	38
Figura 6. Ensaio de peritonite induzida por carragenina 1%.....	38
Figura 7. Dosagem de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos.....	39
Figura 8. Planejamento estrutural dos novos protótipos LASSBio e série congênere.....	40
Figura 9. DPP (IV) Inibitor Screening Assay kit e curva resposta do padrão Sitagliptina.....	41
Figura 10. Curva resposta dos compostos DiF, DiCl e DiMeO.....	42
Figura 11. Delineamento experimental.....	49
Figura 12. Efeito de LASSBio-1772 no distúrbio metabólico	58
Figura 13. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina no distúrbio metabólico	59
Figura 14. Efeito de LASSBio-1772 na função renal de animais diabéticos.....	60
Figura 15. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina na função renal de animais diabéticos	61
Figura 16. Aumento dos rins induzido pelo DM2.....	62
Figura 17. Efeito de LASSBio-2124 na intolerância ao exercício induzido pelo DM2.....	63
Figura 18. Efeito de LASSBio-1772 na pressão arterial de animais diabéticos.....	64

Figura 19. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina na pressão arterial de animais diabéticos	64
Figura 20. Parâmetros do eletrocardiograma em animais diabéticos tratados com LASSBio-1772.....	65
Figura 21. Parâmetros do eletrocardiograma em animais diabéticos tratados com LASSBio-2124 e sitagliptina.....	66
Figura 22. Função cardíaca medida em animais diabéticos tratados com LASSBio-1772.....	67
Figura 23. Função cardíaca medida em animais diabéticos tratados com LASSBio.....	68
Figura 24. Reatividade vascular da aorta.....	69
Figura 25. Deposição de colágeno em coração de animais diabéticos.....	71
Figura 26. Expressão de p38-alfa em coração do grupo DM2	72
Figura 27. Relação peso coração/tíbia.....	73
Figura 28. Efeito de LASSBio-1772 na expressão de proteínas cardíacas.....	74
Figura 29. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina na expressão de proteínas cardíacas.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta hipercalórica.....48

Tabela 2. Determinação do relaxamento máximo e da concentração eficaz média (CE50) induzido pela Ach em anéis de aorta.....70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	Associação americana de diabetes, do inglês <i>american diabetes association</i>
AGE	Produtos de glicação avançada, do inglês <i>advanced glycation end products</i>
Akt	Proteína quinase B, do inglês <i>protein kinase B</i>
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina, do inglês <i>adenosine monophosphate cyclic</i>
AP-1	Proteína ativadora 1, do inglês <i>activating protein -1</i>
BCL2	Célula-b de linfoma 2, do inglês <i>b-cell lymphoma 2</i>
CaMKII	Calmodulina-dependente quinase II, do inglês <i>calmodulin-dependent protein kinase</i>
CE50	Concentração eficaz média
COX-2	Ciclo-oxigenase 2, do inglês <i>cycle-oxigenase 2</i>
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo, do inglês <i>connective tissue growth factor</i>
DPP4	Dipeptidil peptidase 4, do inglês <i>dipeptidyl peptidases 4</i>
eNOS	Óxido nítrico endotelial sintase, do inglês <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ECG	Eletrocardiografia
ERK	Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares, do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i>

EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
FFA	Ácidos graxos livre, do inglês <i>free fatty acids</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFAT	Glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase, do inglês <i>glutamine fructose-6-phosphate amiditransferase</i>
GIP	Polipéptido insulíntrópico dependente da glicose, do inglês <i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon-1, do inglês <i>glucagon-like peptide-1</i>
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina, do inglês <i>guanosine monophosphate cyclic</i>
GSH	Glutationa, do inglês <i>glutathione</i>
HFD	Dieta hipercalórica, do inglês <i>high fat diet</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1, do inglês <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IDF	Fundação internacional de diabetes, do inglês <i>international diabetes foundation</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IKK	I κ B quinase, do inglês <i>IκB kinase</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β eta
IL-6	Interleucina 6
IRS	Substratos do receptor da insulina, do inglês <i>insulin receptor substrate</i>

JNK	Proteína quinase c jun NH2 terminal, do inglês <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LASSBio	Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito-1, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>
NADPH	Ácido nítrico adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês <i>nitric acid adenine dinucleotide phosphate</i>
ND	Nefropatia diabética
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas, do inglês <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-kB	Fator nuclear kappa b
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
ox-LDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta

PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase, do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	Proteína quinase C, do inglês <i>protein kinase C</i>
PKG	Proteína quinase G, do inglês <i>protein kinase G</i>
PLB	Fosfolambam, do inglês <i>phosfolamban</i>
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma, do inglês <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
p-PLB	Fosfolambam fosforilado, do inglês <i>phospholated phosfolamban</i>
RAGE	Receptores dos produtos de glicação avançada
RNS	Espécie reativas de nitrogênio, do inglês <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA2a	ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático, do inglês <i>sarcoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensiana-aldestorana
STZ	Estreptozotocina
TGF- β	Fator de transformação de crescimento <i>beta</i> , do inglês <i>tranforming growth fator beta</i>
TLR	Recetor “ <i>toll-like</i> ”, do inglês <i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i> , do inglês <i>tumor necrosis fator alfa</i>
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endotelial growth factor*

VO Via oral

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 422 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por diabetes e uma perspectiva para 2040 é de que este número aumente para aproximadamente 600 milhões (*World Health Organization - Campaigns World Health Day 2016*). No Brasil, cerca de 12 milhões (DataSUS, 2012) tem diagnóstico de diabetes *mellitus* (DM) cujo aumento está relacionado ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, progressiva prevalência de obesidade e sedentismo (ROGLIC G., UNWIN N., BENNETT P.H., MATHERS C., TUOMILEHTO J., NAG S., CONNOLLY V., 2005). Quantificar o predomínio atual de DM e estimar o número de pessoas com a doença no futuro é importante pois possibilita planejar e alocar recursos de maneira racional. O ônus com DM é crescente a nível mundial, especialmente nos países em desenvolvimento onde a faixa etária mais afetada é de 40 a 59 anos, idade economicamente produtiva (*International Diabetes Federation - Atlas do diabetes – 2015*). Cálculos das despesas com o tratamento ambulatorial dos pacientes diabéticos pelo Sistema Único de Saúde no Brasil são da ordem de R\$ 6,6 bilhões / ano (DataSUS).

Existem dois tipos principais de DM: tipo 1 (DM1) que se caracteriza pela destruição auto-imune das células beta do pâncreas, resultando na deficiência absoluta de insulina e tipo 2 (DM2), resulta da resistência à insulina e/ou secreção anormal de insulina (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (LYRA et al., 2016) DM2 caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose e que corresponde a cerca de 90% dos casos mundialmente (WHO).

Antes do estabelecimento do DM2, a doença é precedida pela resistência à insulina (RESNICK; HOWARD, 2002), um quadro constituído de uma série de características físicas e metabólicas (por vezes acompanhada de hipertensão, hiperuricemia e anormalidades nos fatores hemostáticos) chamado de síndrome metabólica que persistem por anos (RESNICK; HOWARD, 2002). Distúrbios como: acúmulo de lipídios, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias; causam ativação de quinases sensíveis ao estresse com consequente inibição da sinalização da insulina (BUNNER;

CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014). Alterações na concentração e funcionalidade da insulina promovem anormalidades no metabolismo lipídico favorecendo as complicações microvasculares e macrovasculares no DM (PITOCCO et al., 2013). Dentre as principais comorbidades relacionadas a progressão da DM2 está a nefropatia diabética que responde por aproximadamente 40% dos novos casos de doença renal terminal a cada ano. A detecção precoce de DM e nefropatia é crucial para reduzir as complicações, morbidade, mortalidade e o impacto social e econômico que traz junto a si a doença diabetes nessa população (PALSSON; PATEL, 2015). Os riscos cardiovasculares associados com a síndrome metabólica têm sido relatados (RESNICK; HOWARD, 2002; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001), bem como a associação do DM2 no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GREEN et al., 2013; KOO et al., 2014; RESNICK; HOWARD, 2002). A doença tornou-se uma das principais causas de morte prematura na maioria dos países, principalmente através do aumento do risco de doença cardiovascular. Esta é responsável por 50 a 80% das mortes em pacientes com DM (SAELY; DREXEL, 2013). Portanto, pacientes com DM2 com comprometimento renal têm um risco aumentado de mortalidade, especialmente por causa cardiovascular (COLL-DE-TUERO et al., 2012; NAG et al., 2007; PALSSON; PATEL, 2015).

1.1 Cascata de sinalização da insulina

A insulina, um hormônio anabólico, está envolvida numa série de processos celulares: estimulação do crescimento e diferenciação celular; promoção do armazenamento de substratos em tecido adiposo (lipogênese), fígado (glicogênese) e músculo; inibição de lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas (Figura 1) (BUNNER; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014).

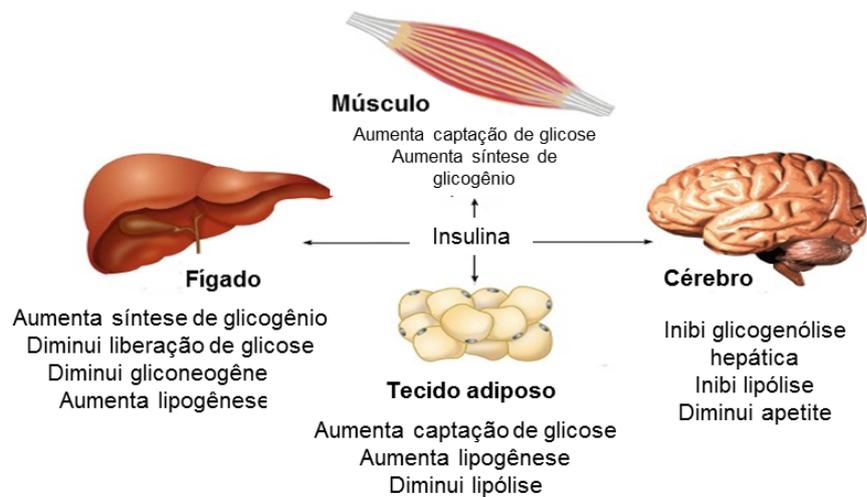


Figura 1. Ações da insulina nos principais tecidos sensíveis à insulina. Adaptado de Bunner *et al.* 2014.

Entre os períodos de alimentação e jejum, a glicose plasmática permanece em uma faixa estreita entre 4 e 7 mM em indivíduos normais. Este controle rígido ocorre devido ao equilíbrio entre a absorção de glicose a partir do intestino, a produção pelo fígado de glicogênio e absorção e metabolismo pelos tecidos periféricos. A insulina é o principal reguladora da concentração da glicose plasmática, aumentando a sua captação para o interior celular. Em resposta ao aumento da glicose, a insulina é sintetizada e secretada pelas células β -pancreáticas na corrente sanguínea (SALTIEL; KAHN, 2001). Sob condições fisiológicas, como mostra a figura 2, a ligação da insulina ao seu receptor do tipo tirosina quinase, na subunidade α (alfa) extracelular faz com que a subunidade β (beta) intracelular apresente atividade quinase o que acarreta em alteração conformacional e autofosforilação, aumentando ainda mais a atividade quinase do receptor e desencadeia a fosforilação de tirosina nos substratos protéicos intracelulares. Esses substratos protéicos incluem a família dos substratos do receptor da insulina (IRS) que por sua vez ativam diferentes vias de sinalização. Duas principais vias são ativadas: *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) / *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), que regula a expressão gênica e o crescimento celular, e a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (Akt), que está preferencialmente envolvida na maioria das ações metabólicas da insulina (BUNNER; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014; SALTIEL; KAHN, 2001).

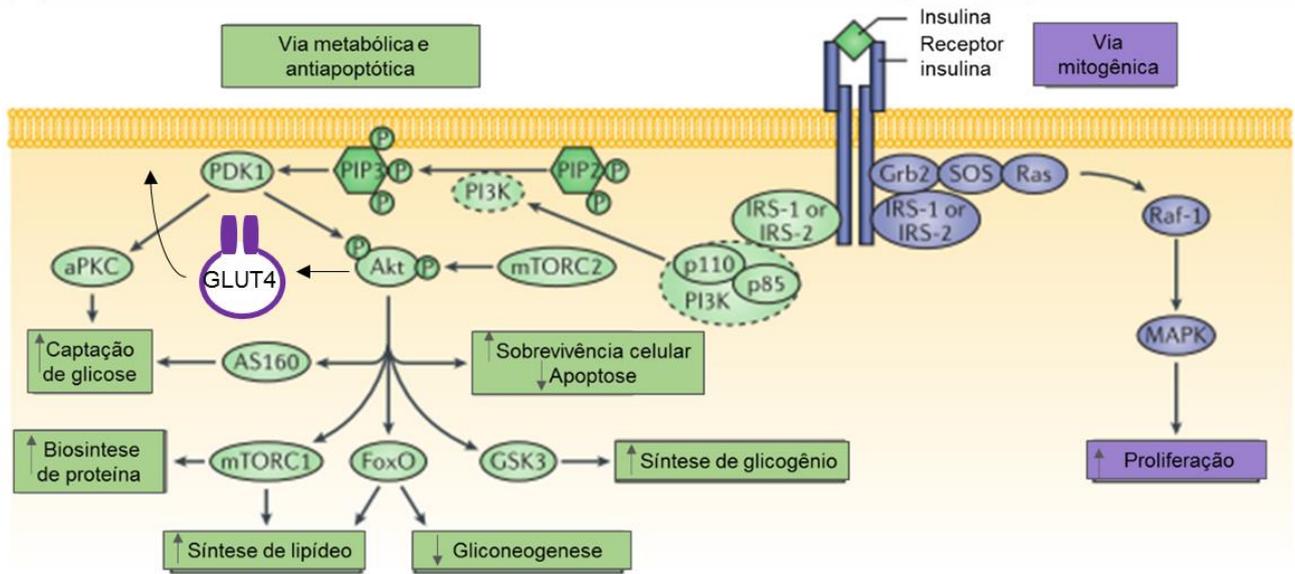


Figura 2. Sinalização da insulina na homeostase. Em condições normais após ingestão de alimentos, células beta pancreáticas secretam insulina que se liga a seu receptor no dímero alfa em tecidos sensíveis a insulina, ativando-o e promovendo autofosforilação de resíduo de tirosina na subunidade do dímero beta que serve como ancoramento para proteínas alvo como isoformas do IRS e consequente ativação da via PI3K – Akt, que regula captação de glicose por ativação da translocação da GLUT4, biossíntese de proteína, metabolismo de lipídeos, aumentando sobrevivência celular e diminui apoptose. E outra via também ativada são as MAPKs aumentando a proliferação celular. IRS = Substratos do Receptor da Insulina, PI3K – Akt = Fosfatidilinositol 3-quinase - Proteína B quinase, GLUT4 = transportador de glicose 4, MAPKs = Proteína quinase ativada por mitôgenos. Adaptado Artunc F. *et al.* 2016.

A PI3K, estimulada pela insulina, produz um metabólito que ativa a Akt e proteína quinase C (PKC), o que leva a síntese de proteína, glicogênio e inibe a lipólise. PKC, que também depende de lipídios para a ativação, pode inibir a sinalização de insulina por um mecanismo de feedback (BUNNER; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014). Akt ativada é essencial para a translocação do transportador de glicose, GLUT4, levando ao deslocamento para membrana celular para permitir a passagem da glicose do meio extra para o intracelular (ANHÊ *et al.*, 2007; BUNNER; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014).

1.2 Fisiopatologia do Diabetes tipo 2 e acometimento nos rins e coração

A síndrome metabólica pode levar ao desenvolvimento da resistência insulínica que caracteriza-se por falhas das células-alvo em responder aos níveis normais de insulina circulante, resultando em hiperinsulinemia inicial compensatória na tentativa de se obter uma resposta fisiológica adequada (SALTIEL; KAHN, 2001; SAMUEL; SHULMAN, 2012). Como podemos

observar na figura 3, a hiperglicemia, inflamação (liberação de interleucinas e fator de necrose tumoral-alfa, TNF- α) e aumento de ácidos graxos livres ocasionam aumento da fosforilação das serinas e diminuição da fosforilação das tirosinas dos IRS-1, uma fosforilação anormal dos receptores de insulina. Além disso, estes fatores indiretamente levam a uma disfunção mitocondrial, ao estresse do retículo endoplasmático resultando na ativação de reguladores negativos (ERK, IKK, PKC entre outros) que cronicamente reduzem a resposta celular a insulina (ARTUNC et al., 2016). Essas alterações em órgãos sensíveis a ação da insulina como rins e coração desenvolvem comorbidades consequentes do diabetes.

O diagnóstico de DM2 em pacientes com história prévia de resistência à insulina está associada a um declínio da capacidade de liberação da insulina pelas ilhotas pancreáticas. A hiperglicemia crônica pode resultar em efeitos prejudiciais na síntese e/ou secreção de insulina, sobrevivência celular (células β) e sensibilidade à insulina através de múltiplos mecanismos (CERNEA; DOBREANU, 2013). O efeito de estímulo a secreção de insulina pela glicose se dá através da ligação de incretinas a receptores específicos nas células beta pancreáticas (CERNEA, SIMONA; RAZ, 2011; VILSBØLL, 2009) que promove aumento de AMP cíclico intracelular (AMPc) e cálcio (ANSON; RIGEON, 2003; CERNEA, SIMONA; RAZ, 2011; VILSBØLL, 2009). As incretinas também regulam vários genes específicos das células beta pancreáticas, incluindo pró-insulina e os transportadores de glicose (VILSBØLL, 2009). A capacidade secretora das células beta pancreáticas e a manutenção dos estoques de insulina são preservados através da estimulação da síntese de insulina decorrente da regulação positiva da transcrição e tradução da insulina e estabilização do mRNA (FEHSE et al., 2005).

Nos rins, distúrbios metabólicos e alteração hemodinâmica ativam o sistema renina-angiotensina-aldosterona que desencadeia sinalização nas células renais que medeiam uma resposta celular através da ativação de fatores-chave de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). As células renais produzem também quimiocinas e citocinas pro-fibróticas que contribuem para o ciclo de injúria celular. As células mesangiais apresentam perda de podócitos, diminuição da taxa de filtração glomerular que

contribuem para aumentar a proteinúria durante o desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética (LIM, 2014) (Figura 3 A).

Nos cardiomiócitos, o distúrbio metabólico ocasiona disfunção mitocondrial o que leva a estresse oxidativo resultando em comprometimento da sinalização de insulina e estresse retículo endoplasmático o que acarreta mobilização anormal do Ca^{2+} ocasionando morte e rigidez dos cardiomiócitos e culminando em cardiomiopatia diabética (JIA et al., 2016) (Figura 3 B).

A oferta prejudicada de substrato, bem como o metabolismo energético do miocárdio convergem para o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética e subsequente insuficiência cardíaca. Em condições fisiológicas, o coração pode usar ácidos graxos e glicose como substratos energéticos, proporcionando flexibilidade metabólica. A captação de ácidos graxos é mediada pelo CD36, enquanto a ingestão de glicose ocorre por meio da GLUT4, estimulado pela insulina. Os nutrientes aumentam os níveis plasmáticos de insulina e sua sinalização miocárdica, o que facilita a translocação de GLUT4 e CD36 para o sarcolema de miócitos para suprir os substratos energéticos miocárdicos. Em contraste, nos estados de resistência à insulina e / ou DM2, o CD36 torna-se preferencialmente localizado no sarcolema, enquanto o GLUT4 é internalizado e retorna à sua localização intracelular (JIA et al., 2016).

Assim, a redução da captação de glicose como resultado da resistência sistêmica e cardíaca à insulina facilita a mudança de substrato para o aumento da oxidação de ácidos graxos livres no diabetes mellitus, resultando em redução da eficiência cardíaca. O acúmulo excessivo de ácidos graxos no tecido cardíaco e a lipotoxicidade associada comprometem a sinalização da insulina e reduzem a autofagia fisiológica normal, o que leva a alterações morfológicas e estruturais, além de prejudicar o desempenho miocárdico (GUO; GUO, 2017). Essas anormalidades aumentam o uso de oxigênio pelo miocárdio e podem reduzir a eficiência da função das fibras musculares em resposta a estímulos elétricos (acoplamento elétrico-mecânico) (JIA et al., 2016; NISHIDA; OTSU, 2017).

A hiperglicemia crônica prejudica a estrutura e a função cardíaca através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva a formação de produtos finais de glicação avançada (GIACCO; BROWNLEE,

2010). Os produtos finais de glicação avançada podem ter um papel crucial no desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia diabética, estimulando a expressão e o acúmulo de colágeno e promovendo a reticulação de colágeno, o que leva ao aumento da fibrose miocárdica e redução da complacência (FALCÃO-PIRES; LEITE-MOREIRA, 2012).

O estresse oxidativo e o estresse do retículo endoplasmático podem induzir anormalidades no manuseio do cálcio, levando subsequentemente à cardiomiopatia diabética e à disfunção diastólica. As acilcarnitinas de cadeia longa, EROs e o conteúdo anormal de lipídios na membrana mitocondrial, como a cardiolipina, podem alterar o manejo do cálcio afetando várias proteínas transportadoras, o que leva à captação intracelular de cálcio prejudicada e ao atraso do relaxamento diastólico (BOUDINA; ABEL, 2010). A interação entre EROs, estresse do retículo endoplasmático e manuseio anormal de cálcio promove disfunção do componente subcelular e, por fim, causa apoptose, necrose e autofagia. A apoptose é induzida por proteínas pró-apoptóticas através da permeabilização da membrana mitocondrial externa em resposta ao aumento da produção de EROs e à disfunção mitocondrial. Em contraste, a necrose ocorre em resposta à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, que causa um influxo rápido de solutos e água na matriz mitocondrial, colapso do gradiente de prótons e ruptura da síntese de ATP (C.H. YI; YUAN, 2011; JIA et al., 2016). As mitocôndrias também estão intimamente associadas ao retículo endoplasmático e liberação de Ca^{2+} dessa organela, assim abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial ocasiona um excesso na absorção de Ca^{2+} pelas mitocôndrias o que acarreta numa sobrecarga de Ca^{2+} (C.H. YI; YUAN, 2011).

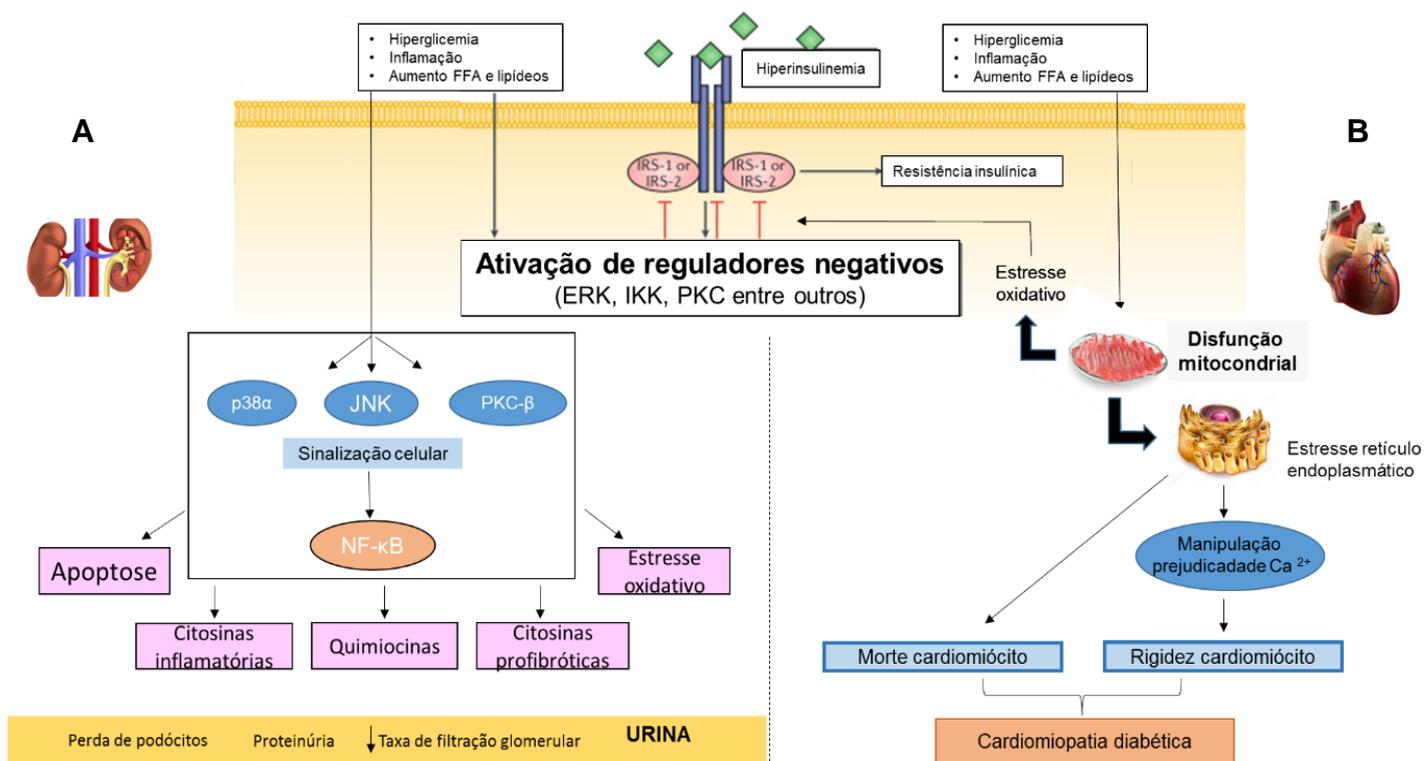


Figura 3. Sinalização da insulina no diabetes. Hiperglicemia, inflamação (liberação de interleucinas e TNF- α) e aumento de ácidos graxos livres atuando em seus respectivos sítios sinalizam para que ocorra aumento da fosforilação das serinas, uma fosforilação anormal dos receptores de insulina. Ou de maneira indireta estes fatores ativam reguladores negativos que reduz a resposta celular a insulina o que acarreta em (A) alterações nas células renais e (B) nos cardiomiócitos. NF- κ B = fator nuclear kappa B, FFA = ácidos graxos livres, ERK = proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares, IKK = I κ B quinase, PKC = proteína quinase c, JNK = proteína quinase c jun NH2 terminal. Adaptado Artunc F. *et al.* 2016, Jia G. *et al.* 2016 e Lim A. 2014.

1.3 Desenvolvimento de complicações no DM2 em associação com a inflamação crônica

Inúmeros marcadores pró-inflamatórios têm sido descritos como presentes durante a instalação e evolução do DM tais como: TNF- α , interferon gamma (IFN- γ), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), ciclo-oxigenase 2 (COX-2), proteína quinase c Jun NH2 terminal (JNK), NF- κ B, MAPK, IKK, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), PI3K, receptor “toll-like” (TLR), auto anticorpos, caspases e inflamassomas. A inflamação tem sido associada tanto na diminuição da síntese e liberação de insulina pelas células β pancreáticas como pelo aumento da resistência à insulina (ou diminuição da sensibilidade) causando injúria e disfunção nos mais diferentes tecidos (CRUZ *et al.*, 2013; DONATH; SHOELSON, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A insulina, em concentrações fisiológicas estimula a produção endotelial insulino-dependente de óxido nítrico (NO) por ativação da via PI3K. A presença de resistência à insulina, determina um defeito combinado no transporte de glicose e na vasodilatação endotélio-dependente (BAHIA et al., 2006). A ativação da via da MAPK, faz com que ocorra um aumento na secreção de endotelina 1 (ET1), caracterizando uma disfunção endotelial pelo desequilíbrio entre NO e ET1 (XU; ZOU, 2009). No tecido vascular ocorre a migração de monócitos, além de induzir a expressão de fatores pró-trombóticos e pró-fibróticos promovendo ação pró-aterogênica (BAHIA et al., 2006; PITOCCO et al., 2013).

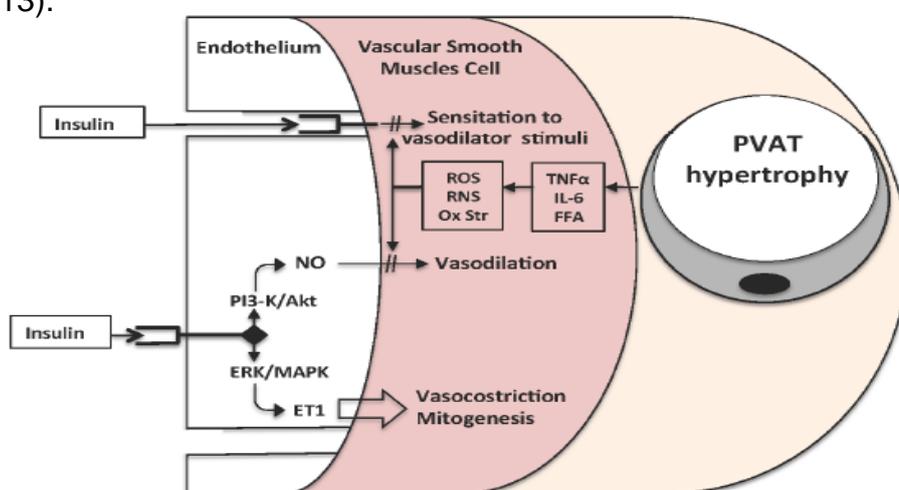


Figura 4. Efeitos vasculares da insulina. Em condições caracterizadas por aumento do estresse oxidativo e resistência à insulina, este hormônio passa a desempenhar um papel pró-aterogênico por mediar ativação de fatores pró-trombóticos e pró-fibróticos. PVAT = Tecido Adiposo Perivascular, ROS = espécies reativas de oxigênio, RNS = espécies reativas de nitrogênio, TNF- α = fator de necrose tumoral *alfa*, IL-6 = interleucina 6, FFA = ácidos graxos livres, NO = óxido nítrico, PI3-K = fosfatidil inositol 3 quinase, Akt = proteína quinase B, ERK = Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares, MAPK = Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares, ET-1 = endotelina-1 . Adaptado de Pitocco D *et al.* 2013.

Altos níveis de glicose no sangue induzem danos vasculares e neurais, mediante uma série complexa de interações que incluem as vias do poli (aldose redutase), hexosamina, PKC, poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), produtos finais de glicosilação avançada (AGE) / receptor de produtos finais de glicosilação avançada (RAGE), espécies reativas de oxigênio (EROs, do inglês *reactive oxygen species*, ROS); assim como diferentes vias de sinalização (RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR e JNK/STAT), fatores de transcrição e citosinas pro-inflamatórias (DONATH; SHOELSON, 2011; WANG et al., 2013).

Sob condição de hiperglicemia, a glicose no citosol é desviada para a via do poliol, em que a enzima aldose redutase reduz a glicose em sorbitol, utilizando como cofator a NADPH-oxidase (NOX). Estas enzimas são onipresentes com maior densidade em tecidos excitáveis como células endoteliais, músculos em geral, glomérulo, neurônios e retina. O consumo do *nitric acid adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) pela via dos poliois irá diminuir a sua biodisponibilidade, que por sua vez é o cofator essencial para a regeneração da glutathione (GSH) reduzida, um potente sequestrador de ROS (antioxidante), resultando em aumento do estresse oxidativo e suas consequências (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Estes ROS estimulam a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL), que não são reconhecidas pelo receptor e são captados por macrófagos que conduzem à formação de células espumosas e placas ateroscleróticas, o que leva a distúrbios vasculares associado ao DM (ARORA; SINGH, 2014; MATSUDA; SHIMOMURA, 2014).

O aumento da geração de ROS nos tecidos alvos como rins e coração (GORIN; BLOCK, 2013) resultante do aumento da expressão da NOX está envolvido nas complicações como a nefropatia e cardiomiopatia diabética. A família NOX é composta por sete membros: NOX1 a NOX5, Duox1 e Duox2 (DIKALOV, 2009; LE LAY et al., 2014). Os homólogos da NADPH oxidase: NOX1, NOX2 (também conhecido como gp91phox) e NOX4, são predominantemente expressos nos sistemas cardiovascular e cardiorrenal (DIKALOV, 2009). As células renais de glomérulos e túbulos intersticiais são particularmente sensíveis à hiperglicemia crônica, que é um efetivo ativador da NOX nessas células. O aumento na regulação de NOX4, NOX2 e NOX1 (mRNA e proteína), concomitantemente com o aumento da geração de O_2^- ou H_2O_2 , tem sido relatado em resposta a altas concentrações de glicose em células renais em modelos de DM (BLOCK; GORIN; ABOUD, 2009; EID et al., 2009; THALLAS-BONKE et al., 2008).

Semelhante ao que ocorre na nefropatia diabética, o RAS, AGEs e TGF- β participam no surgimento da disfunção cardíaca em associação com a hiperglicemia (GORIN; BLOCK, 2013). O aumento da produção de ROS no coração é uma contribuição importante no desenvolvimento e progressão da

cardiomiopatia diabética. Os homólogos de NOX identificados como fontes de ROS nos miócitos cardíacos são principalmente NOX2 e NOX4 (BURGOYNE et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

O aumento da formação de AGEs, decorrente da glicação não-enzimática de proteínas plasmáticas, acarreta seu depósito na camada sub-endotelial e induz disfunção endotelial. Os AGEs podem diretamente inativar a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que determina o impedimento da vasodilatação endotélio-dependente (WAUTIER; SCHMIDT, 2004). Por sua vez, o receptor para a ligação de AGE (RAGE) induz a produção de mais ROS, que ativa o NF- κ B, causando múltiplas alterações patológicas na expressão do gene (YAN, 2014) e um ciclo de injúrias.

A via do PKC também pode ser ativada pelo aumento do estresse oxidativo que pertence a uma família de enzimas compostas por aproximadamente 15 isoformas (ARORA; SINGH, 2014). A ativação persistente de várias isoformas de PKC implica na diminuição da produção de NO devido a redução da expressão de eNOS em células de músculo liso e aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o que aumenta a permeabilidade vascular (PITOCCO et al., 2013). Abaixo, pode-se enumerar algumas das complicações provenientes do DM2.

1.3.1 Retinopatia

Na retinopatia diabética, as glias, microglias e pericitos (células vasculares de suporte na retina) aumentam a ingestão de glicose como resposta a hiperglicemia e outras anormalidades metabólicas (altos níveis de lipídeos no sangue), incrementando o fluxo de hexosamina, poliols, PKC, PARP e AGE (EISMA; DULLE; FORT, 2015). Isto ocasiona glicotoxicidade e acumulação de AGE nas células, que como resposta, aumentam a produção de ROS, citocinas (TNF α , IL-1 β , entre outros) e fatores de crescimento (VEGF, IGF-1, entre outros), os quais uma vez liberados na retina são capazes de regular a apoptose das células endoteliais e pericitos, além de estimular a via inflamatória e de ocasionar vazamento e crescimento anormal dos vasos sanguíneos da retina (no estado inicial da patologia) (EISMA; DULLE; FORT, 2015; MADDAHI; CHEN; EDVINSSON, 2009). Estas alterações vasculares na

retina levam a uma degradação da barreira hemato-retiniana, edema macular, hipóxia (causada pela formação de áreas de oclusão vascular e não-perfusão) e finalmente, a indução de angiogênese associada com o estado proliferativo da retinopatia diabética (CHEUNG et al., 2015).

1.3.2 Nefropatia

Na nefropatia diabética, caracterizada pelo espessamento da membrana basal glomerular, hipertrofia glomerular e aumento da matriz mesangial. As desordens metabólicas, hemodinâmicas e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) geram estresse oxidativo, inflamação e fibrose, os quais são os principais fatores que contribuem na progressão da doença (LIM, 2014). Como discutido anteriormente a produção excessiva de ROS a partir da hiperglicemia, o que altera o balanço entre oxidação e redução, promove a ativação de NADPH-oxidase e PKC, incrementando a formação de AGE e ativação da via poli-ol, que são a maior fonte de ROS na nefropatia diabética. Esta cascata dispara uma série de respostas celulares que incluem a ativação de ERK, p38 MAPK, NF- κ B e proteína ativadora 1 (AP-1), que por sua vez aumentam a expressão de quimiocinas pro-inflamatórias como o MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*). Este por sua vez estimula a infiltração de um maior número de macrófagos e monócitos capazes de produzir citocinas pro-fibróticas, a exemplo o TGF- β , fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (WADA; MAKINO, 2013).

1.3.4 Cardiomiopatia

Vários fatores têm sido propostos para explicar a patogênese da cardiomiopatia diabética. Esses fatores incluem distúrbios metabólicos cardíacos, anormalidades de sinalização subcelular, disfunção autonômica, ativação do SRAA, inflamação, estresse oxidativo e resposta imune mal-adaptativa (JIA et al., 2016). A resposta inflamatória envolve uma complexa cascata de eventos envolvendo vários tipos celulares que possuem funções inter-relacionadas. O tecido adiposo está associado ao aumento da produção

de IL-6 que regula a expressão da proteína C reativa (PCR) e esses marcadores inflamatórios estão relacionados à resistência à insulina (RESNICK; HOWARD, 2002). A sinalização inflamatória nos cardiomiócitos geralmente ocorre precoce a resposta à lesão miocárdica e implica superprodução de ROS mitocondriais (NISHIDA; OTSU, 2017). A ativação de várias vias de sinalização, como NF- κ B, c-jun NH2-terminal quinase e p38 MAPK, pode mediar um estado de inflamação, que está ligado a resistência à insulina, desempenhando um papel importante nas complicações provenientes do DM. De fato, o NF- κ B representa um dos principais mediadores do processo inflamatório cuja ativação está associada ao aumento da liberação de citocinas, como o TNF- α , que está frequentemente envolvido em danos cardíacos (REIS et al., 2012). Além disso, o aumento da expressão do TNF- α no coração tem sido associada à hipertrofia e fibrose cardíaca, bem como à disfunção do ventrículo esquerdo (SUN et al., 2004).

A contração cardíaca, se dá quando uma onda de corrente elétrica passa através de todo o coração. O desencadeamento da contração em uma corrente que flui para fora da superfície corporal, gerando uma diferença de potencial na superfície da pele. Essa diferença de potencial na superfície corpórea ao longo do tempo produz o Eletrocardiograma (ECG) (REISNER; CLIFFORD; MARK, 2006). A atividade elétrica cardíaca no decorrer do tempo é caracterizada por diferentes ondas no traçado do ECG, são elas, P, Q, R, S e T. O estudo do complexo QRS, das ondas T e P, permitem avaliar o estado de saúde dos pacientes (YOCHUM et al., 2016).

A onda P representa a despolarização atrial, as ondas QRS representam a despolarização ventricular e a onda T repolarização ventricular, onde cada uma destas ondas apresenta características importantes e próprias, são elas, tempo de ocorrência da onda, amplitude de cada onda, intervalos, formato da onda, com isso diversas patologias e alterações podem ser diagnosticadas a partir de suas características (KARIMIPOUR; REZA, 2014).

O intervalo PR é o tempo necessário para que o potencial iônico se espalhe a partir do nódulo sinu-atrial, indo do átrio ao ventrículo. O intervalo QT é o tempo de duração da passagem do potencial iônico pelos ventrículos (YOCHUM et al., 2016). O intervalo QT varia inversamente com a frequência

cardíaca (FC), de modo que quanto maior a FC, menor o QT, e vice-versa. Assim, ele deve ser corrigido em relação à FC, gerando o QTc (ARILDSEN; MAY; CHRISTIANSEN, 1999).

Após o complexo QRS tem-se o segmento ST. A onda T é a representação do retorno ao estado de repouso iônico do ventrículo. O segmento TP representa a duração de repouso dos ventrículos até o início do próximo ciclo de contração cardíaca. O intervalo entre os sucessivos picos R, é conhecido como intervalo R-R, e a repetição dos intervalos RR ao longo do tempo, determina a frequência cardíaca (YOCHUM et al., 2016).

1.4 Tratamento do diabetes tipo 2

1.4.1 Classes farmacológicas utilizadas atualmente

As principais classes de hipoglicemiantes orais são as biguanidas (ex. metformina), sulfoniluréias (ex. glibenglamida), tiazolidinadionas (ou glitazonas) e inibidores da α -glicosidase (acarbose) (RANG *et al.*, 2007).

As biguanidas, representadas principalmente pela metformina, o qual geralmente são fármaco de primeira escolha (SINGH, 2014; TOMKIN, 2014) por apresentar uma modesta perda de peso (TOMKIN, 2014). é um agente anti-hiperglicemiante usado para diminuir a glicemia e conseqüentemente melhorar o perfil metabólico. Ela reduz os níveis de glicose sanguínea pela inibição da gliconeogênese e, na presença de insulina, estimula a captação de glicose periférica pelos tecidos, principalmente músculos esqueléticos, e diminui a absorção de glicose pelo trato gastrointestinal. Seu efeito direto sobre as células β ainda é caso de debate. A metformina não causa hipoglicemia, mas reduz os níveis de hemoglobina glicosilada e melhora o perfil lipídico e a atividade fibrinolítica (CRISTINA et al., 2008). Age no músculo esquelético aumentando a captação de glicose (glicogênese), reduz produção hepática de glicose e nos adipócitos inibe lipólise e a disponibilidade de ácidos graxos livres (RANG *et al.*, 2007).

Como terapia de segunda linha, as sulfoniluréias são amplamente utilizadas devido à sua eficácia bem estabelecida e baixo custo, mas com efeitos adversos como hipoglicemia e ganho de peso (SINGH, 2014). Seu

principal mecanismo de ação é inibir a abertura dos canais K_{ATP} resultando na despolarização das células β , subsequente aumento no influxo de cálcio intracelular e, portanto, a promoção da liberação de insulina (TRIGGLE; DING, 2014). Nos EUA, esses medicamentos possuem tarja preta, uma preocupação da FDA por eles poderem aumentar o risco cardiovascular (HOLMAN; SOURIJ; CALIFF, 2014).

As tiazolidinodionas, responsáveis pela captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (o que contribui para o efeito indesejável de ganho de peso) se ligam aos receptores intracelulares PPAR γ que regulam a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico (RANG *et al.*, 2007). Há relatos também de alta hepatotoxicidade e efeito negativo na função cardíaca por causar retenção hídrica (TRIGGLE; DING, 2014).

Acarbose e drogas afins são eficazes por via oral e devem ser tomadas em conjunto com as refeições (TRIGGLE; DING, 2014). Estes medicamentos não interferem na secreção de insulina, retarda a absorção de carboidratos, reduzindo o aumento pós-prandial da glicemia. Causam flatulência e diarreia (RANG *et al.*, 2007).

Os inibidores da dipetidil peptidase 4 (iDPP4) e os incretinomiméticos (agonistas de GLP-1) estão no foco como uma nova classe de agentes anti-diabéticos, pois apresentam uma baixa incidência de hipoglicemia e não provocaram o ganho de peso (HINNEN *et al.*, 2006), efeitos secundários apresentados pelos anti-diabéticos como a tiazolidinodiona (SATO *et al.*, 2011). Além de apresentarem redução de eventos cardiovasculares (AVOGARO; KREUTZENBERG; FADINI, 2014).

1.4.2 Inibidores da DDP4

As incretinas são hormônios peptídicos secretados a partir do intestino. As principais são polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo tipo glucagon 1 (GLP-1), responsáveis por aumentar a liberação de insulina à partir de células- β pancreáticas de modo dependente da glicose. Estão associadas com a biossíntese de insulina, a proliferação de células- β pancreáticas, e a inibição da ingestão de alimentos (HOLST; GROMADA, 2004). Em pacientes com DM2, ou indivíduos com intolerância à glicose (pré-

diabetes), esta resposta é inadequada, resultando em concentrações circulantes reduzidas de GLP-1 pós-prandial, o qual contribui para uma resposta secretora de insulina atenuada durante as refeições (HINNEN et al., 2006).

Porém a meia vida dessas incretinas são curtas, pois imediatamente são degradadas pela DPP4 (SATO et al., 2011). A DPP4 é uma glicoproteína transmembranar expressa na superfície de vários tipos de células (pâncreas exócrino, rins, trato gastrointestinal, trato biliar, timo, nódulos linfáticos, útero, placenta, próstata, supra-renal, glândulas sudoríparas, glândulas salivares e glândulas mamarias) e está solubilizado em fluídos corporais (plasma e no fluído cerebrospinal). Possui atividade serino protease cujos alvos são substratos péptídeos N-terminais contendo prolina ou alanina, que incluem fatores de crescimento, quimiocinas, neuropeptídios, além das incretinas GLP-1 e GIP (PALA; ROTELLA, 2013; SATO et al., 2011).

Os iDPP-4, também denominados gliptinas, são terapias baseadas em incretinas que melhoram o controle da glicose em pacientes com diabetes tipo 2 (DM2). A experiência clínica inicial com gliptinas foi publicada em 2011. Desde então uma enorme quantidade de dados em relação a essa classe farmacológica acumulou-se e passou a ter seu lugar no arsenal para o tratamento do DM2 e está se tornando cada vez mais importante (SCHEEN, 2015).

O uso das gliptinas, com destaque para a sitagliptina, tanto em trabalhos experimentais em animais, como em humanos tem apresentado efeitos benéficos com relação a melhora das comorbidades provenientes do diabetes tipo 2 (AMBER et al., 2014; HEMMERYCKX et al., 2014; KARASIK et al., 2008; PICATOSTE et al., 2013; ZENG et al., 2014).

1.5 Planejamento e síntese de novos inibidores da DPP4

DM2 é uma doença que apresenta uma complexa fisiopatologia, o que se ainda faz necessário estratégias terapêuticas que possam prevenir e/ou controlar suas complicações crônicas. Recentemente, foi relatado o benefício do tratamento com anti-inflamatórios e antilipidêmicos associados à

administração dos hipoglicemiantes, com prognóstico favorável à redução da morbidade e mortalidade associada ao DM2 (DONATH; SHOELSON, 2011).

Em considerando estes fatos, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) em colaboração com o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (do Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos) buscaram a identificação de novas alternativas de tratamento do DM2. A principal meta seria a descoberta de novos antidiabéticos que pudessem modular a síndrome metabólica, característica do DM2, através da atividade antihiper-glicemiante e também reduzissem o componente inflamatório da doença.

Inicialmente, procedeu-se a seleção racional da quimioteca do LASSBio® onde destacou-se o LASSBio-331, previamente descrito como protótipo analgésico e anti-inflamatório (COSTA, 2013). Devido a seu efeito anti-inflamatório, o LASSBio-331 surgiu como um promissor protótipo para o planejamento de diversas modificações estruturais, o que resultou na síntese de novas moléculas tais como LASSBio-1470, LASSBio-1471, LASSBio-1473 e LASSBio-1474. As novas sulfonilidrazonas e seu protótipo LASSBio-331 foram testados em modelo murino de diabetes induzido por estreptozotocina, o que permitiu demonstrar que LASSBio-1471 e LASSBio-1473 apresentaram atividade anti-hiperglicemiante (Figura 5) (ZAPATA-SUDO et al., 2012).

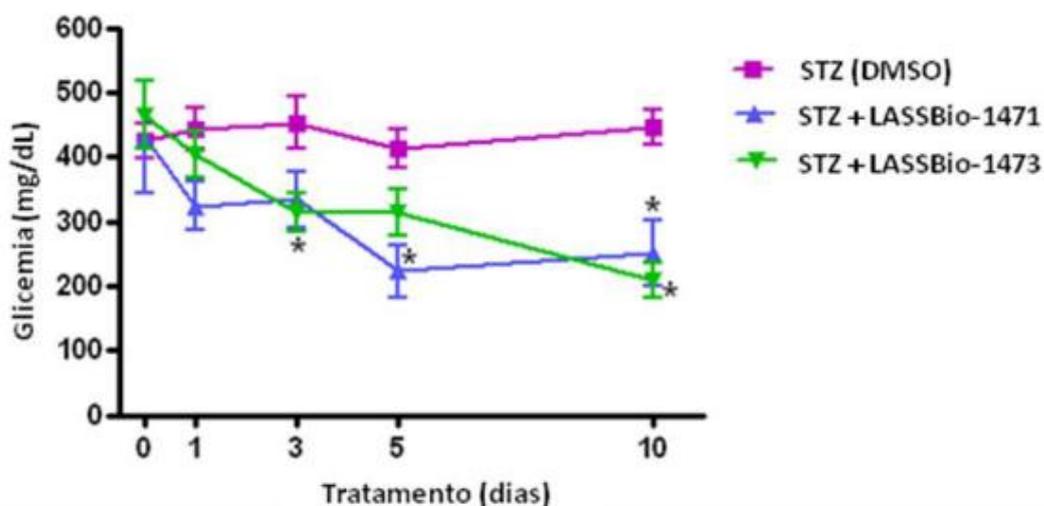


Figura 5. Análise do perfil glicêmico em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Os ratos foram tratados com (STZ) 45mg/Kg i.p. para indução do DM e posteriormente tratados com 20mg/Kg de LASSBio-1471 e LASSBio-1473 em doses diárias, conforme descrito em Metodologia. * $p < 0,05$. Zapata-sudo *et al.*, 2012.

Todos os derivados foram testados quanto ao efeito anti-inflamatório (dissertação de mestrado de COSTA, 2013) em modelo de peritonite induzido por carragenina. Baseado nestes experimentos, LASSBio-1471, LASSBio-1473 e LASSBio-1474 apresentaram perfil anti-inflamatório quando administrados por via oral (Figura 6) cujo efeito estaria relacionado a ação anti-TNF- α (Figura 7).

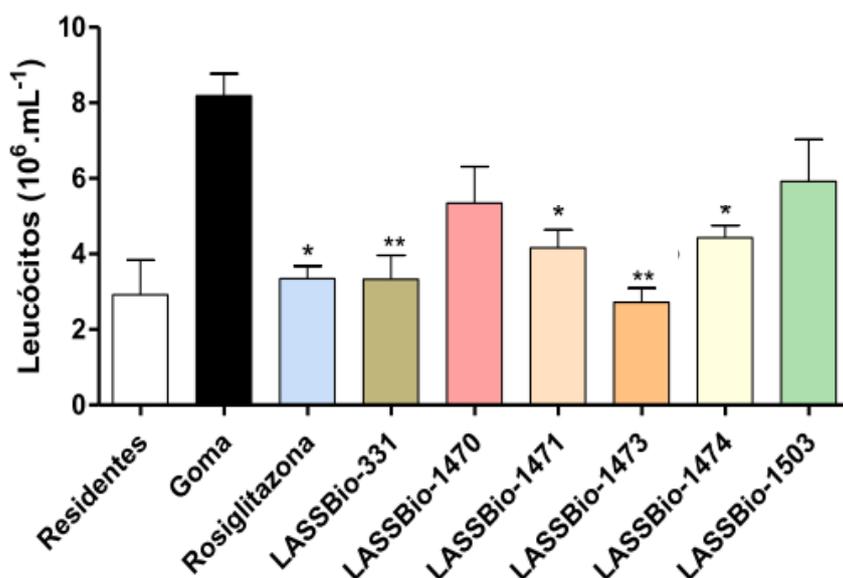


Figura 6. Ensaio de peritonite induzida por carragenina 1%. As substâncias foram administradas por via oral, na dose de 100mmol/kg. n de 3-5 animais. Análise estatística ANOVA. ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$. Costa, 2013.

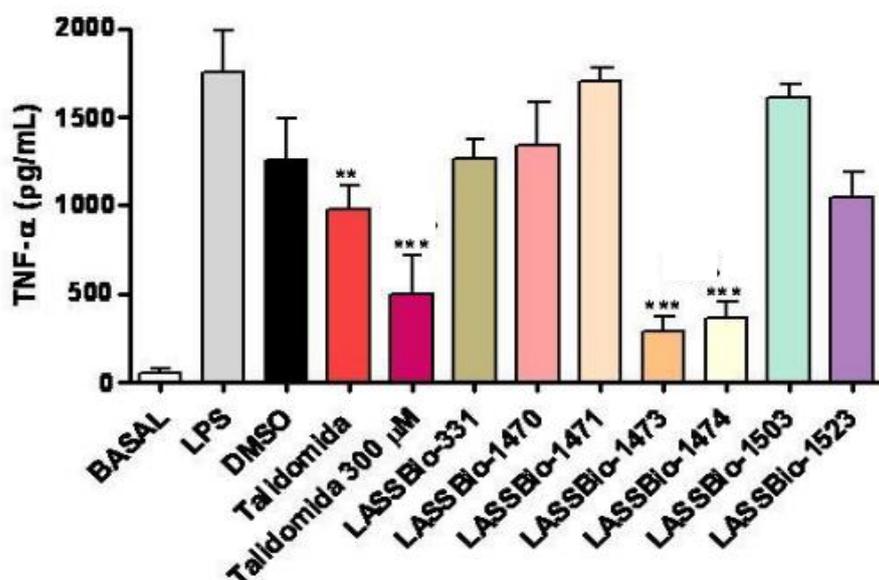


Figura 7. Dosagem de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. As substâncias incubadas na concentração de 100mM. n de 3-4 animais. Análise estatística ANOVA. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,005$. Costa, 2013.

Portanto, LASSBio-1471 foi selecionado e modificado estruturalmente através de bioisosterismo e estratégias homólogas (LIMA et al., 2014) visando a otimização dos efeitos farmacológicos hipoglicemiante e anti-inflamatório.

Atualmente, considera-se importante a inibição DPP4, seguido pela elevação do GLP-1, como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de DM (HINNEN et al., 2006; INZUCCHI; MCGUIRE, 2008; KIRINO et al., 2009; SATO et al., 2011; USSHER; DRUCKER, 2014) assim como também uma ação protetora em relação ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares (AVOGARO; KREUTZENBERG; FADINI, 2014; SANTOS et al., 2013).

Assim, foi planejado e sintetizado um novo derivado híbrido partindo-se do princípio do efeito benéfico da classe de iDPP4, como a sitagliptina, fármaco amplamente utilizado na clínica como hipoglicemiante e LASSBio-1772 que foi descrito como anti-inflamatório. A etapa de planejamento previu a modificação do protótipo LASSBio-1772 que implicou na estratégia de bioisosterismo sobre o grupo éster (subunidade A) que é metabolicamente instável e a hibridação da subunidade C da sitagliptina reconhecida pelo sítio ativo da enzima com as subunidades B do protótipo LASSBio (Figura 8).

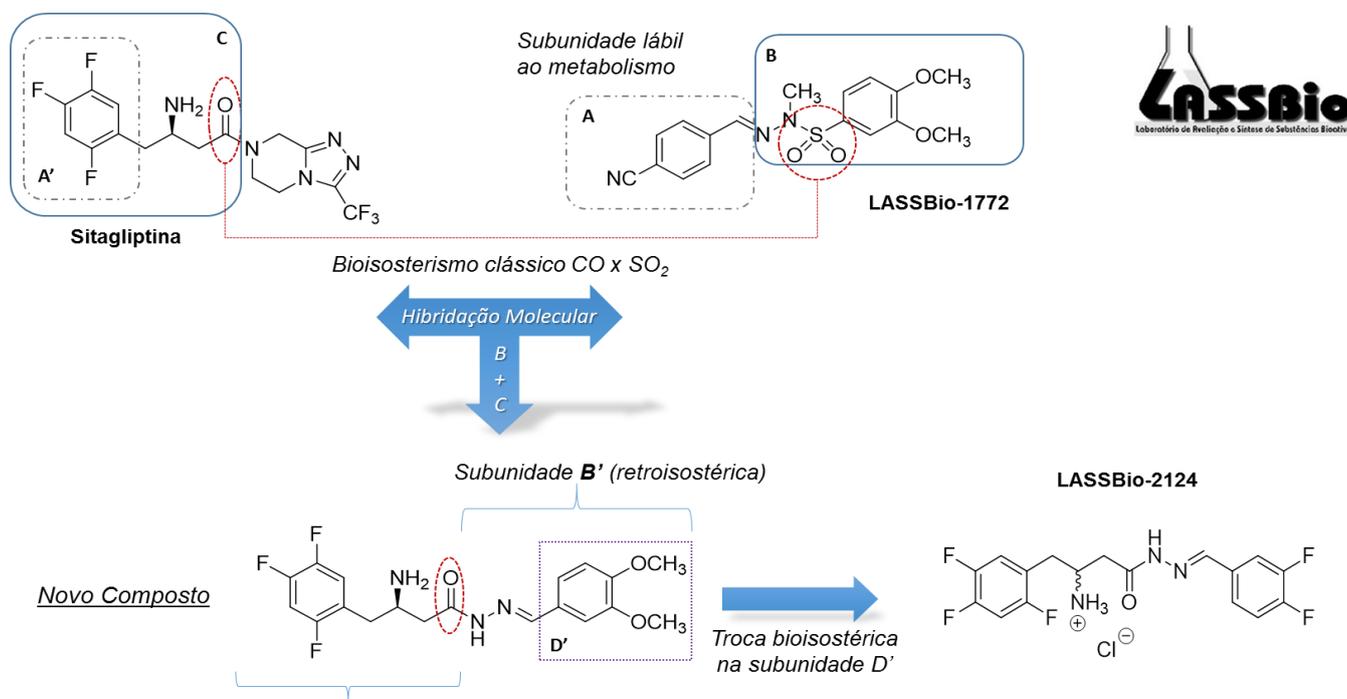


Figura 8. Planejamento estrutural dos novos protótipos LASSBio e série congênere. Barreiro E. & Fraga C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3 Ed. Porto Alegre-RS 2015, 347.

Na subunidade B do novo derivado, o grupo sulfonilhidrazona foi substituído por um grupo acil hidrazona, isto aproveitando o bioisosterismo clássico entre o grupo sulfona e carbonila. Além disso planejou-se a construção de uma série congênere trocando a subunidade D pelos anéis apresentados no quadro vermelho, com o objetivo de explorar diferentes tipos de interações (eletrostáticas, hidrofóbicas, ligação de hidrogênio, etc.) que pudessem melhorar o perfil de reconhecimento molecular com a enzima alvo.

1.5.1 Seleção do LASSBio-2124

Foi realizada uma triagem através da determinação da atividade inibitória de DPP-4, (Cayman Chemical) para a seleção de uma molécula para avaliação no presente estudo. O ensaio consistiu na utilização de um substrato fluorogénico, Gly-Pro-aminometilcumarina (AMC), para medir a atividade da DPP (IV). A clivagem da ligação peptídica por DPP libera o grupo AMC livre, resultando em fluorescência (Figura 9) que poderia ser diminuída após adição dos protótipos caso inibissem a reação (Figura 10). Inicialmente, 3 moléculas foram testadas comparadas a sitagliptina.

O composto que apresentou melhor atividade inibitória, ou seja, resposta semelhante a sitagliptina foi o derivado LASSBio-2124 (DiF-HCl).

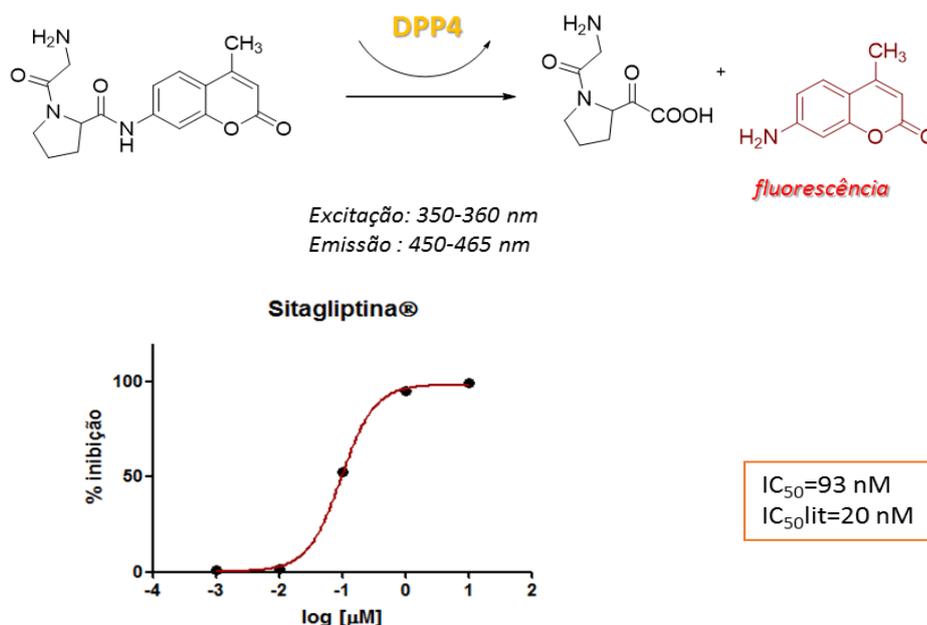
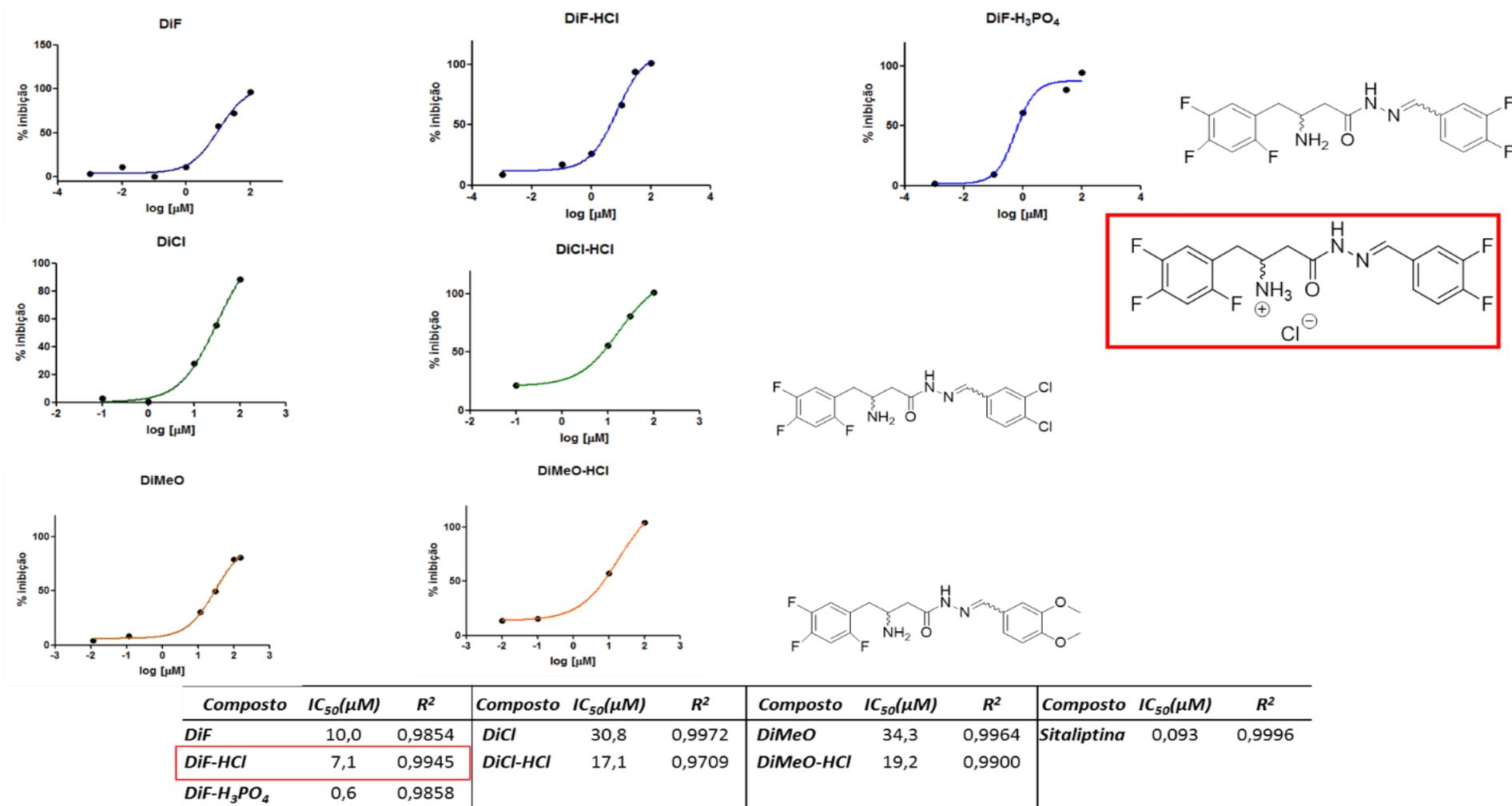


Figura 9. DPP (IV) Inhibitor Screening Assay kit e curva resposta do padrão Sitagliptina.



Dados processados no programa GraphPad Prism 5.0

Figura 10. Curva resposta dos compostos DiF, DiCl e DiMeO. No quadro vermelho está representado a molécula do LASSBio-2124 utilizado no tratamento do presente estudo.

1.5.2 Características fisicoquímicas do LASSBio-2124

Todos os resultados referentes a fisicoquímica do novo protótipo foram realizados pelo aluno de doutorado Luis Eduardo Reina, o qual sintetizou LASSBio-2124, sob orientação da professora Lídia Moreira Lima, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Alguns resultados serão brevemente descritos a seguir.

Em projetos de desenvolvimento de drogas, os protótipos ou candidatos apresentam características fisicoquímicas adequadas que asseguram boa biodisponibilidade. Este parâmetro é governado por diferentes fatores inter-relacionados, como permeação, ligação às proteínas plasmáticas, estabilidade do metabolismo, solubilidade aquosa e assim por diante. A última questão (solubilidade) é bastante importante, pois o primeiro objetivo no desenvolvimento de um fármaco para o tratamento do DM2 é a administração enteral, preferencialmente por via oral. O teste foi realizado tanto para base livre LASSBio-214, como para os seus sais cloridrato e di-hidrogenofosfato. Como esperado, os cloridratos e di-hidrogenofosfatos mostraram maior solubilidade aquosa do que suas respectivas bases livres.

A constante de dissociação, geralmente expressa como logaritmo negativo (pKa), indica o grau de ionização de compostos ácidos / básicos e é um parâmetro importante no desenvolvimento de fármacos, pois influencia as propriedades fisicoquímicas como lipofilicidade, solubilidade e permeabilidade. Pode também contribuir para propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Em resumo, o valor de pKa determinado para LASSBio-2124 foi de aproximadamente 7,55, o que indica que em pH fisiológico (7,4) esse composto existe em uma mistura de formas dissociadas e não dissociadas (com porcentagens próximas a 50% - 60%), com o equilíbrio tendendo para a forma dissociada. Esses dados podem explicar a grande solubilidade aquosa desses compostos e antecipar que, semelhante à sitagliptina, uma interação do tipo ponte iônica pode estar envolvida no reconhecimento do grupo β -amino com os resíduos Glu no sítio ativo da DPP-4.

Um dos parâmetros mais comuns e importantes na caracterização do perfil de fármaco-semelhança de um fármaco-candidato é o estudo de sua

estabilidade química em sistema aquoso em diferentes sistemas de pH. Independentemente da via de administração, seja parenteral ou enteral, a droga candidata deve manter suas propriedades físicas e químicas inalteradas para atingir seu alvo (geralmente enzima ou receptor) em uma concentração suficiente para alcançar o efeito terapêutico desejado.

2 JUSTIFICATIVA

Devido a mudança de estilo de vida e de comportamento da população, DM2 tornou-se um problema de saúde pública mundial (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001) e está associada com o aumento de risco prematuro para diversas complicações, tais como as doenças cardiovasculares (ROGLIC G., UNWIN N., BENNETT P.H., MATHERS C., TUOMILEHTO J., NAG S., CONNOLLY V., 2005). A evolução do DM2 se inicia com a resistência à insulina, e este estado pode durar vários anos antes do diagnóstico (RESNICK; HOWARD, 2002). O acúmulo de lipídios, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias causam ativação de quinases sensíveis ao estresse com consequente inibição da sinalização da insulina (BUNNER; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014). Alterações na concentração e na funcionalidade da insulina promovem anormalidades no metabolismo lipídico favorecendo as complicações macrovasculares no diabetes (PITOCCO *et al.*, 2013).

Portanto, esta tese apresenta como meta a identificação de um novo anti-hiperglicemiante, com características estruturais que conferem inibir DPP4 e atuar como anti-inflamatório. Assim, poderia surgir como alternativa para o tratamento do DM2 não somente como redutor da hiperglicemia como também atuar para prevenir ou controlar as complicações crônicas consequentes ao DM2, a exemplo a nefropatia e doenças cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos farmacológicos de novo derivado iDPP4, LASSBio-2124, comparativamente ao seu protótipo, LASSBio-1772 e sitagliptina em modelo animal de DM2 que apresenta alterações renais e cardiovasculares.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação dos seguintes parâmetros nos diferentes grupos experimentais:
 - distúrbio metabólico
 - função renal
 - função cardíaca
 - reatividade vascular
- Investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na ação de LASSBio-2124 no DM2

4 METODOLOGIA

4.1 Local da pesquisa

Este projeto foi realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e com a colaboração do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) que compõem o Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2 Comitê de ética

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas de Boas Práticas de Uso em Experimentação Animal, com aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRJ sob o número de protocolo DFBCICB041.

4.3 Animais e desenho experimental

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 240 e 300 g provenientes do biotério do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo mantidos a temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro e escuro de 12/12 h e água filtrada *ad libitum*. Para a indução do DM2 foi introduzida uma ração hipercalórica (PRAGSOLUÇÕES biociências) composta por (kcal%): proteína, 20; carboidrato, 25; gordura, 45 (Tabela 1). Após 2 semanas do início desta dieta alimentar, os animais foram submetidos a administração única por via intravenosa de estreptozotocina (STZ), 35 mg/kg (SASIDHARAN et al., 2013; SRINIVASAN et al., 2005). Em contra partida, os

animais do grupo controle (não diabético) receberam durante todo o protocolo dieta normal.

Tabela 1. Composição da dieta hipercalórica

Constituintes	Controle (Kcal%)	Hipercalórica (Kcal%)
Gordura	10	45
Proteína	20	20
Carboidrato	70	35
Total	100	100

Os animais foram considerados diabéticos quando glicemia \geq 250 mg/dL, após uma semana da injeção de STZ. Após 10 semanas de dieta hipercalórica associada a injeção de STZ, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (6 animais em cada) tratados por via oral durante 2 semanas com: veículo, sitagliptina, LASSBio-1772 e LASSBio-2124. Os tratamentos realizados foram divididos em grupos como segue: DM2 + LASSBio-1772 (22,6 μ mol/kg), grupo DM2 + sitagliptina (22,6 μ mol/kg) e grupo DM2 + LASSBio-2124 (22,6 μ mol/kg) (Figura 11).

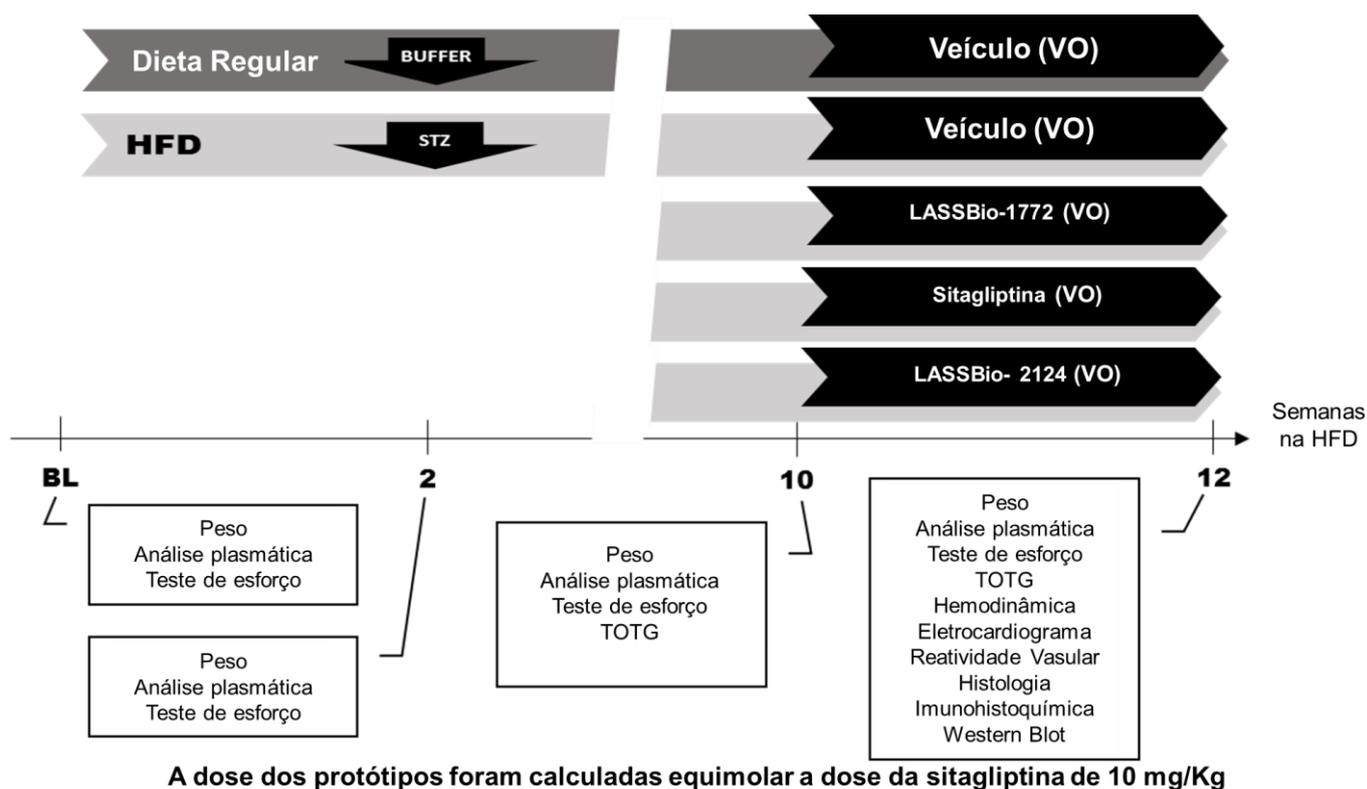


Figura 11. Delineamento experimental. HFD = *High Fat Diet*, STZ = estreptozotocina, VO = Via Oral e TOTG = Teste Oral de Tolerância a Glicose.

Dentre o total de 90 animais utilizados nesta tese, 13 não evoluíram com DM2, 37 animais diabéticos evoluíram ao óbito antes do término do protocolo experimental.

4.4 Análise do distúrbio metabólico

Durante o protocolo experimental, foi avaliado o ganho de peso corporal semanalmente e amostras de sangue foram coletadas da veia caudal dos animais após um jejum de 12-14 h para análise dos seguintes parâmetros: glicemia, insulina, colesterol total e triglicerídeos plasmáticos. A glicose foi determinada utilizando o sistema de monitoramento Accu-Chek® (ROCHE, Alemanha), a insulina utilizando um kit comercial (Insulin Ultrasensitive ELISA, Alemanha) e colesterol e triglicérides foram determinados usando kits colorimétricos (Bioclin, MG, Brasil). Além disso, a tolerância à glicose também foi avaliada por administração oral de glicose 2 g/kg, após 12-14 h de jejum dos animais e monitoramento sequencial da glicemia por 120 min. O HOMA, um

modelo matemático para avaliar a homeostase da insulina e prever a resistência à insulina foi calculado através de programa fornecido pela Universidade de Oxford (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>).

4.5 Avaliação da função renal

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas (Tecniplast) que possibilitam o monitoramento metabólico preciso com determinação de consumo de ração e água e produção de fezes e urina. Eles foram aclimatados por 24 horas nas gaiolas metabólicas, seguida de medida do volume de ingestão hídrica (mL/dia), volume de urina excretada (mL/dia), fluxo urinário (mL/min), massa de ração ingerida (g/dia) e massa de fezes eliminada (g/dia). O fluxo urinário de 24 h (V) foi também calculado. Amostras de urina (1 mL) foram coletadas e centrifugadas a 13.500 rpm por 10 min por 3 vezes consecutivas para determinação da presença de proteína (mg/ml) através da utilização do kit Gold Analisa (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

4.6 Avaliação da função cardiovascular

4.6.1 Teste ergométrico em esteira

Para a avaliação da capacidade de esforço utilizou-se o teste da esteira ergométrica (Insight ®, MG, Brasil), que consiste basicamente na observação do tempo percorrido pelo animal, sendo os três primeiros minutos a uma velocidade média de 6 m/min, do quarto ao sexto a 12 m/min e até fadiga do animal a 18 m/min a uma inclinação de 5 graus. Os resultados obtidos foram o tempo percorrido (s) e a capacidade de esforço (kg.m).

4.6.2 Medida da pressão arterial de forma não invasiva

Através do plestimógrafo de cauda (Modelo LE 5001) foram determinados os parâmetros: pressão arterial sistólica, diastólica e média. Estes animais foram previamente aclimatados no recipiente de contenção sob uma fonte de calor radiante (cerca de 37°C). Na porção proximal da cauda

colocou-se o manguito para em seguida obter a medida da pressão arterial que foi registrada em vários momentos do protocolo experimental: controle, antes (após 2 sem de dieta HFD) e depois da injeção de STZ e ainda ao término do tratamento, conforme figura 8.

4.6.3 Eletrocardiografia

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (60 e 10 mg/kg, i.p.) e eletrodos foram posicionados no tórax dos animais para obtenção do eletrocardiograma (ECG) na derivação D II, cuja aquisição e análise foi realizada utilizando-se o programa LabChart (versão 7.0, ADInstruments, EUA).

4.6.4 Medida de forma invasiva de parâmetros hemodinâmicos

Após registro do ECG, um cateter heparinizado (10 ul/ml de salina) e conectado a um transdutor de pressão (MLT884, ADInstruments) foi inserido na artéria carótida direita para inicialmente registrar a pressão sistólica e diastólica. Em seguida, este cateter foi reposicionado na cavidade ventricular esquerda para registros dos seguintes parâmetros hemodinâmicos: pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); pressão diastólica final (PDFVE), bem como $+dP/dt$ (velocidade de contração do VE) e $-dP/dt$ (velocidade de relaxamento). Todos os registros foram armazenados em computador para posterior análise dos resultados (Powerlab, ADInstruments, EUA) usando o programa Lab Chart (versão 7.0, ADInstruments, EUA).

4.7 Reatividade vascular

Para avaliar a reatividade vascular dos animais, a porção torácica da aorta foi dissecada e seccionada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Dois anéis de cada animal foram preparados para registro de tensão isométrica e mantidos em cubas experimentais preenchidas com 20 mL de solução Tyrode modificada constituída de (mM): NaCl, 123; KCl, 4,7; MgCl₂, 1,2; KH₂PO₄, 4,

1,2; dextrose, 11,5; NaHCO₃, 15,5; CaCl₂, 1.2, continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantido a 37°C e pH 7,4. Os dados foram armazenados em computador para posterior análise utilizando o programa AxoScope 8.1 (Axon Instruments, Inc).

Após o período de estabilização (30 min), a aorta foi exposta a concentrações crescentes de fenilefrina (Phe, 1 nM - 10 µM), seguida de adição de concentrações crescentes de acetilcolina (ACh, 1 nM - 10 µM), a fim de avaliar a função endotelial através da observação do relaxamento vascular em resposta a ACh.

4.8 Análise histopatológica do coração e rim

Ao final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados sob alta dose dos anestésicos (cloridrato de cetamina 100 mg / kg ip e xilazina 5 mg / kg ip) para a retirada do coração e rins. Após pesagem, os tecidos foram armazenados a -80° C. Para análise histológica, rins direitos e ápices cardíacos foram fixados em formol e embebidos em parafina. Os blocos contendo o tecido foram seccionados a 5 µm e corados com hematoxilina e eosina para exame sob um microscópio óptico (Axiostar, Zeiss, Alemanha).

O conteúdo de colágeno do tecido ventricular esquerdo e do tecido tubulointersticial renal foi analisado em cortes corados com picro sirius vermelho e expressos como média da área corada de vermelho (15 a 20 campos com aumento de 400x) (RUEDEN et al., 2017; SCHINDELIN et al., 2012). Por outro lado, a lesão tubular e glomerular foi identificada através da coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS). A área mesangial foi medida em 20 glomérulos corticais aleatórios (aumento de 1000x) e expressa como uma fração da área de tufo glomerulares. A lesão tubulointersticial foi analisada em toda a seção por meio de um escore semi-quantitativo baseado na frequência e gravidade (0: ausente; 1: mínima; 2: leve; 3: moderada; 4: severa) de cinco parâmetros (edema intersticial, luminal cilindros, dilatação tubular, acúmulo de glicogênio intracelular e lesão epitelial) (FRAZIER et al.,

2012; GOMES et al., 2014; GRGIC et al., 2012; LANDGRAF et al., 2014; PORTELLA et al., 2013).

4.9 Imunohistoquímica

Imunohistoquímica em cortes histológicos de ápice do coração provenientes de animais diabéticos tratados ou não com LASSBio-2124 foi utilizada para avaliação da via de sinalização de cinases protéicas ativadas por mitógeno (MAPK), ou seja, especificamente do envolvimento da ativação de p38-alfa. Os cortes foram hidratados e lavados com tampão fosfato-salina (PBS) por 5 minutos e, após, recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) por 20 minutos, foi realizado um bloqueio de ligações inespecíficas com PBS-BSA a 0,1% por 30 minutos. Procedeu-se então a incubação em câmara úmida com o anticorpo primário (anti-p38- α , AbCam, ab7952) diluído a 1:200 em PBS-BSA 0,1% durante a noite a 4°C. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas em H₂O₂ 3% para bloqueio de peroxidases endógenas para em seguida, serem incubadas com o anticorpo secundário (Nichirei, 414191F) diluído em 1:3. A revelação foi realizada utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos e contra-coloração por 5 minutos em hematoxilina de Harris. Após desidratação e montagem das lâminas, a ativação de p38 foi analisada pelo percentual de núcleos de cardiomiócitos encontrados com coloração marrom pela análise de oito campos no ventrículo esquerdo sob aumento de 1000x.

4.10 Expressão de proteínas em tecido cardíaco

4.10.1 Extração da proteína tecidual

Imediatamente após a retirada dos tecidos cardíacos provenientes dos ratos dos diferentes grupos experimentais foram congelados em nitrogênio líquido para futura homogeneização. Os tecidos cardíacos foram homogeneizados num homogeneizador de vidro potter usando tampão de lise

(12,5% de sacarose, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) na presença de 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonilo, 1 mM de benzamidina, 1 mM de ditioneitol e 1 µg / mL da solução inibidora da protease polipeptica (pepstatina, quimostatina, aprotinina, leupeptina e antipaina). A mistura obtida foi centrifugada durante 5 min a 1000 x g e o sobrenadante (cerca de 1 mL) coletado e congelado a -80°C.

4.10.2 Análise de Western Blot

As concentrações totais de proteína em cada amostra foram determinadas através de espectrofotômetro usando o método de Bradford. Quantidades iguais de proteína (50-100 µg) foram separadas por um gel de SDS-PAGE a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema semi-seco (Bio-Rad, EUA). As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em PBS contendo 0,1% de tween 20 e incubadas com anticorpos primários contra proteínas específicas: moduladora da contratilidade cardíaca, cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a); reguladora de morte celular, célula B de linfoma 2 (BCL2); indutora de apoptose e reparo celular, caspase-3 ativa, receptor para produtos finais de glicação avançada, RAGE (Abcam); fosfolamban (PLB) (Santa Cruz Biotecnologia, Dallas, Texas, EUA); fosfolamban fosforilada (p-PLB); TNFα e (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os sinais foram visualizados usando um kit de quimioluminescência *Super Signal West Pico* (Pierce, Rockford, IL, EUA) e finalmente expostos a filmes radiográficos. Os filmes foram escaneados e a quantificação da densidade de banda de proteínas foi normalizada ao GAPDH usando Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, EUA).

4.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± SEM. As análises estatísticas foram realizadas para comparação de múltiplos grupos, a análise

de variância unidirecional (one-way ANOVA) ou análise de variância bidirecional (two-way ANOVA), seguidos pelo teste post-hoc de Tukey. O nível mínimo aceitável de significância foi $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism, versão 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Influência dos derivados no distúrbio metabólico induzido pelo DM2

Durante o período do protocolo experimental, os animais dos diferentes grupos foram semanalmente avaliados quanto ao ganho de peso corporal. Pode-se notar na figura 12A que houve redução do ganho de peso corporal no grupo diabético quando comparado ao grupo normal (não diabético). Ao final das 12 semanas, o peso foi de $467,0 \pm 13,2$ e $300,0 \pm 27,3$ g para os animais dos grupos normal e DM2 tratados com veículo, respectivamente. O tratamento com LASSBio-1772, LASSBio-2124 e a sitagliptina (iDPP4 de referência) não interferiu com a perda de ganho ponderal induzida pelo DM2 (Figura 12A e 13A).

Ao final do protocolo (12 semanas), o nível de glicose plasmática (mg/dL) foi aumentado de $100,8 \pm 3,1$ para $423,5 \pm 8,1$ no grupo DM2, mas esta hiperglicemia foi reduzida após tratamento com LASSBio-1772 ($300,0 \pm 15,6$ mg/dL), LASSBio-2124 ($319,8 \pm 13,2$ mg/dL) e sitagliptina ($279,7 \pm 17,8$ mg/dL) (Figura 12B e 13B). Mesmo não ocorrendo a normalização da glicemia com os derivados em teste, a redução em torno de 30% foi comparável ao efeito de dose equimolar da sitagliptina que é fármaco utilizado clinicamente para o tratamento de DM2. Duas horas após o TOTG, o nível plasmático de glicose voltou ao basal em animais diabéticos tratados com LASSBio-1772, sitagliptina ou LASSBio-2124 (Figura 12C e 13C).

A insulina plasmática (pmol/L) diminuiu em animais diabéticos de $102,5 \pm 3,6$ para $36,5 \pm 0,6$ e recuperou para $57,4 \pm 5,1$; $57,1 \pm 9,1$ e $71,2 \pm 8,7$ após tratamento com LASSBio-1772, LASSBio-2124 e sitagliptina, respectivamente (Figura 12F e 13F). A partir dos valores de insulina e glicose plasmática foi calculado o índice HOMA-IR (modelo de avaliação homeostática) (Figura 12G e 13G) na expectativa de se referir a resistência à insulina do grupo DM2 que apresentou valor maior ($7,8 \pm 3,5$) que o não diabético ($1,8 \pm 0,1$). Apesar do LASSBio1772 não interferir com este indicador, tanto LASSBio-2124 como sitagliptina reduziram para valores semelhantes ao do grupo normal.

Todas as substâncias melhoraram o perfil lipídico dos animais diabéticos, em destaque o LASSBio-2124 que reduziu os níveis de colesterol e triglicérides (mg/dL) de $76,8 \pm 8,0$ para $42,7 \pm 3,2$ e de $229,7 \pm 25,4$ para $100,7 \pm 17,1$, respectivamente.

5.2 Função renal dos animais diabéticos após tratamento com sitagliptina, LASSBio-1772 e LASSBio-2124

Os animais diabéticos apresentaram intensa poliúria com um aumento do fluxo urinário de $0,50 \pm 0,01$ para $5,3 \pm 0,2$ mL/h (Figura 14A e 15A). No entanto, apenas LASSBio-2124 reduziu parcialmente o fluxo urinário para $4,7 \pm 0,3$ mL/h. Amostras de urina foram coletadas para avaliar a proteinúria em animais diabéticos tratados ou não com os derivados (Figura 14B e 15B). A eliminação urinária de proteínas de $23,7 \pm 1,5$ mg em 24h foi detectada nos animais diabéticos após as 12 semanas de doença. Este parâmetro foi normalizado apenas após tratamento com LASSBio-2124 durante 14 dias, onde os animais diabéticos tratados apresentaram $13,3 \pm 2,8$ mg de proteína na urina de 24 h ($P < 0,05$) comparável ao grupo não-diabético (normal) de $10,6 \pm 0,6$ mg (Figura 14B e 15B).

A análise histopatológica do rim demonstrou que os animais diabéticos apresentavam uma evidente expansão da matriz mesangial glomerular e aumentado depósito de colágeno quando comparados aos animais não diabéticos (Figura 14C e 15C). Tanto LASSBio-1772 como LASSBio-2124 reduziram a área de matrix mesangeal, sem no entanto alterarem o depósito de colágeno. O grau de lesão renal induzido pelo DM2 foi avaliado através da observação de edema intersticial, dilatação tubular, injúria epitelial e acúmulo de glicogênio nos rins provenientes de animais diabéticos ou não (Figura 14E). Observou-se que os diabéticos apresentaram injúria renal de leve a moderada gravidade (Figura 14F) que não foi recuperada com nenhuma das formas de tratamento inclusive com LASSBio-2124 (Figura 15E).

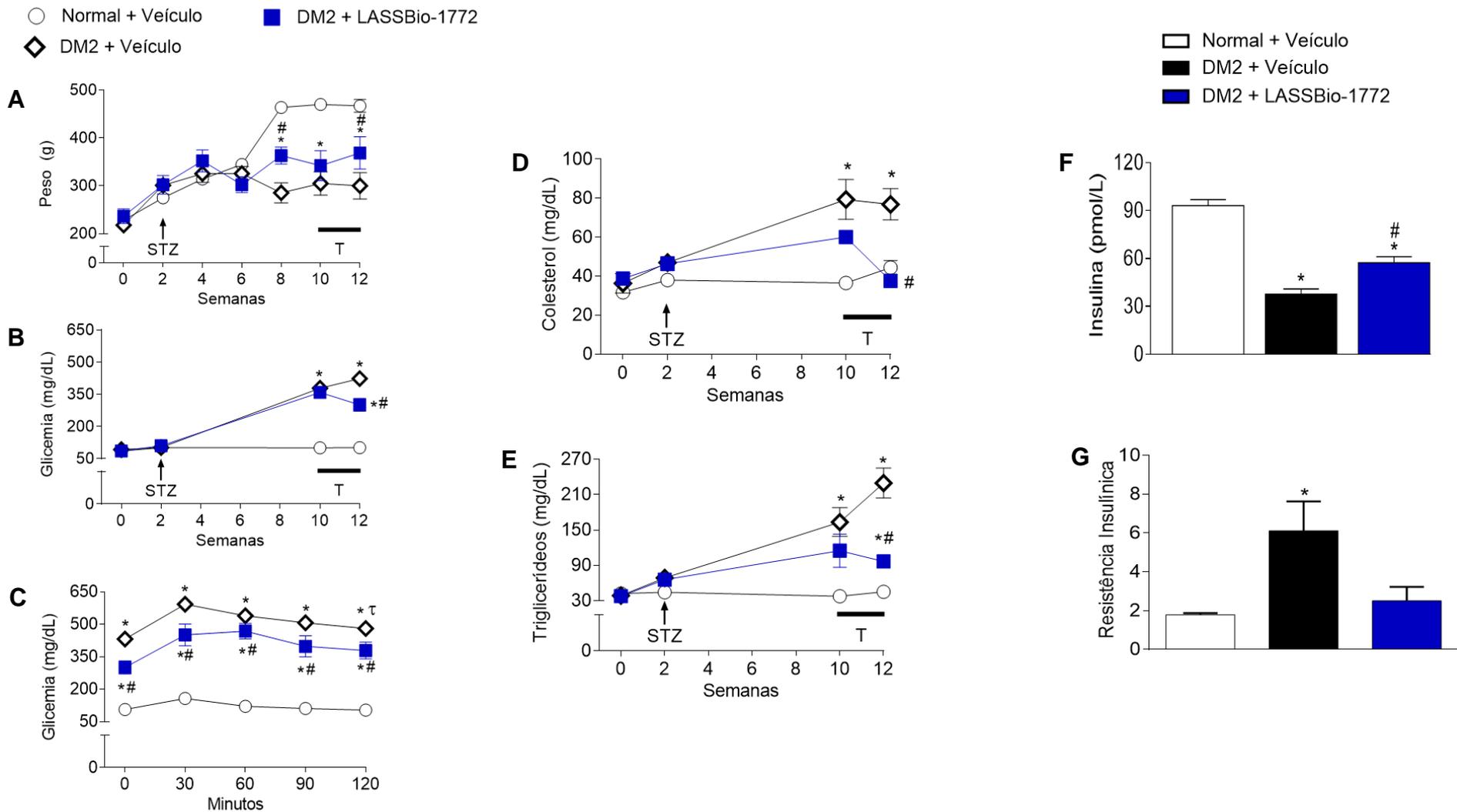


Figura 12. Efeito de LASSBio-1772 no distúrbio metabólico. (A) Peso corporal, (B) Glicose plasmática, (C) Teste oral de tolerância à glicose após 2 semanas de tratamento oral, (D) Colesterol e (E) Triglicerídeos. A (F) insulina após 2 semanas de tratamento por via oral. Após o cálculo do índice HOMA obtivemos a (G) Resistência insulínica. Os dados representam a média ± S.E.M. (n = 6 ratos por grupo). * P < 0,05 vs. Normal + Veículo; # P < 0,05 vs. DM2 + Veículo; & P < 0,05 vs. DM2 + Sitagliptina; †P < 0,05 vs. 120 min. Análise por two-way e one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. HFD = *High Fat Diet*, STZ = Estreptozotocina, T = Tratamento.

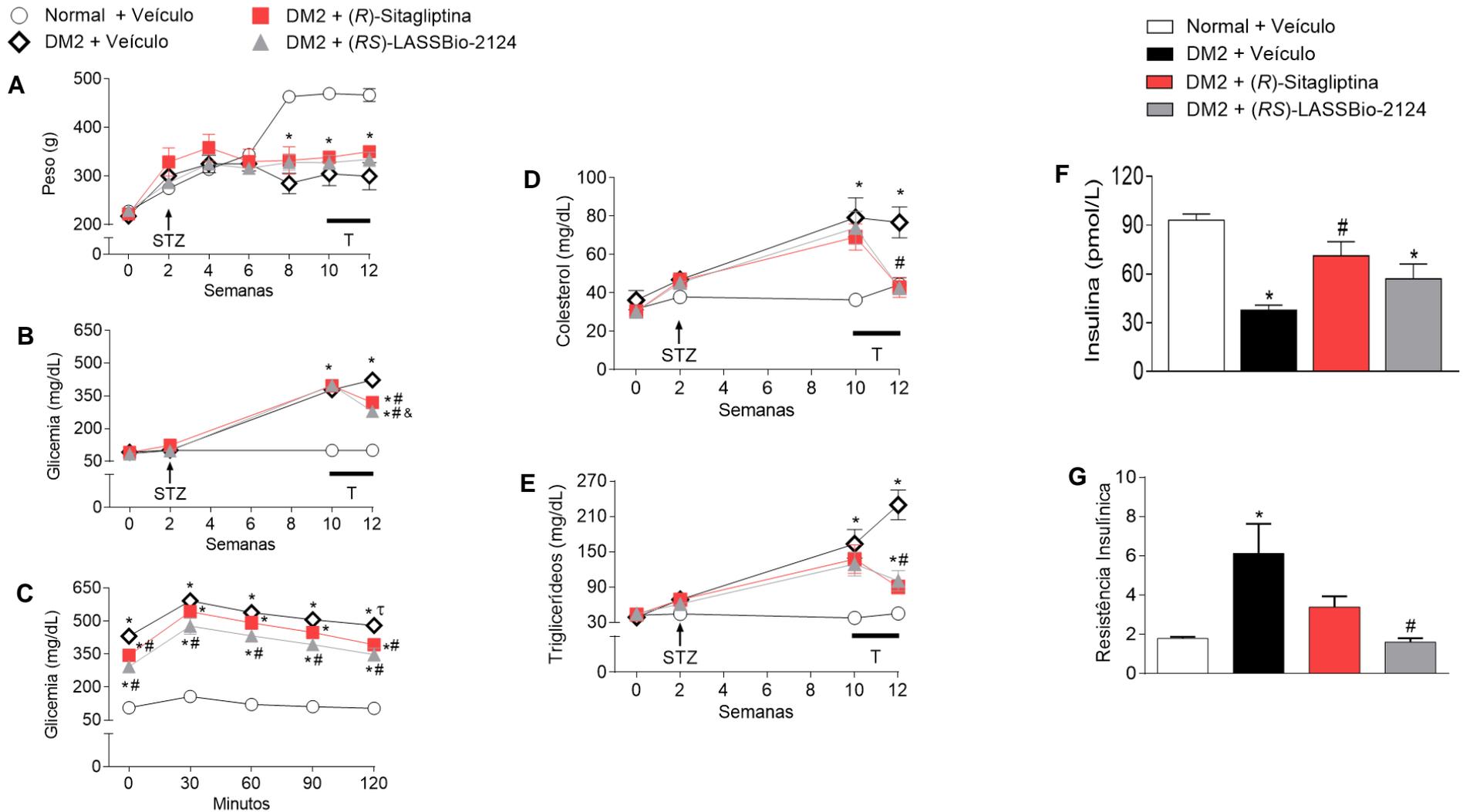


Figura 13. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina no distúrbio metabólico. (A) Peso corporal, (B) Glicose plasmática, (C) Teste oral de tolerância à glicose após 2 semanas de tratamento oral, (D) Colesterol e (E) Triglicerídeos (A) (F) insulina após 2 semanas de tratamento por via oral. Após o cálculo do índice HOMA obtivemos a (G) Resistência insulínica. Os dados representam a média ± S.E.M. (n = 6 ratos por grupo). * P < 0,05 vs. Normal + Veículo; # P < 0,05 vs. DM2 + Veículo; & P < 0,05 vs. DM2 + Sitagliptina; † P < 0,05 vs. 120 min. Análise por two-way e one-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. HFD = High Fat Diet, STZ = Estreptozotocina, T = Tratamento.

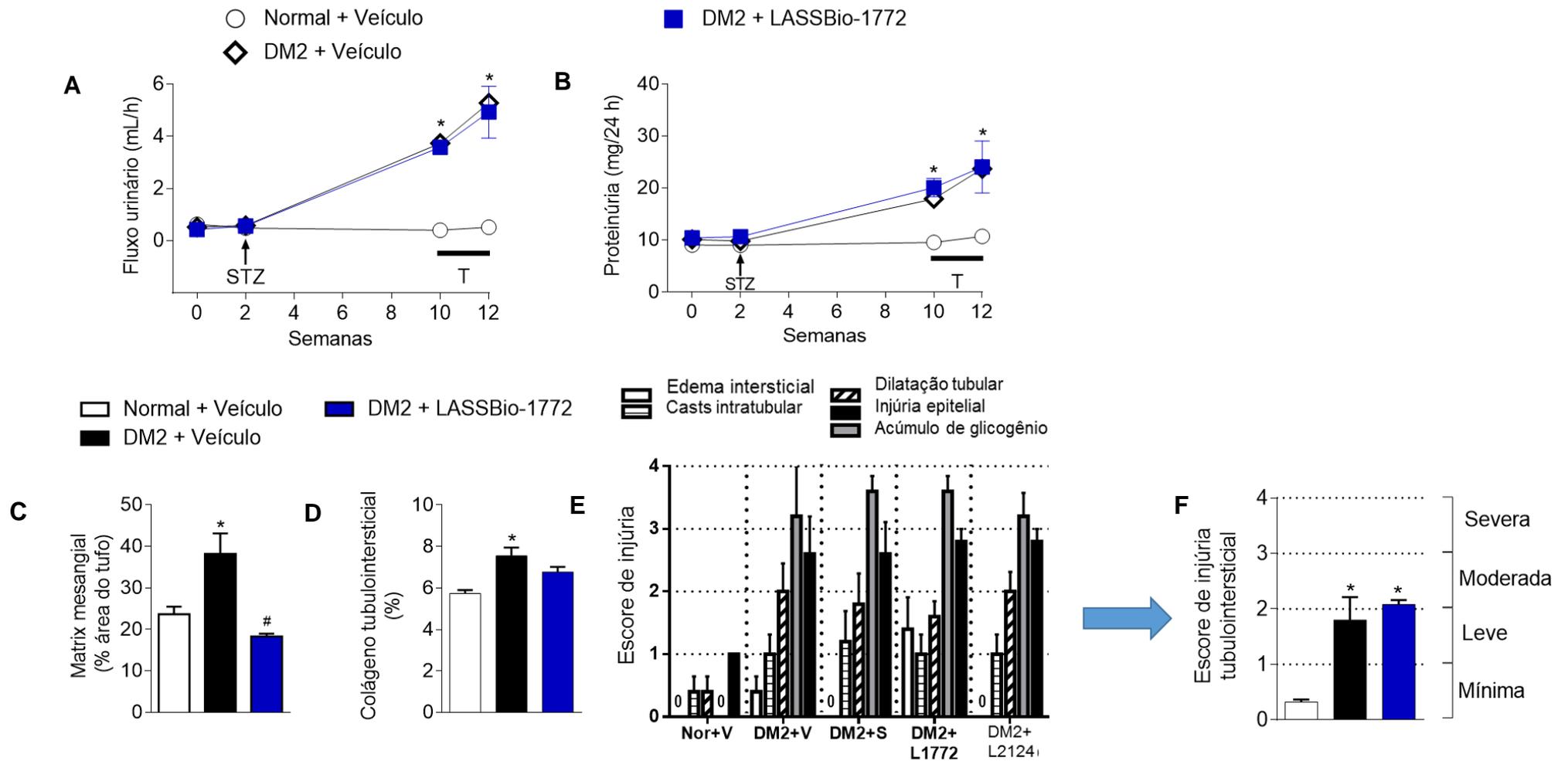


Figura 14. Efeito de LASSBio-1772 na função renal de animais diabéticos. Fluxo urinário (A) e proteinúria de 24 horas (B). Expansão mesangial acentuada (C) foi encontrada apenas em animais diabéticos tratados com veículo ($P < 0,05$ vs. Normal). Frações de colágeno (D), injúrias tubulointerstitiais (E) e média das injúrias ranqueadas em scores (F) ($P < 0,05$ vs. DM2 + Veículo). Análise por ANOVA two-way e ANOVA one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. * $P < 0,05$ vs. Normal + Veículo e # $P < 0,05$ vs. DM2 + Veículo.

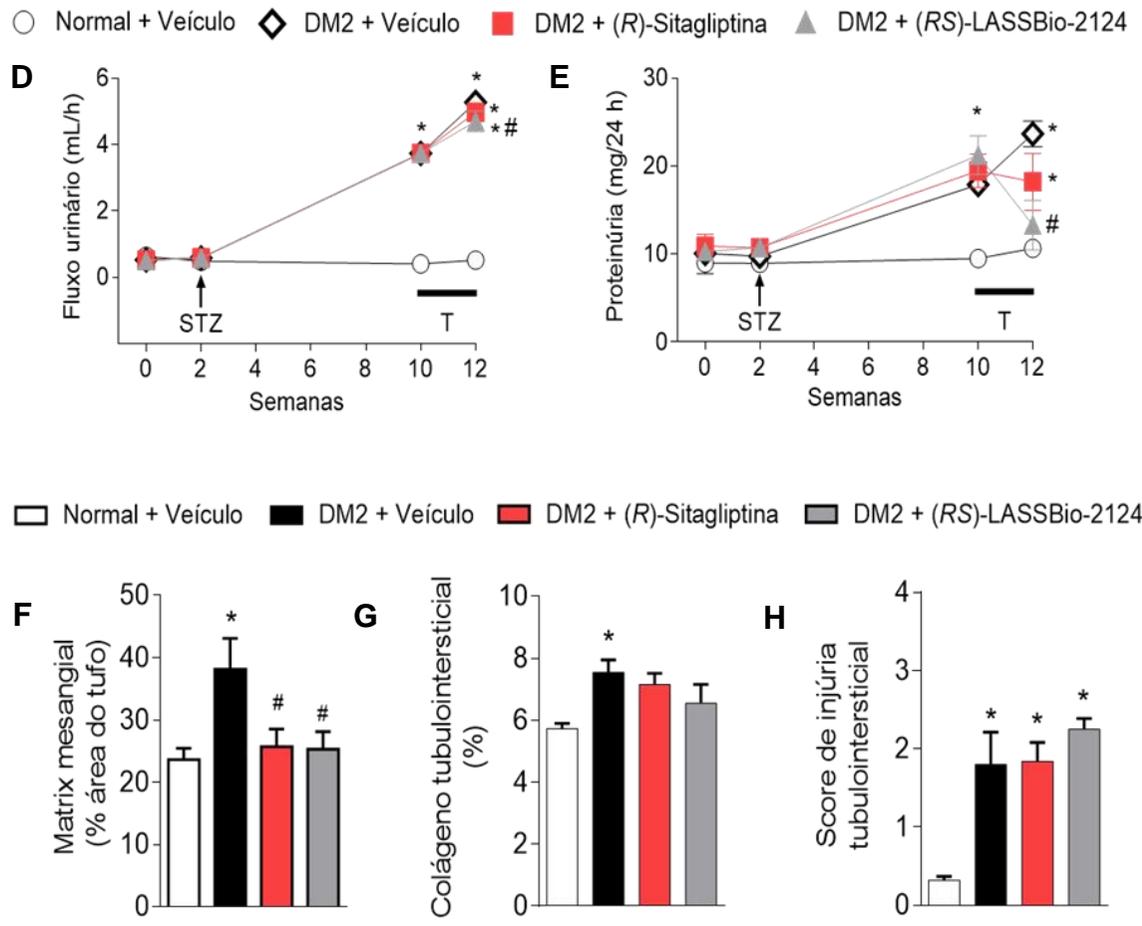
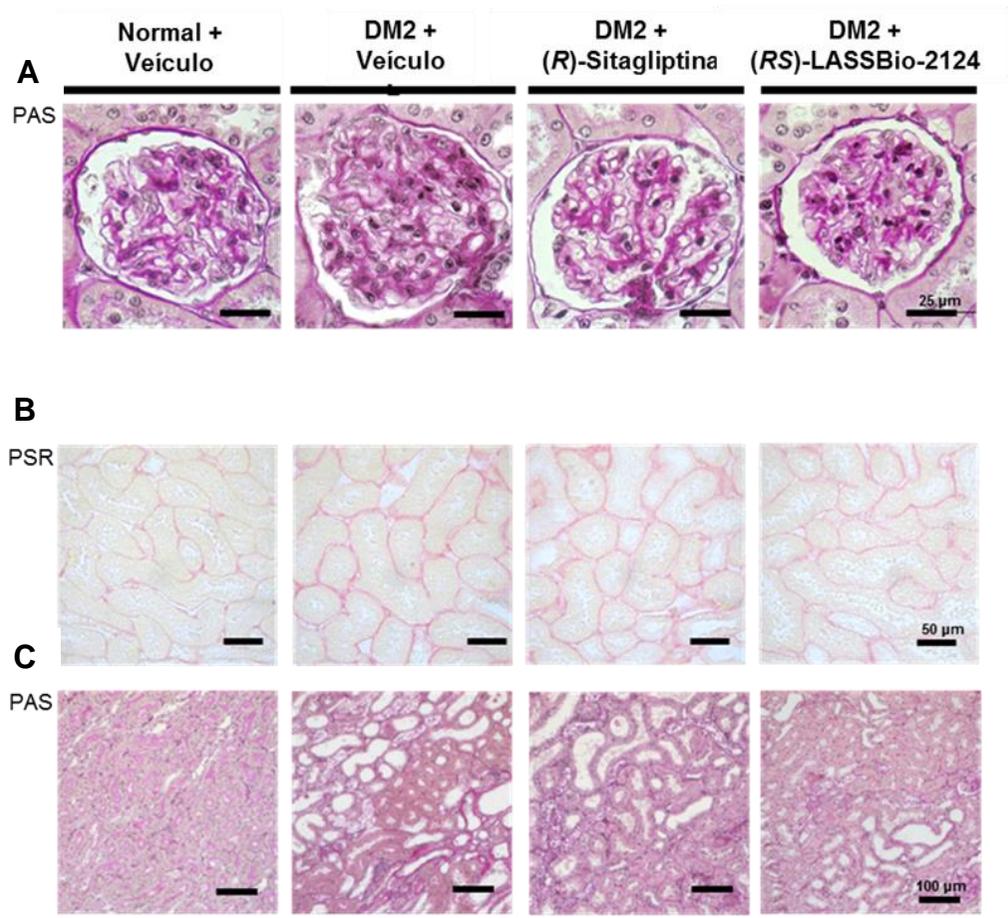


Figura 15. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina na função renal de animais diabéticos. Imagens representativas de glomérulos corticais (A, coloração PAS; barra: 25 µm) e epitélio tubular (B, coloração PSR, barra: 50 µm e C, coloração PAS, barra: 100 µm) mostrando alterações histológicas em animais diabéticos. Fluxo urinário (D) e proteinúria de 24 horas (E). Expansão mesangial acentuada (F) foi encontrada apenas em animais diabéticos tratados com veículo (P <0,05 vs. Normal). Frações de colágeno (G) e média das injúrias ranqueadas em scores (H) (P <0,05 vs. DM2 + Veículo). Análise por ANOVA two-way e ANOVA one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. * P <0,05 vs. Normal + Veículo e # P <0,05 vs. DM2 + Veículo. PAS = ácido periódico de Schiff, PSR = Picro-Sirius, T = Tratamento.

A hipertrofia glomerular observada no grupo diabético em relação aos animais normais foi corrigida com os tratamentos LASSBio-1772, sitagliptina e LASSBio-2124, conforme figura 14 C e 15 C. O aumento de depósito de colágeno túbulo intersticial observado nos animais diabéticos não foi alterado / reduzido com tratamento de nenhuma das substâncias, como pode-se notar nas pranchas histológicas da figura 15G. Apesar da ausência de melhora da injúria túbulo intersticial após tratamento de curta duração de LASSBio-1772 e LASSBio-2124, o aumento do peso dos rins dos animais diabéticos foi reduzido pelo LASSBio-2124 conforme mostrado na figura 16.

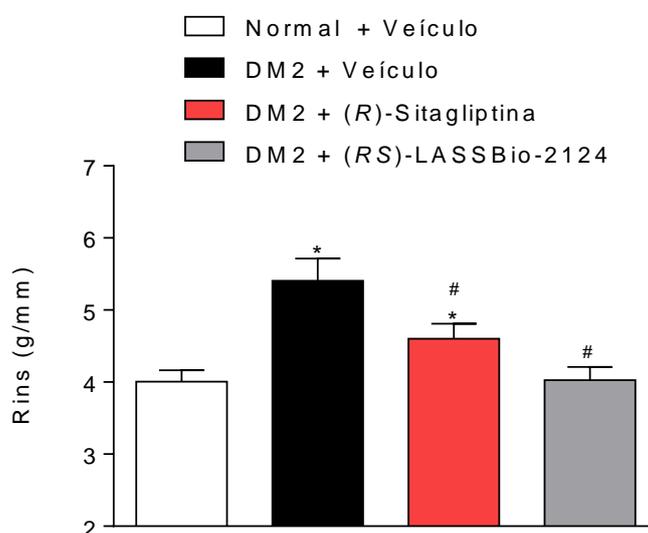


Figura 16. Aumento dos rins induzido pelo DM2. P <0,05 vs. DM2 + Veículo. Análise por ANOVA one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. * P <0,05 vs. Normal + Veículo e # P <0,05 vs. DM2 + Veículo.

5.3 Função cardíaca dos animais diabéticos após tratamento com derivados

5.3.1 Efeito do novo iDPP4 na reduzida capacidade de esforço dos diabéticos

Os animais diabéticos apresentaram uma reduzida capacidade de esforço evidenciado pelo menor tempo de permanência na esteira ergométrica (Figura 17). O grupo não diabético percorreu $32,0 \pm 2,7$ min comparado ao tempo de $2,0 \pm 0,5$ min pelo grupo DM2. Nenhum dos tratamentos, seja com

LASBio-1772, sitagliptina ou LASSBio-2124 melhorou a intolerância ao exercício induzida pelo DM2 nos ratos (Figura 17).

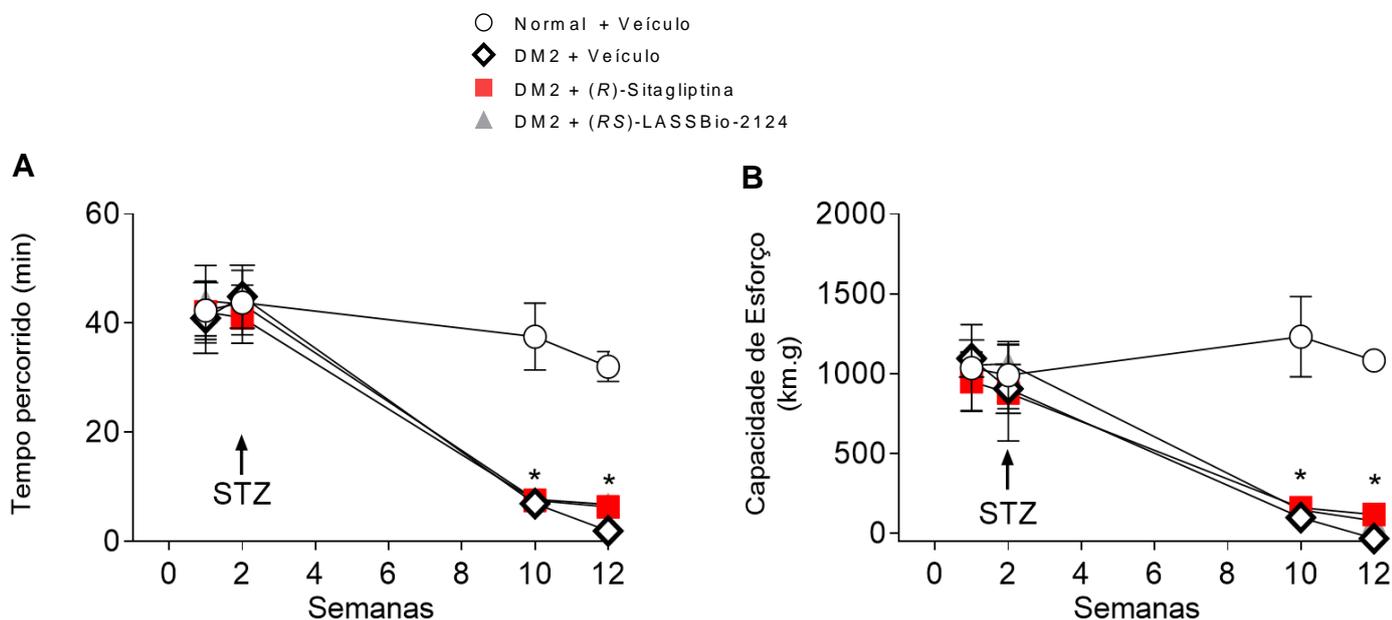


Figura 17. Efeito de LASSBio-2124 na intolerância ao exercício induzido pelo DM2. Foram avaliados parâmetros como tempo percorrido (A) e capacidade de esforço (B). $P < 0,05$ vs. DM2 + Veículo. Análise estatística: ANOVA two-way e ANOVA one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. * $P < 0,05$ vs normal + veículo e # $P < 0,05$ vs DM2 + veículo.

5.3.2 Efeito dos derivados na pressão arterial de animais diabéticos

Dez e 12 semanas após a indução do DM2, a pressão sistólica, diastólica e média foram medidas de forma não invasiva através da pletismografia (Figura 18). Os animais do grupo DM2 apresentaram hipertensão arterial com pressão sistólica e diastólica de $219,9 \pm 8,8$ e $162, \pm 7,2$, respectivamente. Observe nas figuras 18A e 18B que o tratamento por 2 semanas com LASSBio-1772 diminuiu as pressões sistólica e diastólica para $169,8 \pm 5,9$ e $136,0 \pm 4,4$ mmHg, respectivamente.

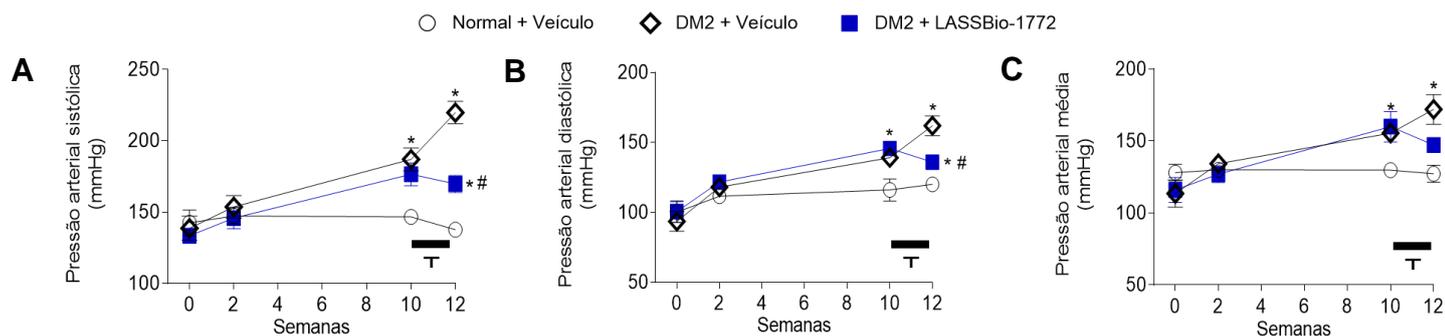


Figura 18. Efeito de LASSBio-1772 na pressão arterial de animais diabéticos. (A) Pressão arterial sistólica, (B) pressão arterial diastólica e (C) pressão arterial média (PAM) nos diferentes grupos experimentais. Os dados representam a média \pm S.E.M. ($n = 6$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ vs normal + veículo e # $P < 0,05$ vs DM2 + veículo, ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. T = Tratamento.

De forma semelhante, o novo derivado LASSBio-2124 também diminuiu a pressão arterial média para valor igual ao grupo não-diabético (Figura 19). A resposta anti-hipertensiva de LASSBio-2124 que reduziu as pressões sistólica e diastólica para $143,8 \pm 12,4$ e $111,5 \pm 9,0$ mmHg foi comparável ao efeito da sitagliptina (Figura 19A e 19B).

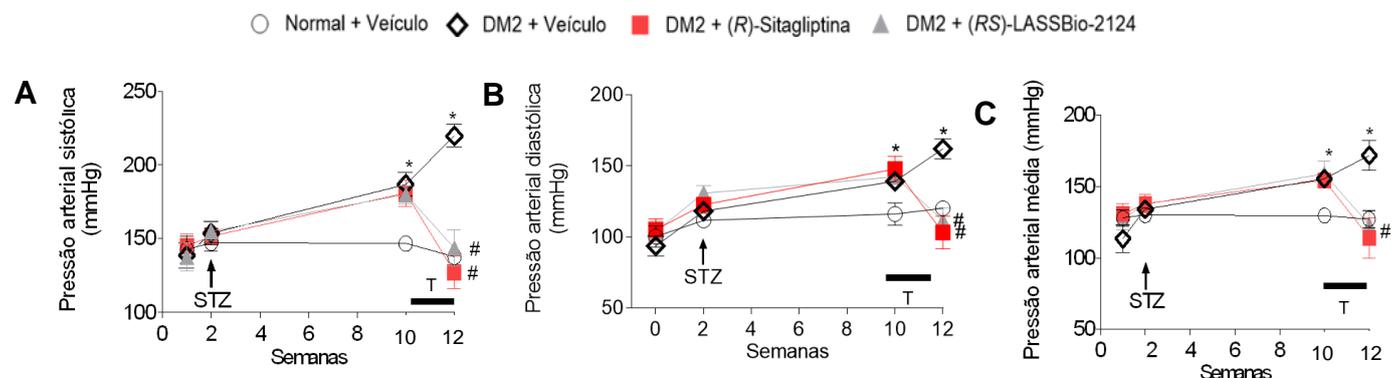


Figura 19. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina na pressão arterial de animais diabéticos. (A) Pressão arterial sistólica, (B) pressão arterial diastólica e (C) pressão arterial média (PAM) nos diferentes grupos experimentais. Os dados representam a média \pm S.E.M. ($n = 6$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ vs. Normal + Veículo e # $P < 0,05$ vs. DM2 + Veículo. Analisado por ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. T = Tratamento.

5.3.3 Efeito dos derivados na atividade elétrica do coração de animais diabéticos

O ECG foi avaliado nos animais não-diabéticos, diabéticos tratados ou não com LASSBio-1772, LASSBio-2124 ou sitagliptina. Os parâmetros analisados

através do ECG foram o intervalo RR; intervalo PR; duração complexo QRS e intervalo QTc, que é o QT corrigido em relação à FC, gerando o QTc. Os animais diabéticos apresentaram aumento significativo de todos estes parâmetros, tal como o incremento do QTc de $76,7 \pm 2,6$ (não-diabéticos) para $135,6 \pm 12,5$ ms, que foi normalizado pelo tratamento com LASSBio-2124 mas não pelo LASSBio-1772 ou sitagliptina (Figura 20 e 21).

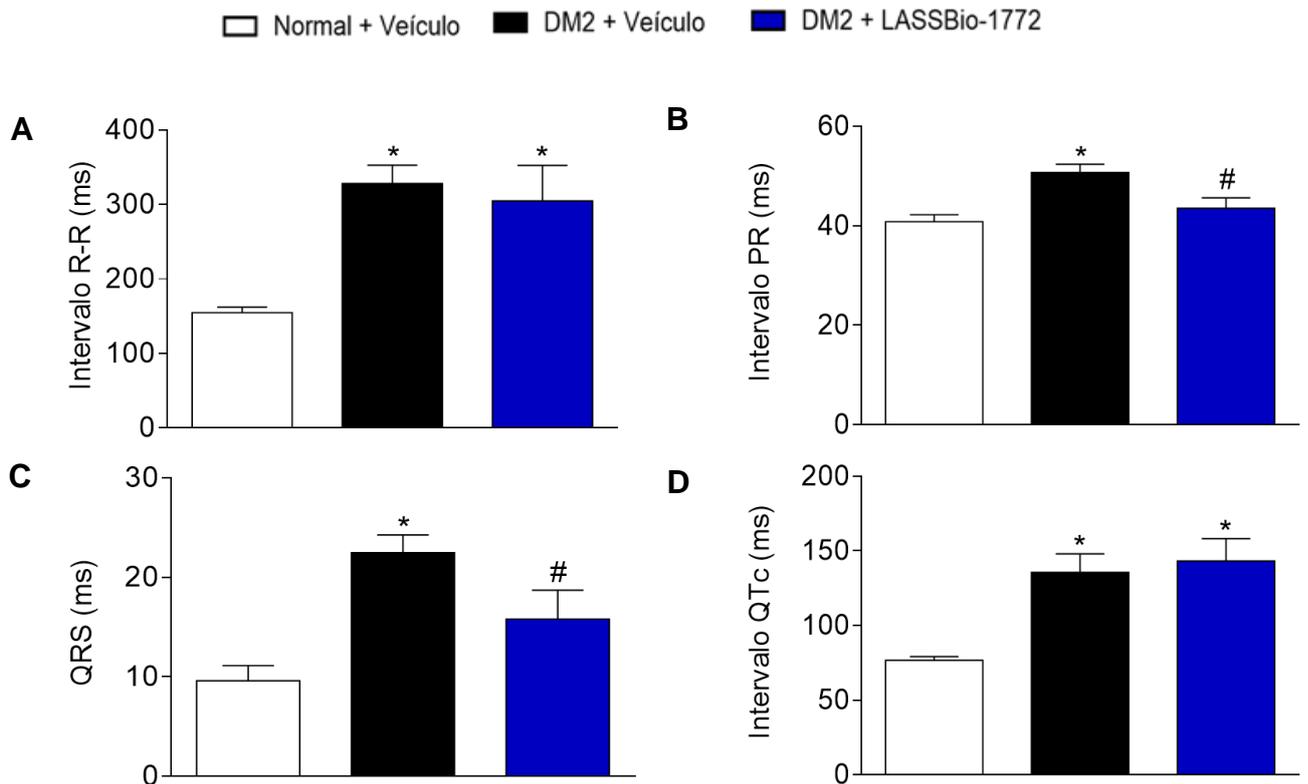


Figura 20. Parâmetros do eletrocardiograma em animais diabéticos tratados com LASSBio-1772. (A) Intervalo R-R, (B) intervalo P-R, (C) duração do complexo QRS e (D) intervalo QTc. Os dados representam a média \pm S.E.M. (n = 6 por grupo). * P <0,05 vs normal + veículo; # P <0,05 vs DM2 + veículo. ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

□ Non-diabetic + Vehicle ■ T2DM + Vehicle ■ T2DM + (R)-Sitagliptin ■ T2DM + (RS)-LASSBio-2124

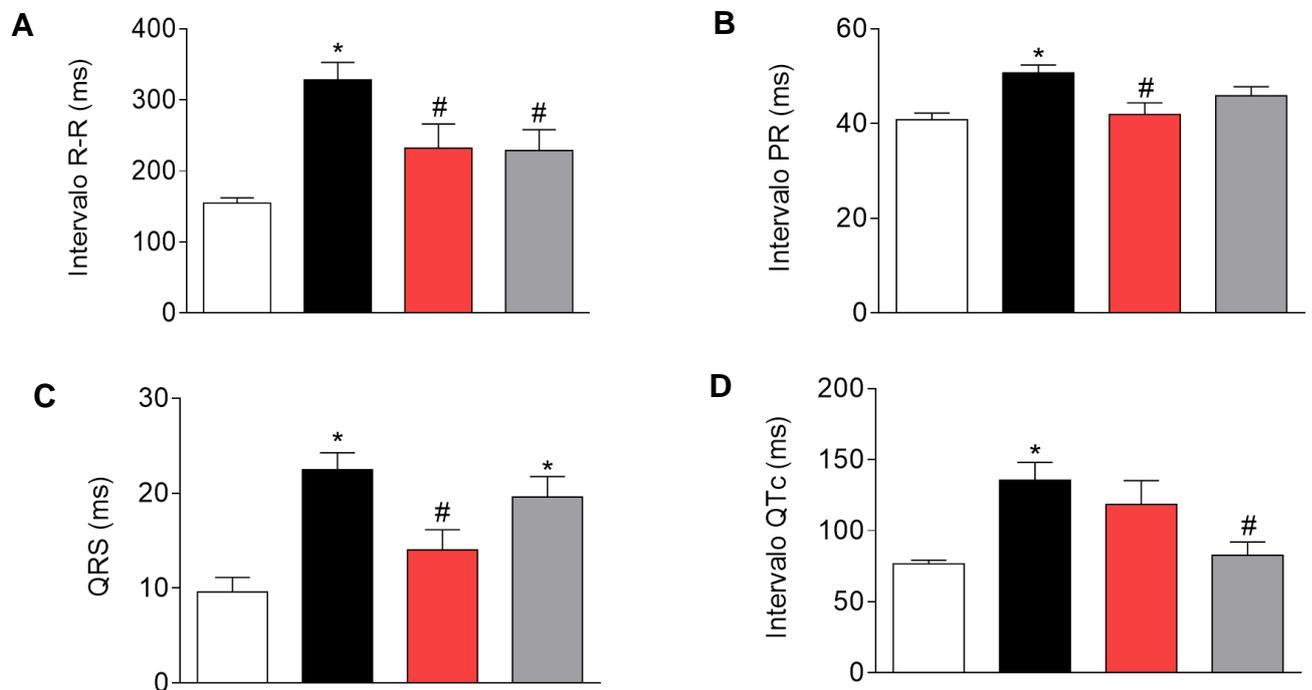


Figura 21. Parâmetros do eletrocardiograma em animais diabéticos tratados com LASSBio-2124 e sitagliptina. (A) Intervalo R-R, (B) intervalo P-R, (C) duração do complexo QRS e (D) intervalo QTc. Os dados representam a média \pm S.E.M. (n = 6 por grupo). * P <0,05 vs normal + veículo; # P <0,05 vs DM2 + veículo. ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

5.3.4 Função cardíaca de animais diabéticos e influência do tratamento com derivados

A avaliação da função cardíaca foi realizada através da introdução de um cateter acoplado a transdutor de pressão no VE dos animais dos diferentes grupos experimentais. A pressão sistólica ventricular esquerda (PVES) aumentou de $87,9 \pm 5,3$ mmHg para $138,1 \pm 4,8$ mmHg induzido pelo DM2. Quando este parâmetro foi avaliado após tratamento com os derivados observou-se a redução com LASSBio-2124 e sitagliptina (Figura 23A) mas não com LASSBio-1772 (Figura 22A). Para se avaliar a taxa de desenvolvimento da pressão sistólica ventricular que indica de forma indireta a contratilidade cardíaca, determinou-se a derivada $+dP/dt$ (Figura 22B e 23C). O DM2 reduziu a $+dP/dt$ indicando que a sístole cardíaca nos animais diabéticos ocorre de

forma mais lenta e foi revertida pelo tratamento com LASSBio-1772 (Figura 22B) mas não pelo LASSBio-2124 e pela sitagliptina (Figura 23C).

Contudo, quando foi avaliada a função diastólica através da medida da pressão diastólica final, foi observado que o aumento deste parâmetro induzido pelo DM2 de $7,8 \pm 1,1$ para $44,8 \pm 5,3$ não foi revertido pelo LASSBio-1772 mas sim pelo LASSBio-2124 ($6,5 \pm 1,1$ mmHg) e pela sitagliptina ($6,9 \pm 1,3$ mmHg) (Figura 23D). Portanto, ambas a disfunção sistólica e a diastólica foram revertidas apenas pelo tratamento com LASSBio-2124. Também foi avaliada a taxa de desenvolvimento da pressão diastólica ventricular, índice indireto do relaxamento cardíaco através da análise da $-dP/dt$. Este parâmetro foi intensamente reduzido nos animais diabéticos (Figura 22D e 23E) e foi parcialmente recuperado após tratamento com LASSBio-2124.

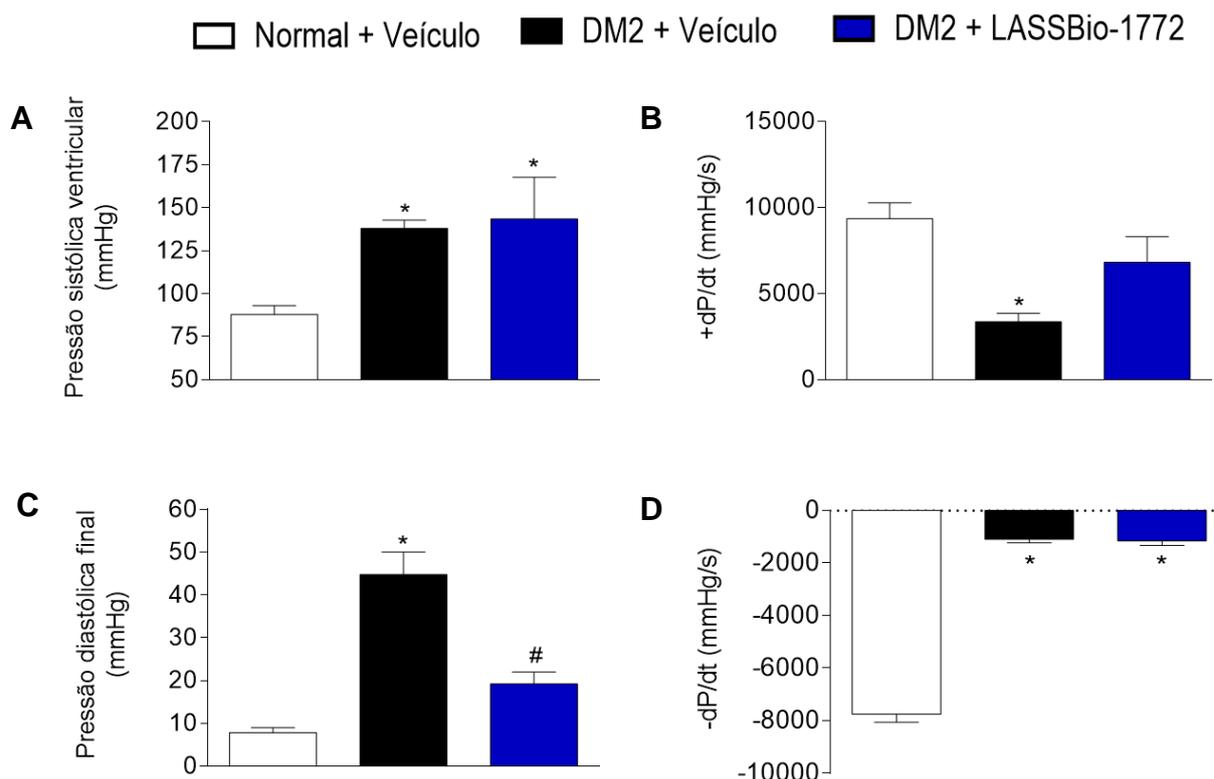


Figura 22. Função cardíaca medida em animais diabéticos tratados com LASSBio-1772. (A) Pressão ventricular esquerda sistólica (PVES); (B) Derivada positiva (+dP/dt); (C) Pressão ventricular esquerda diastólica final (PVEDF); (D) Derivada negativa (-dP/dt). Os dados representam a média \pm S.E.M. (n = 6 por grupo). * P <0,05 vs normal + veículo; # P <0,05 vs DM2 + veículo. ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

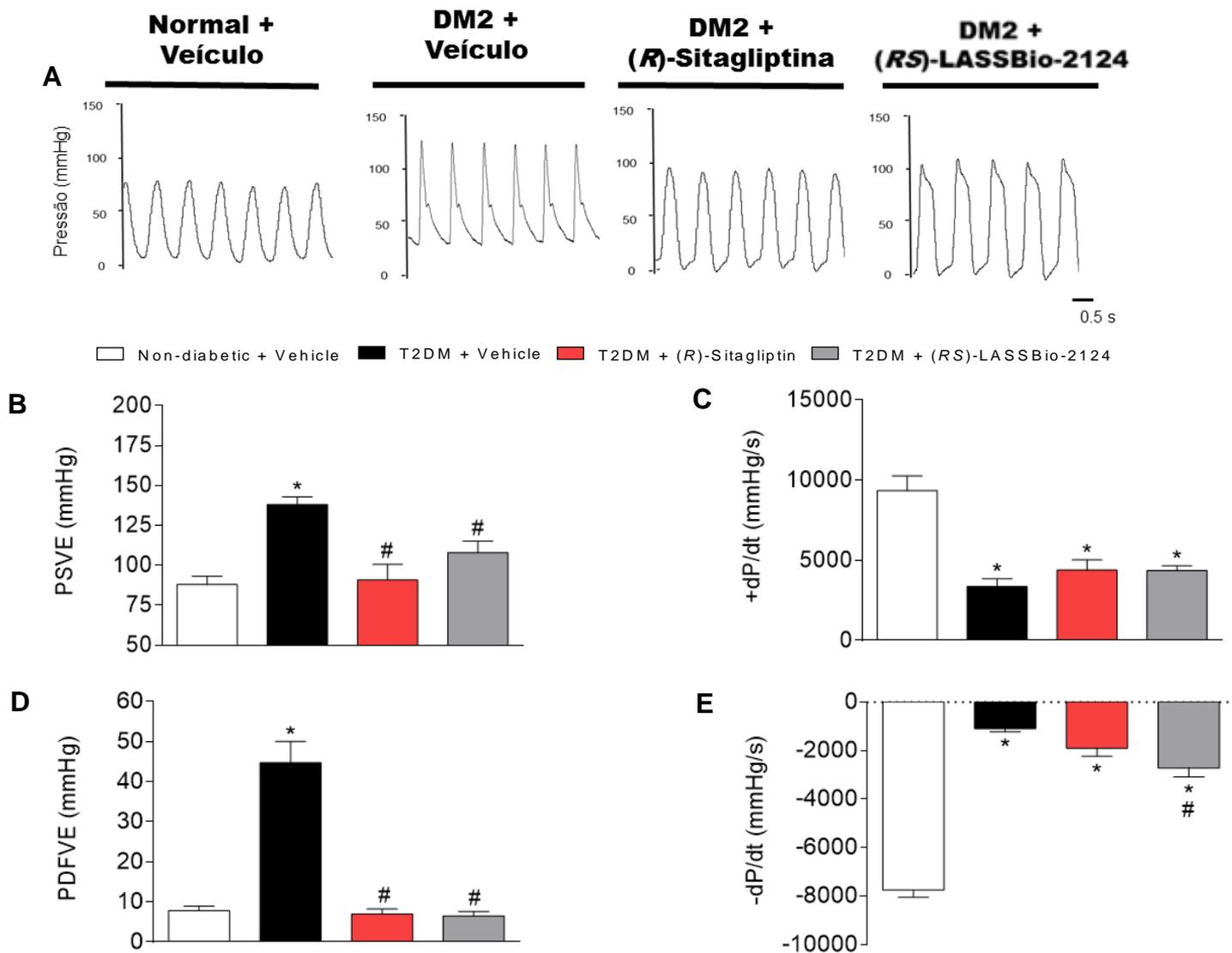


Figura 23. Função cardíaca medida em animais diabéticos tratados com LASSBio-2124 e sitagliptina. (A) Pressão ventricular esquerda sistólica (PVES); (B) Derivada da PVES (+dP/dt); (C) Pressão ventricular esquerda diastólica final (PVEDF); (D) Derivada da PVEDF (-dP/dt). Os dados representam a média \pm S.E.M. (n = 6 por grupo). * P <0,05 vs normal + veículo; # P <0,05 vs DM2 + veículo. ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

5.4 Reatividade vascular da aorta

A disfunção endotelial provocada pelo DM2 foi avaliada através da resposta de relaxamento vascular induzida pela ACh em aorta proveniente dos animais diabéticos. A figura 24 mostra a curva concentração-relaxamento vascular em resposta a ACh deslocada para a direita quando vasos provenientes de animais diabéticos. A disfunção endotelial foi revertida

parcialmente pelo LASSBio-1772 e totalmente pelo LASSBio-2124 (Figura 24B).

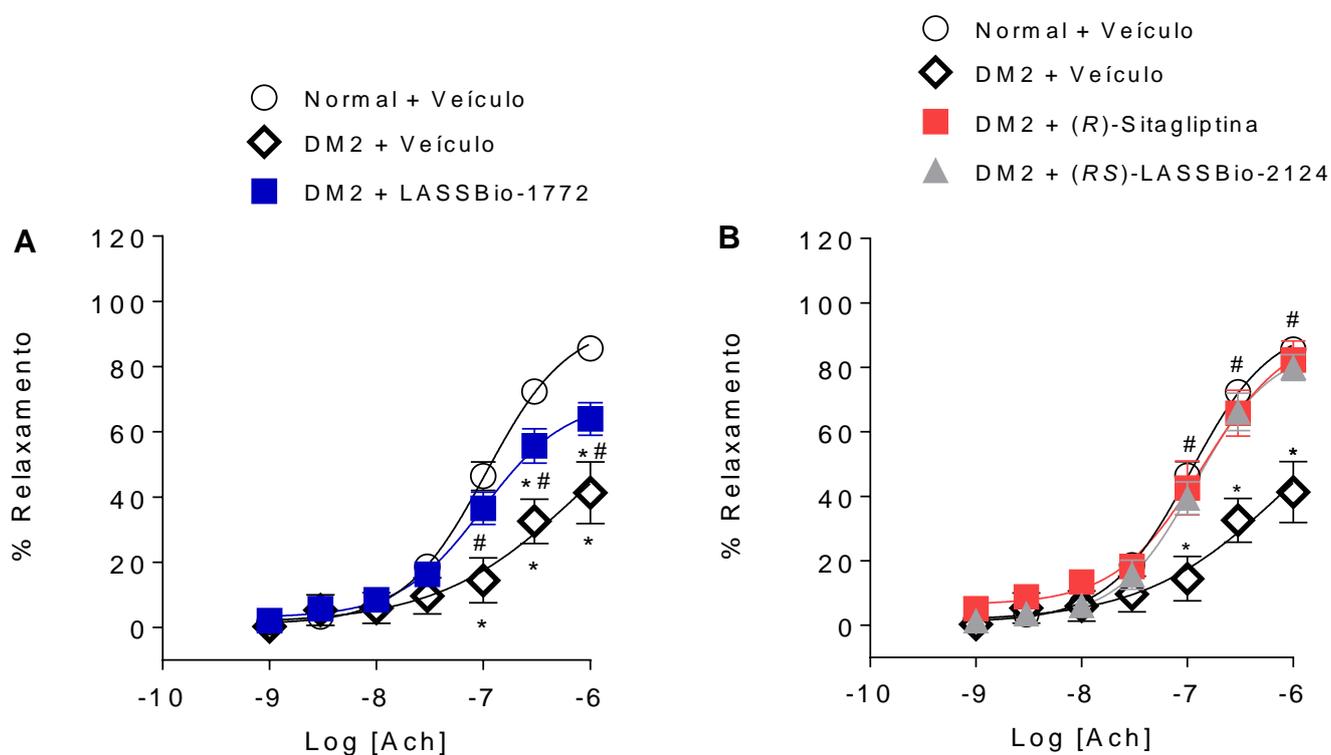


Figura 24. Reatividade vascular da aorta. (A) Resposta de relaxamento muscular com o tratamento LASSBio-1772, (B) sitagliptina e LASSBio-2124. Os dados representam a média \pm S.E.M. ($n = 6$ ratos por grupo). * $P < 0,05$ vs. Normal + Veículo; # $P < 0,05$ vs. DM2 + Veículo. Análise por ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

A tabela 2 mostra o relaxamento máximo induzido pela ACh e a concentração eficaz média (CE_{50}) de anéis de aorta provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais. Note que ocorreu uma redução do relaxamento máximo assim como um aumento da CE_{50} no grupo DM2 quando comparado ao grupo normal. Houve recuperação destas características nos grupos tratados com LASSBio-2124 e sitagliptina confirmando a melhora da disfunção do endotélio vascular.

Tabela 2. Determinação do relaxamento máximo e da concentração eficaz média (CE₅₀) induzido pela ACh em anéis de aorta

Grupos	% Relaxamento	CE₅₀ (µM)
Normal + Veículo	95,0 ± 1,9	0,1 ± 0,02
DM2 + Veículo	68,0 ± 4,0*	1,5 ± 0,9*
DM2 + LASSBio-1772	70,5 ± 4,5*	0,4 ± 0,02 [#]
DM2 + (R)-Sitagliptina	91,5 ± 3,6 [#]	0,2 ± 0,06 [#]
DM2 + (RS)-LASSBio-2124	87,1 ± 3,6 [#]	0,1 ± 0,02 [#]

Cada valor representa a média ± S.E.M (n = 6 ratos por grupo). * P <0,05 vs normal + veículo; [#] P <0,05 vs DM2 + veículo; & P <0,05 vs DM2 + sitagliptina.

5.5 Avaliação histológica e imunohistoquímica do coração de animais diabéticos após tratamento com derivados

Aumento no depósito de colágeno intersticial foi observado no VE de animais diabéticos quando comparado aos normais (Figura 25A e 25B). O tratamento com LASSBio-1772, LASSBio-2124 ou sitagliptina reverteu esta deposição acentuada o que levou a manutenção da presença de colágeno em níveis normais.

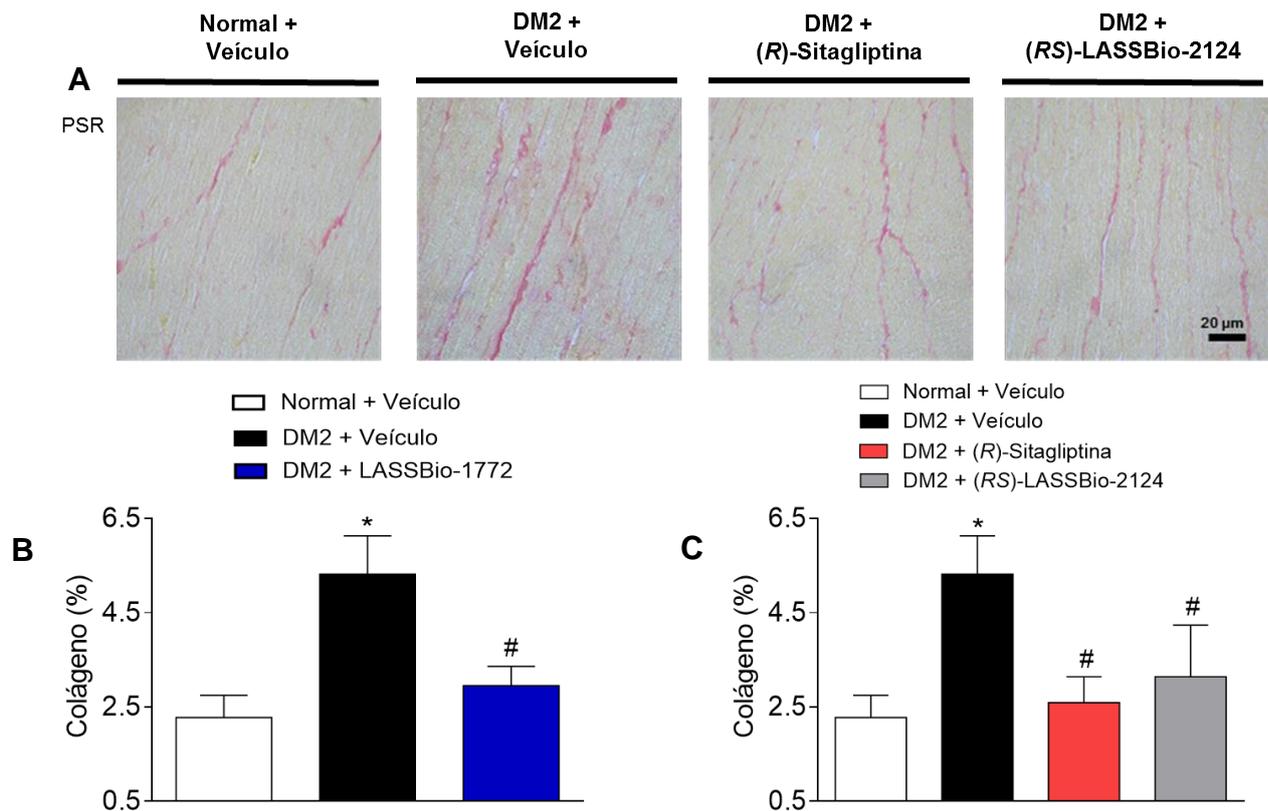


Figura 25. Deposição de colágeno em coração de animais diabéticos. Imagens representativas da deposição de colágeno intersticial no VE (A, coloração PSR, barra: 20 μ m). A fração de colágeno obtido através da coloração picrosirius antes e após tratamento com LASSBio-1772 (B) e LASSBio-2124 (C). Valores representados como média \pm E.P.M. (n = 6 ratos por grupo). * $P < 0.05$ vs normal; # $P < 0.05$ vs DM2 + veículo. One-way ANOVA seguido por Tukey's post-hoc test. VE = Ventrículo esquerdo, PSR = Picro-Sirius.

Para a avaliação da via de sinalização de p38- α MAPK que está relacionada ao processo de apoptose, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, através da qual foi observado um aumento de sua presença a nível nuclear o que seria indicativo de existir maior p38-alfa fosforilada quando em comparação aos animais normais. No entanto, este aumento na proporção de p38-alfa fosforilada não foi reduzida pelo tratamento com LASSBio-2124 (Figura 26).

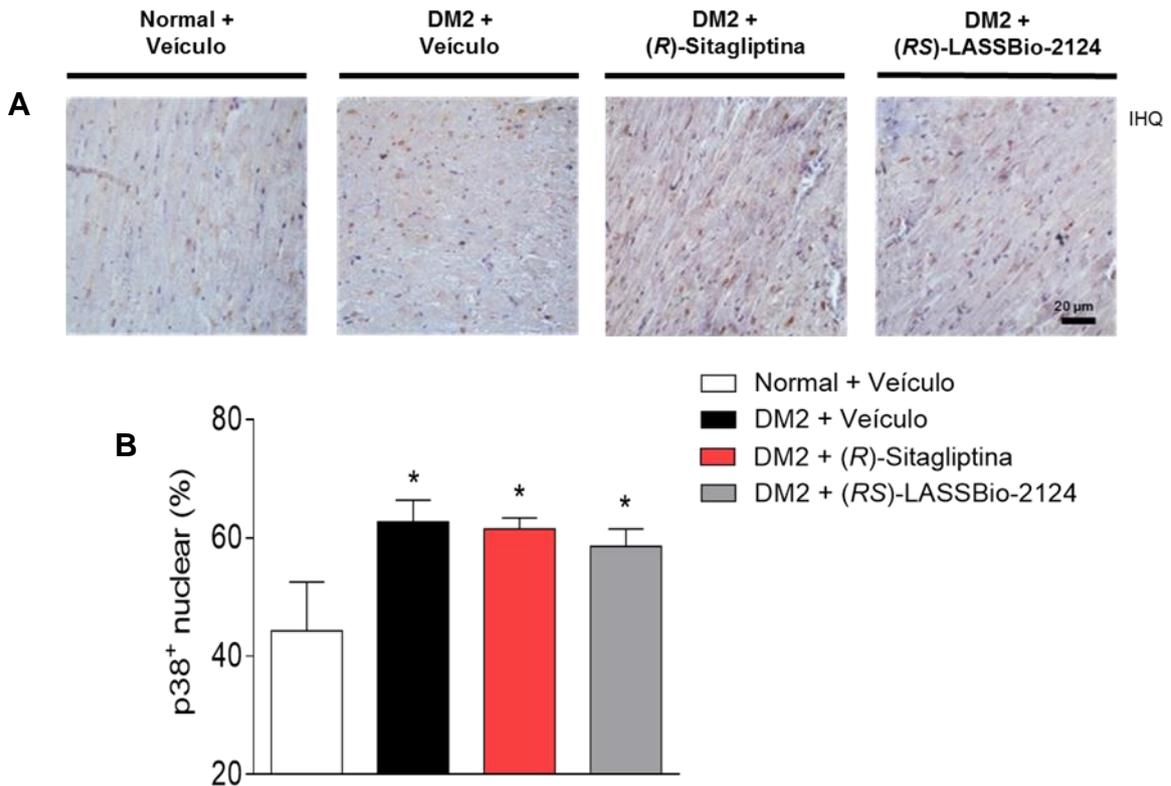


Figura 26. Expressão de p38-alfa em coração do grupo DM2. Imunohistoquímica do tecido cardíaco embebido em parafina, mostrando localização nuclear da Phospho-p38 α MAPK (barra: 20 μ m) (A) e gráfico relacionado a presença de p38 nuclear nos cardiomiócitos (B). Valores representados como média \pm E.P.M. (n = 6 ratos por grupo). * $P < 0.05$ vs normal; # $P < 0.05$ vs DM2 + veículo. One-way ANOVA seguido por Tukey's post-hoc test. IHQ = Imunohistoquímica.

A hipertrofia cardíaca foi detectada nos animais do grupo DM2 com aumento da relação peso coração/comprimento tíbia o que não foi alterada com tratamento do LASSBio-1772 mas foi reduzida tanto com LASSBio-2124 como com a sitagliptina (Figura 27). LASSBio-2124 reduziu de $4,60 \pm 0,08$ (g/mm) para $3,83 \pm 0,11$ g/mm ($P < 0,05$) sugerindo a melhora da hipertrofia cardíaca.

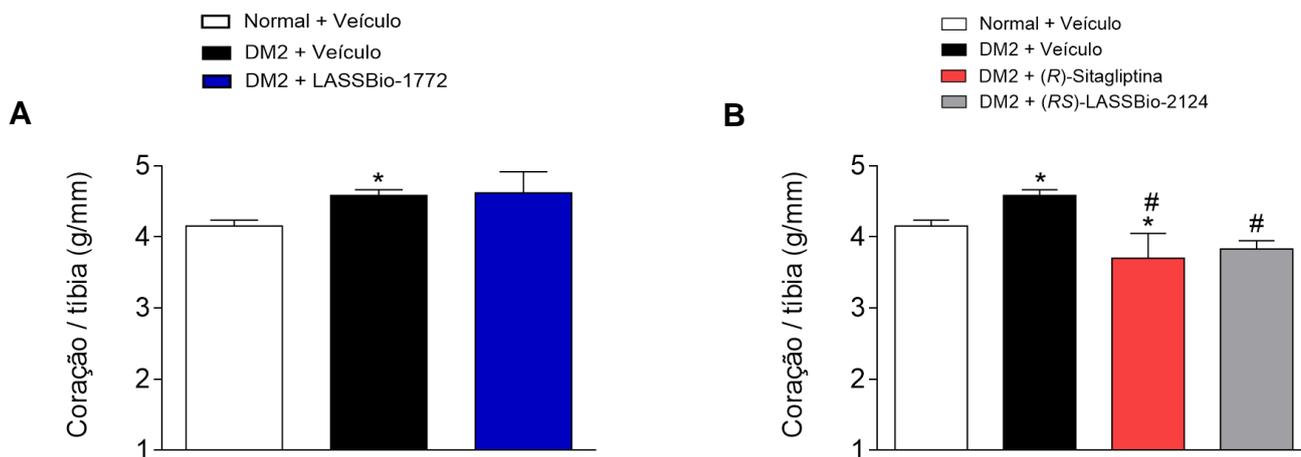


Figura 27. Relação peso coração/tibia. Gráfico relacionado ao aumento do peso pela relação coração/tibia e após tratamento com (A) LASSBio-1772 e (B) LASSBio-2124. Valores representados como média \pm E.P.M. (n = 6 ratos por grupo). * $P < 0.05$ vs. Normal; # $P < 0.05$ vs DM2 + veículo. One-way ANOVA seguido por Tukey's post-hoc test.

5.6 Expressão de proteínas de tecido cardíaco de animais diabéticos com tratamento de derivados

Foi evidenciado utilizando-se a técnica de western blot que o DM2 induziu aumento da expressão de algumas proteínas no coração. Inicialmente, para se avaliar o estado de inflamação no tecido cardíaco proveniente dos animais do grupo DM2, foi determinado a expressão de TNF- α que se mostrou aumentada e foi reduzida pelo tratamento com todas as substâncias testadas (Figura 28A e 29B). Numa etapa seguinte, foi investigada a expressão de proteínas reguladoras de morte e reparo celular, onde foi observado maior expressão de caspase 3 ativa e reduzida de Bcl2, condição que foi totalmente recuperada após tratamento com LASSBio-2124 (Figura 29C e 29D). Com relação ao estresse oxidativo foi avaliado o RAGE, que se apresentou elevado nos diabéticos e o tratamento LASSBio-2124 e sitagliptina reduziram (Figura 29E). Adicionalmente, a mobilização de cálcio intracelular também foi avaliada em coração do grupo DM2 e qual seria a influência do tratamento com os iDPP4. Desta forma, foi demonstrado que apesar da expressão de SERCA2a está preservada normal no DM2 sua função está prejudicada porque foi evidenciado menor relação entre a fosfolamban fosforilada/fosfolamban total (Figura 28E e 28H). A provável redução da atividade da SERCA2a (p-PLB / PLB) pode ser recuperada com LASSBio-2124 em vista que a relação foi normalizada.

□ Normal + Veículo ■ DM2 + Veículo ■ DM2 + LASSBio-1772

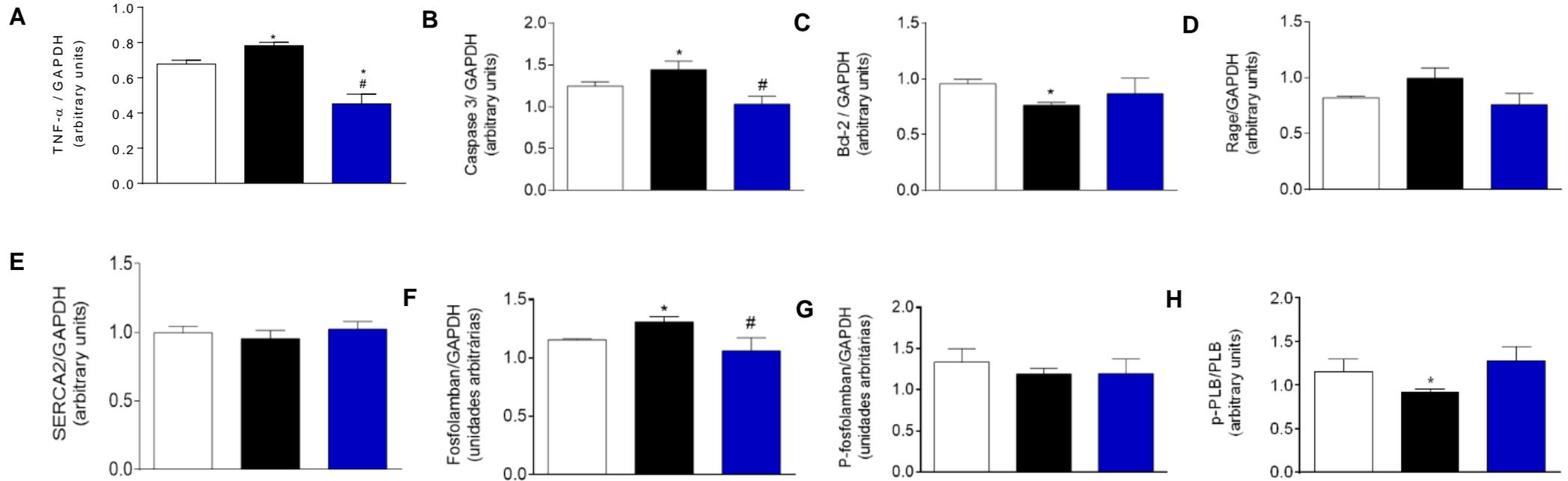


Figura 28. Efeito de LASSBio-1772 na expressão de proteínas cardíacas. Quantificação de expressão de (A) TNF α (n = 3), (B) Caspase 3 ativa (n = 3), (C) Bcl-2 (n = 4), (D) RAGE (n = 2), (E) SERCA2a (n = 3), (F) fosfolamban (n = 3), (G) p-fosfolamban (n = 2), (H) p-PLB / PLB (n = 2). O GAPDH foi usado para normalização. Os dados representam a média \pm S.E.M. (n = 6 ratos por grupo). * P < 0,05 vs. Normal + Veículo; # P < 0,05 vs. DM2+ Veículo. TNF α = Fator de necrose tumoral *alfa*, Bcl-2 = Célula-b de linfoma 2, RAGE = Receptores dos produtos de necrose tumoral *alfa*, Bcl-2 = Célula-b de linfoma 2, RAGE = Receptores dos produtos de glicação avançada, SERCA2a = ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático, PLB = fosfolamban, GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

□ Non-diabetic + Vehicle ■ T2DM + Vehicle ■ T2DM + (R)-Sitagliptin ■ T2DM + (RS)-LASSBio-2124

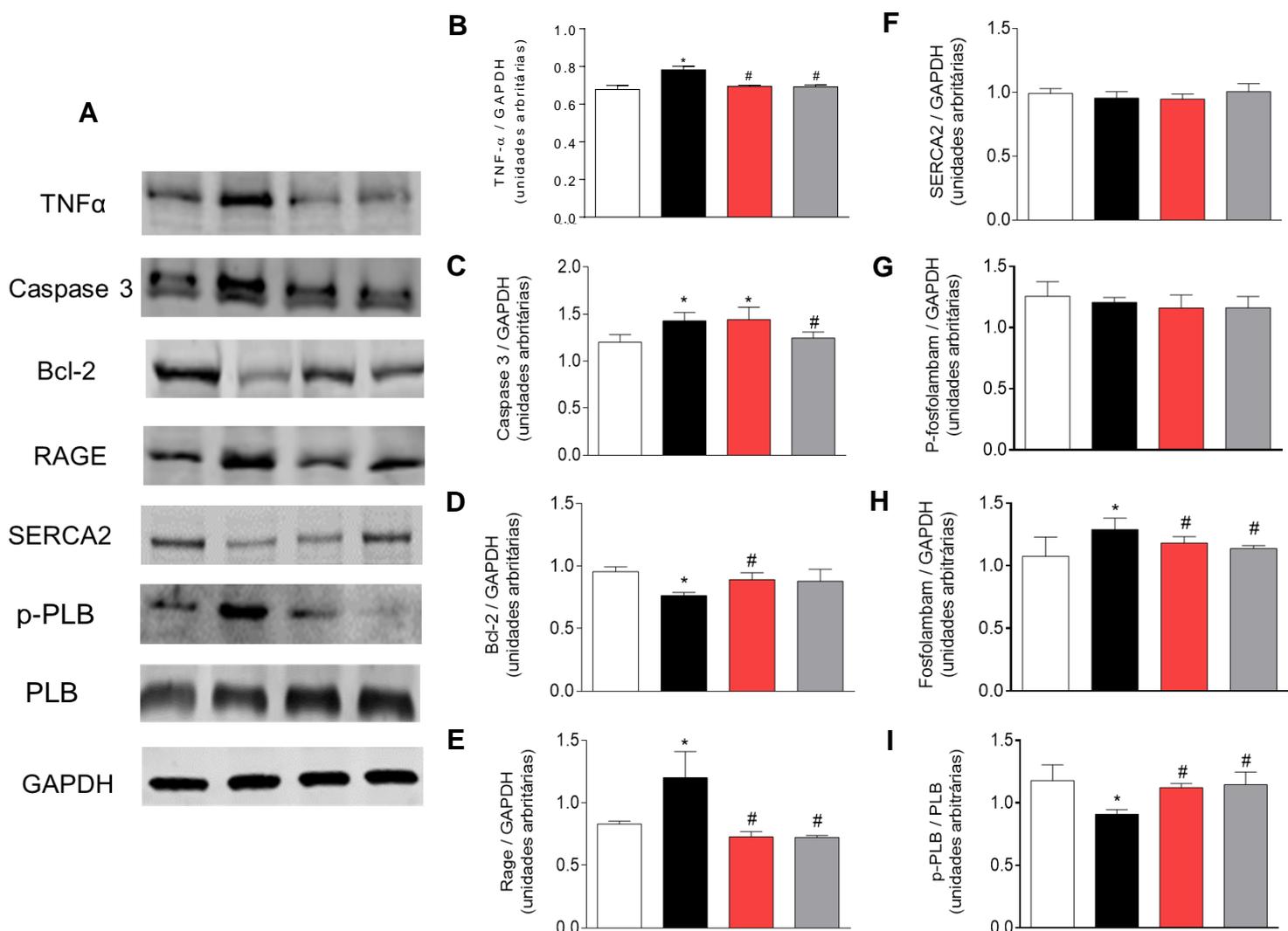


Figura 29. Efeito de LASSBio-2124 e sitagliptina na expressão de proteínas cardíacas. (A) Western blot representativo de TNF α , Caspase 3, Bcl-2, RAGE, SERCA, fosfolambam e P-fosfolambam. Quantificação de expressão de (B) TNF α (n = 3), (C) Caspase 3 ativa (n = 3), (D) Bcl-2 (n = 4), (E) RAGE (n = 2), (F) SERCA 2A (n = 3), (G) p-fosfolambam (n = 3), (H) fosfolambam (n = 2), (I) p-PLB / PLB (n = 2) e expressão típica de GAPDH de ratos normais, tratados com Veículo, sitagliptina e LASSBio-2124. O GAPDH foi usado para normalização. Os dados representam a média \pm S.E.M. (n = 6 ratos por grupo). * P < 0,05 vs. Normal + Veículo; # P < 0,05 vs. DM2+ Veículo. TNF α = Fator de necrose tumoral *alfa*, Bcl-2 = Célula-b de linfoma 2, RAGE = Receptores dos produtos de glicação avançada, SERCA2a = ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático, PLB = fosfolambam, GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

6 DISCUSSÃO

A síndrome metabólica é um quadro pré-existente no DM2 e permanece durante todo o curso da doença que pode desencadear um grave processo inflamatório. Devido a isso, o DM2 é considerado uma doença pró-inflamatória (WELTY; ALFADDAGH; ELAJAMI, 2016) que é o fator desencadeante de alterações na micro e macrovasculatura que culmina no surgimento da cardiomiopatia e nefropatia diabética (ESSER; PAQUOT; SCHEEN, 2015; HWANG et al., 2008; LIM, 2014; NAVAB; GHARAVI; WATSON, 2008; YAMASAKI et al., 2012).

No presente trabalho, investigou-se o benefício do tratamento com um novo iDPP4 que apresenta ação adicional anti-inflamatória, LASSBio-2124 em modelo animal de DM2 associado a disfunção cardiorenal. LASSBio-2124, de forma semelhante a sitagliptina que é usada clinicamente no tratamento de DM2, reduziu a hiperglicemia e a intolerância à glicose dos animais diabéticos. Os inibidores da DPP4, como a sitagliptina, suprimem a atividade desta enzima e, conseqüentemente, prolongam a meia-vida do GLP-1. Esta incretina é responsável por pelo menos 50-70% da secreção de insulina pós-prandial, melhorando o controle glicêmico por um mecanismo dependente de glicose (MULVIHILL; DRUCKER, 2014).

A caracterização do modelo animal de DM2 apresentado neste trabalho baseou-se nos critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) e do Programa Nacional de Educação Colesterol (NCEP, *National Cholesterol Education Program*) que determinam para o diagnóstico de síndrome metabólica a existência de 3 dos 5 fatores abaixo relacionados: 1. circunferência abdominal nos homens ≥ 102 cm e nas mulheres ≥ 88 cm; 2. triglicérido: ≥ 150 mg/dL; 3. HDL: homens < 140 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL; 4. pressão arterial: $\geq 130/\geq 85$ mmHg e 5. glicose: ≥ 100 mg/dL (ALBERTI et al., 2009). Assim, foram avaliados alguns destes parâmetros para certificar que o modelo animal utilizado apresentava a síndrome metabólica. A avaliação do nível plasmático da glicemia e triglicéridos e a aferição da pressão arterial foram então selecionados. Após a introdução da dieta hipercalórica seguida da

administração de baixa dose de estreptozotocina em ratos, caracterizando o modelo HFD-STZ, foi confirmado a presença da síndrome metabólica pois detectou-se aumento do nível sérico de glicose e triglicerídeos e hipertensão arterial nos animais considerados diabéticos. Esta observação sugeriu que estes animais ao apresentarem um quadro de síndrome metabólica persistente, poderia estar associado a maior risco para doenças cardiovasculares (RESNICK; HOWARD, 2002; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). A utilização de modelos semelhantes ao do presente estudo também demonstraram valores aumentados de triglicerídeos e colesterol total (MANSOR et al., 2013; SAAD; KAMEL; HANAFI, 2015).

O tratamento com o protótipo LASSBio-1772 e seu derivado LASSBio-2124, reduziu o distúrbio do metabolismo lipídico com normalização dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos além de melhorar o estado hiperglicêmico. Estas ações poderiam estar relacionadas primeiramente ao efeito do GLP-1 na absorção e metabolismo dos ácidos graxos livres (COBBLE, 2012; USSHER; DRUCKER, 2014) e adicionalmente ao efeito anti-inflamatório que foi demonstrado em estudos anteriores como um mecanismo inibitório para o acúmulo de lipídios (CRUZ et al., 2013; ESSER; PAQUOT; SCHEEN, 2015; LOPES-VIRELLA; VIRELLA, 2013). Com o provável aumento de GLP-1 pelo LASSBio-2124, este poderia reduzir a absorção de triglicérides e a síntese de apolipoproteínas (AVOGARO; KREUTZENBERG; FADINI, 2014).

A elevação de colesterol total plasmático observada no grupo DM2 seria um fator de risco para doenças cardiovasculares (SATTAR et al., 2018; VAN DEN OEVER et al., 2010), incluindo aterosclerose e hipertensão arterial (ARAGONCILLO et al., 2003). A hipercolesterolemia está associada a disfunção endotelial que envolve não apenas alterações na regulação do tônus vascular, mas também alterações no crescimento e migração de células musculares lisas vasculares, adesão de leucócitos e função plaquetária, que podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (ARAGONCILLO et al., 2003; VAN DEN OEVER et al., 2010). A disfunção endotelial foi detectada nas aortas dos animais diabéticos por reduzido relaxamento vascular em resposta a ACh que depende da integridade

do endotélio vascular. A preservação da funcionalidade endotelial prevista pelo tratamento com LASSBio-2124 poderia ser consequente não somente pela sua ação em reduzir o colesterol mas também pelo efeito anti-inflamatório, evitando a proliferação celular e alteração do tônus vascular.

A intolerância à glicose foi confirmada no grupo DM2 através do teste oral de tolerância à glicose que foi minimizada com tratamento de LASSBio-2124. Os animais diabéticos apresentaram também uma intensa poliúria que foi acompanhada de proteinúria sugerindo o surgimento de disfunção renal. Acrescido a isso, foi observado uma expansão da matriz mesangial, deposição de colágeno e lesão tubulointersticial características que foram reduzidas após tratamento com LASSBio-2123. A nefropatia diabética (ND) é caracterizada por mudanças estruturais e funcionais, principalmente nos glomérulos e túbulos renais. No início da ND, hipertrofia tubular está presente, mas eventualmente a fibrose intersticial (LIM, 2014). A fibrose presente na nefropatia diabética pode ser resultante da ativação do SRAA, que ativa a via do fator transformador do crescimento beta (TGF- β) e do eixo AGE-RAGE, que suprime a renovação do colágeno. Funcionalmente, ocorre aumento da filtração glomerular e aumento da excreção de albumina (LIM, 2014). Esses dados sugerem que o grupo DM2 neste trabalho está em um estágio mais avançado da doença devido ao aumento da deposição de colágeno tubulointersticial, bem como ao nível acentuado da proteinúria. E ainda, LASSBio-2124 reverteu as alterações funcionais e estruturais dos rins dos ratos diabéticos, efeito que poderia ser justificado simplesmente pela redução da hiperglicemia que por sua vez diminui o estresse oxidativo com consequente diminuição de EROs (espécies reativas de oxigênio). A não formação de EROs está relacionado a benefícios na função renal, impedindo a progressão da ND (ARORA; SINGH, 2014; GIACCO; BROWNLEE, 2010; YASUKO K. BANDO; TOYOAKI MUROHARA, 2014).

Os inibidores de DPP-4 além de reduzirem a pressão arterial, apresentam ação cardioprotetora provavelmente por reduzirem marcadores lipídicos de inflamação e estresse oxidativo (LEE et al., 2013; TRIGGLE; DING, 2014; USSHER; DRUCKER, 2014). Assim, o efeito de LASSBio-2124 foi investigado na disfunção cardiovascular também evidenciada no grupo DM2 que apresentou disfunção sistólica e diastólica possivelmente devido a fibrose

do tecido cardíaco que em substituição a perda progressiva de células cardíacas levou ao funcionamento inadequado da atividade cardíaca (KATARE et al., 2010; YASUKO K. BANDO; TOYOAKI MUROHARA, 2014).

O uso de iDPP-4, como as gliptinas, pode diminuir o risco de insuficiência cardíaca e outros eventos cardiovasculares em pacientes com DM2 (MONAMI et al., 2013; PATIL et al., 2012; RAVASSA et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que a sinalização insulínica é responsável pela energética, estrutura, função e sobrevivência do miocárdio (GUO; GUO, 2017). A perda desta homeostase na presença de hiperglicemia, hiperlipidemia e resistência à insulina pode levar a geração de EROs, ativação de células inflamatórias, deficiência energética, disfunção mitocondrial, dano estrutural, podendo evoluir para uma função cardíaca prejudicada (YASUKO K. BANDO; TOYOAKI MUROHARA, 2014). O tratamento com LASSBio-2124 poderia restabelecer a homeostase nos animais diabéticos, devido à diminuição da glicemia e melhora da resistência à insulina, e provável atuação direta nos cardiomiócitos, ativando vias de sinalização que seriam protetoras como já descrito por Ravassa et al 2012.

O efeito benéfico de LASSBio-2124 poderia estar relacionado então a redução dos prejuízos causados pelo aumento do nível sérico de glicose e ácidos graxos. O controle glicêmico concomitante a diminuição dos ácidos graxos livres poderia reduzir a produção e biodisponibilidade de EROs melhorando a contratilidade cardíaca. A diminuição da glicemia também estaria relacionada com a diminuição da atividade de NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), responsável pela transcrição de genes como: MCP-1, ICAM-1 e IL-6 que promovem aterosclerose, hipertrofia, fibrose e por fim, insuficiência cardíaca (VAN DEN OEVER et al., 2010; YAN, 2014). A avaliação da deposição de colágeno e consequente fibrose miocárdica foi realizada através da análise histológica dos tecidos cardíacos dos animais diabéticos que apresentou estar aumentada semelhante ao demonstrado em outros modelos de DM (SHIRAISHI et al., 2004). Sitagliptina, um iDPP4 já foi descrito como antifibrótico em cultura de células cardíacas o que poderia estar relacionado ao aumento da meia vida do GLP-1 (PICATOSTE et al., 2013). De forma

semelhante, LASSBio-2124 reduziu o depósito de colágeno e área de fibrose miocárdica nos animais diabéticos.

A insuficiência cardíaca pode ocorrer devido ao alto nível plasmático de insulina que ativa p38MAPK no coração que promove degradação de IRS1 e IRS2 e desregula o metabolismo de glicose e lipídios cardíacos, altera a biogênese mitocondrial e a mobilização de cálcio (QI et al., 2013). Como o tratamento com LASSBio-2124 não alterou a expressão aumentada de p38-alfa considera-se que esta via de sinalização não estaria envolvida na cardioproteção desta molécula.

A regulação de outras vias de cinases ligadas a GLP-1 tal como caspase3 poderia justificar o efeito de um iDPP4 como sitagliptina e LASSBio-2124. Em estudo prévio, Ravassa et al. (2012) demonstraram a cardioproteção através dos efeitos da incretina GLP-1 por ativar a sinalização da via de cinases que leva a ação anti-apoptótica e anti-necrótica, culminando em sobrevida e melhora da função cardíaca (RAVASSA; ZUDAIRE; DÍEZ, 2012). Como a via AGE-RAGE é importante na fibrose cardíaca de animais diabéticos, a expressão de RAGE foi avaliada nestes animais e naqueles tratados com LASSBio-2124. A expressão aumentada destes receptores é responsável pela fibrose miocárdica e pelo aumento do estresse oxidativo por ativar múltiplas vias de sinalização intracelular envolvendo NADPH oxidase, proteína C quinase e MAPKs, resultando em aumento da atividade de NF-kappa B (GIACCO; BROWNLEE, 2010; GOLDIN et al., 2006; PITOCCO et al., 2013; TATE; GRIEVE; RITCHIE, 2017). Portanto, o novo iDPP4 poderia atuar diretamente como anti-oxidante ou indiretamente pela ação anti-hiperglicêmica melhorando o remodelamento cardiovascular nos ratos diabéticos.

Como a mobilização do cálcio intracelular esta alterada no DM2, este fator também foi investigado após tratamento com LASSBio-2124. A SERCA2a desempenha um papel crítico na regulação do Ca^{2+} intracelular no músculo cardíaco e a disfunção da SERCA2a ou na proteína que a regula, fosfolambam, pode ser responsável pela insuficiência cardíaca e arritmogênese. Apesar da expressão de SERCA2a está normal nos animais diabéticos, sua atividade estava comprometida com menor captação de Ca^{2+} pelo RS o que poderia acarretar menor acúmulo de Ca^{2+} no interior do RS e menor disponibilidade no

momento da contração do miocárdio. A menor liberação de Ca^{2+} produzindo menor desenvolvimento de força caracteriza a insuficiência cardíaca, o que foi comprovada pela menor relação de fosfolambam fosforilada/fosfolambam total. A normalização desta relação pelo LASSBio-2124 poderia proporcionar o aumento da força contrátil, melhorando a hemodinâmica em corações dos ratos diabéticos com disfunção de VE, o que é reforçado pelo fato deste iDPP4 ter reduzido a PSVE e PDFVE. O distúrbio metabólico ao provocar uma disfunção mitocondrial pode levar ao estresse oxidativo resultando em sinalização de insulina prejudicada e a alteração da mobilização de Ca^{2+} anormal culminando em cardiomiopatia diabética (JIA et al., 2016). A atividade aumentada de GLP-1 devido a um iDPP4 como sitagliptina e LASSBio-2124, ativaria a via de sinalização eNOS / monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) / proteína G quinase (PKG) e inibiria as vias Ca^{2+} / calmodulina-dependente quinase II (CaMKII) (CHEN et al., 2017), podendo ser o possível mecanismo da cardioproteção.

O processo inflamatório é um fator importante na cardiomiopatia diabética (LIU et al., 2015) e um efeito anti-inflamatório poderia não somente melhorar o remodelamento cardíaco como o vascular. O TNF- α está envolvido na disfunção ventricular já que aumenta a apoptose e o estresse oxidativo em cardiomiócitos (DHINGRA et al., 2009). O tratamento com o LASSBio-2124 reverteu o aumento da expressão de TNF- α em animais diabéticos.

Pacientes com DM2 com miocardiopatia associada apresentam maior propensão a desenvolver arritmias cardíacas e aqueles que apresentam aumento de QTc no ECG tem maior suscetibilidade a morte súbita (CRISTINA et al., 2008; NAKAMURA et al., 2016). Assim, o ECG dos animais diabéticos foi analisado e aumento de QTc foi observado que foi revertido com tratamento com LASSBio-2124 de forma semelhante ao descrito para sitagliptina em pacientes com DM2 (NAKAMURA et al., 2016). LEE et al. também descreveram que o tratamento com sitagliptina por 4 semanas promoveu encurtamento do intervalo QT em animais hipertensos. Assim, o tratamento com LASSBio-2124 poderia diminuir os riscos de arritmias ventriculares e morte súbita devido à redução do intervalo QTc.

As novas condutas terapêuticas no DM não estão centradas visando apenas o seu efeito anti-hiperglicêmico, por se tratar de uma doença multifatorial é importante controlar secundariamente fatores de risco como obesidade, hipertensão, dislipidemia, resistência insulina. Estas condições de alguma forma criam um micro ambiente vascular com caráter inflamatório ocasionado pela exposição crônica a hiperglicemia e aumento de EROs.

A melhora do prognóstico e da qualidade de vida está baseado no controle da hiperglicemia, do processo inflamatório, da dislipidemia, da hipertensão arterial refletindo na diminuição da incidência das complicações. Diante do atual panorama do DM é imprescindível e indispensável o desenvolvimento de novas moléculas antidiabéticas com atuação em outros aspectos da doença. LASSBio-2124 por atuar como anti-hiperglicêmico e com ação secundária reduzindo as vias pró-inflamatórias que se encontram superativadas no DM, poderia diminuir vias de sinalização com envolvimento de TNF- α , NF κ B, MAPK/ERK, protegendo o coração e rins.

7 CONCLUSÕES

Em relação ao novo protótipo, LASSBio-2124:

- Normalizou o distúrbio metabólico com redução da hiperglicemia e dislipidemia
- Reduziu a disfunção renal por diminuir significativamente a poliúria e proteinúria dos animais diabéticos
- Apresentou efeito anti-hipertensivo e normalizou a disfunção ventricular dos ratos diabéticos
- Normalizou o remodelamento vascular e cardíaco por reduzir a ativação de vias de sinalização envolvidas na apoptose e proliferação celular
- Redução da ativação das vias inflamatórias: TNF- α , NF κ B, MAPK/ERK

Um comparativo entre os resultados com a sitagliptina e LASSBio-2124:

	Sitagliptina	LASSBio-2124
Distúrbio metabólico		
Glicemia	+	++
HOMA	-	+
Avaliação renal		
Fluxo urinário	-	+
Proteinúria	-	+
Avaliação cardiovascular		
QTc	-	++
-dP/dt	-	+

Podemos concluir que:

- LASSBio-2124 apresentou efeito anti-hiperglicêmico, ação renoprotetora e provável diminuição do risco de arritmia ventricular e morte súbita superior à sitagliptina
- Uso promissor no tratamento do DM2 por evitar possíveis comorbidades devido ação protetora cardiorenal

Como limitação deste trabalho descrevo o alto índice de mortalidade evidenciada no grupo diabético com aproximadamente 41%.

8 REFERÊNCIAS

ADLER, Amanda I. et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). **Kidney International**, v. 63, n. 1, p. 225–232, 2003.

ALBERTI, K. G. M. M. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International . **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640–1645, 2009.

ALENCAR, Allan K. N. et al. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. **International Journal of Cardiology**, v. 173, n. 2, p. 154–162, 2014.

AMBER, Cicek Figen et al. Di-peptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin protects vascular function in metabolic syndrome: Possible role of epigenetic regulation. **Molecular Biology Reports**, v. 26, n. 3, 2014.

ANDERSEN, A. R. et al. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: An epidemiological study. **Diabetologia**, v. 25, n. 6, p. 496–501, 1983.

ANHÊ, Gabriel F. et al. Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 29, n. 6, p. R2225-33, 2007.

ANSON, K. Evin H.; RIGEON, R. Onald L. P. Differential Effects of Acute and Extended Infusions of Glucagon-Like. **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 791–798, 2003.

ARAGONCILLO, Paloma et al. Comparison between the effects of mixed dyslipidaemia and hypercholesterolaemia on endothelial function , atherosclerotic lesions and fibrinolysis in rabbits. **Clinical Science**, v. 104, p. 357–365, 2003.

ARILDSEN, Hanne; MAY, Ole; CHRISTIANSEN, Evald Høj. Increased QT dispersion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation Research**, v. 71, p. 235–242, 1999.

ARORA, Mandeep Kumar; SINGH, Umesh Kumar. Oxidative Stress : Meeting Multiple Targets in Pathogenesis of Diabetic Nephropathy Polyol Pathway Glucose. **Current Drug Targets**, v. 15, p. 531–538, 2014.

ARTUNC, Ferruh et al. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 12, p. 721–737, 2016.

AVOGARO, Angelo; KREUTZENBERG, Saula; FADINI, Gianpaolo. Dipeptidyl-

peptidase 4 Inhibition: Linking Metabolic Control to Cardiovascular Protection. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 14, p. 2387–2394, 2014.

BAHIA, Luciana et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 291–303, 2006.

BITTLE, Polly A. Use of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. **The Nurse Practitioner**, v. 17, p. 31–38, 2017.

BLOCK, K.; GORIN, Y.; ABBOUD, H. E. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14385–14390, 2009.

BOUDINA, Sihem; ABEL, Evan Dale. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects Sihem. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 1, p. 31–39, 2010.

BUNNER, Anne E.; CHANDRASEKERA, P. Charukeshi; BARNARD, Neal D. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 2, p. 146–59, 2014.

BURGOYNE, Joseph R. et al. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. **Circulation Research**, v. 111, n. 8, p. 1091–1106, 2012.

C.H. YI, H. VAKIFAHMETOGL. NORBERG; YUAN, J. Integration of Apoptosis and Metabolism. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. LXXVI, 2011.

CERNEA, SIMONA; RAZ, Itamar. Therapy in the Early Stage: Incretins. **Diabetes Care**, v. 34, 2011.

CERNEA, Simona; DOBREANU, Minodora. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. **Biochemia Medica**, v. 23, n. 3, p. 266–280, 2013.

CHEN, Jingjing et al. Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca²⁺homeostasis in rats with heart failure via the GLP-1 receptor through the eNOS/cGMP/PKG pathway. **Peptides**, v. 90, p. 69–77, 2017.

CHEUNG, Carol Yimlui et al. The clinical implications of recent studies on the structure and function of the retinal microvasculature in diabetes. **Diabetologia**, v. 5, n. 2, p. 146–59, 2015.

COBBLE, Michael. Differentiating among incretin-based therapies in the management of patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 4, n. 1, p. 8, 2012.

COLL-DE-TUERO, Gabriel et al. Chronic kidney disease in the type 2 diabetic patients: Prevalence and associated variables in a random sample of 2642 patients of a Mediterranean area. **BMC Nephrology**, v. 13, n. 1, 2012.

COSTA, Felipe Pereira. **Novos candidatos a protótipos de fármacos hipoglicemiantes com atividade anti-inflamatória: LASSBio-1773 e LASSBio-1774**. 2013. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

CRISTINA, Eunice et al. Os Efeitos da Metformina sobre a Dispersão do Intervalo QT e QTc de. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, p. 254–260, 2008.

CRUZ, Nathália G. et al. The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 2, p. 85–92, 2013.

DHINGRA, Sanjiv et al. IL-10 attenuates TNF- α -induced NF κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 1, p. 59–66, 2009.

DIKALOV, Sergey. Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 7, p. 247–253, 2009.

DONATH, Marc Y.; SHOELSON, Steven E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Reviews - Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98–107, 2011.

EID, Assaad A. et al. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of Cytochrome P450 and NADPH Oxidases. **Review Literature and Arts of the Americas**, v. 58, n. May, p. 19208908–19208908, 2009.

EISMA, Jessica H.; DULLE, Jennifer E.; FORT, Patrice E. Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 2, p. 312–20, 2015.

ESSER, Nathalie; PAQUOT, Nicolas; SCHEEN, André J. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 3, p. 283–307, 2015.

FADINI, Gian Paolo; AVOGARRO, Angelo. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: Beyond GLP-1. **Vascular Pharmacology**, v. 55, n. 1–3, p. 10–16, 2011.

FALCÃO-PIRES, Inês; LEITE-MOREIRA, Adelino F. Diabetic cardiomyopathy: Understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. **Heart Failure Reviews**, v. 17, n. 3, p. 325–344, 2012.

FEHSE, Frauke et al. Exenatide Augments First- and Second-Phase Insulin Secretion in Response to Intravenous Glucose in Subjects with Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 11, p. 5991–5997, 2005.

FRAZIER, Kendall S. et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 4 Suppl, p. 14S–86S, 2012.

FUJIWARA, Takayuki et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors are associated with improved left ventricular diastolic function after acute myocardial infarction in diabetic patients. **Heart and Vessels**, v. 30, n. 5, p. 696–701, 2015.

GIACCO, Ferdinando; BROWNLEE, Michael. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 2010.

GOLDIN, Alison et al. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597–605, 2006.

GOMES, Conrado L. R. et al. The protective role of fucosylated chondroitin sulfate, a distinct glycosaminoglycan, in a murine model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **PLoS one**, v. 9, n. 9, p. e106929, 2014.

GORIN, Yves; BLOCK, Karen. Nox as a target for diabetic complications. **Clinical Science**, v. 125, n. 8, p. 361–382, 2013.

GREEN, Jennifer B. et al. Rationale, design, and organization of a randomized, controlled Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin (TECOS) in patients with type 2 diabetes and established cardiovascular disease. **American Heart Journal**, v. 166, n. 6, p. 983–989.e7, 2013.

GRGIC, Ivica et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. **Kidney International**, v. 82, n. 2, p. 172–83, 2012.

GUO, Cathy A.; GUO, Shaodong. Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure. **Journal of Endocrinology**, v. 233, p. 131–143, 2017.

GUO, Shaodong; DUNN, Sarah L.; WHITE, Morris F. The Reciprocal Stability of FOXO1 and IRS2 Creates a Regulatory Circuit that Controls Insulin Signaling. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 12, p. 3389–3399, 2006.

HEMMERYCKX, Bianca et al. Effect of sitagliptin treatment on metabolism and cardiac function in genetic diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 146–59, 2014.

HINNEN, Deborah et al. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 19, n. 6, p. 612–20, 2006. Disponível em: <<http://www.jabfm.org/content/19/6/612.short>>. Acesso em: 30 out. 2014.

HOLMAN, Rury R.; SOURIJ, Harald; CALIFF, Robert M. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering drugs or strategies in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 383, n. 9933, p. 2008–17, 2014.

HOLST, Jens Juul; GROMADA, Jesper. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 287, p. E199–E206, 2004.

HWANG, Jawl-shan et al. Development of Multiple Complications in Type 2 Diabetes Is Associated With the Increase of Multiple Markers of Chronic Inflammation. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 13, p. 6–13, 2008.

INZUCCHI, Silvio E.; MCGUIRE, Darren K. New drugs for the treatment of diabetes: part II: Incretin-based therapy and beyond. **Circulation**, v. 117, n. 4, p. 574–84, 2008.

JIA, Guanghong et al. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. **Nature Reviews Endocrinology**, v.12, n. 3, p. 144–153, 2016.

KARASIK, Avraham et al. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 2, p. 489–96, 2008.

KARIMIPOUR, Atiyeh; REZA, Mohammad. Real-time electrocardiogram P-QRS-T detection – delineation algorithm based on quality-supported analysis of characteristic templates. **Computers in Biology and Medicine**, v. 52, p. 153–165, 2014.

KATARE, Rajesh G. et al. Vitamin B1 analog benfotiamine prevents diabetes-induced diastolic dysfunction and heart failure through Akt/Pim-1-mediated survival pathway. **Circulation: Heart Failure**, v. 3, n. 2, p. 294–305, 2010.

KIRINO, Yasushi et al. Interrelationship of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) with the development of diabetes, dyslipidaemia and nephropathy: a streptozotocin-induced model using wild-type and DPP4-deficient rats. **The Journal of Endocrinology**, v. 200, n. 1, p. 53–61, 2009.

KOO, Bo Kyung et al. The incidence and prevalence of diabetes mellitus and related atherosclerotic complications in Korea: a national health insurance database study. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110650, 2014.

LANDGRAF, Sharon Schilling et al. 5-Lipoxygenase products are involved in renal tubulointerstitial injury induced by albumin overload in proximal tubules in mice. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e107549, 2014.

LE LAY, Soazig et al. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 908539, 2014.

LEE, T. I. et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-sitagliptin modulates calcium dysregulation, inflammation, and PPARs in hypertensive cardiomyocytes. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 6, p. 5390–5395, 2013.

LIM, Andy Kh. Diabetic nephropathy - complications and treatment. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 361–81, 2014.

LIMA, Lídia M. et al. Novel Partial Agonist of PPAR-Gamma for Treatment of Diabetic Neuropathy in Rats. **Diabetes and Metabolism**, v. 5, n. 7, 2014.

LIU, Yu Sheng et al. Sitagliptin alleviated myocardial remodeling of the left ventricle and improved cardiac diastolic dysfunction in diabetic rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 3, p. 260–274, 2015.

LOPES-VIRELLA, Maria F.; VIRELLA, Gabriel. The role of immunity and inflammation in the development of diabetic complications. **Diabetology International**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2013.

LYRA, Ruy et al. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.n.]. v. 5

MADDAHI, Aida; CHEN, Qingwen; EDVINSSON, Lars. Enhanced cerebrovascular expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via the MEK/ERK pathway during cerebral ischemia in the rat. **BMC Neuroscience**, v. 10, p. 56, 2009.

MANSOR, Latt S. et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. **Cardiovascular Diabetology**, v. 12, n. 1, p. 136, 2013.

MATSUDA, Morihiro; SHIMOMURA, Ichihiro. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2014.

MONAMI, M. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized clinical trials. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 2, p. 112–120, 2013.

MONTSERRAT B DURAN-SALGADO, Alberto F. Rubio-Guerra Montserrat. Diabetic nephropathy and inflammation. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 463–468, 2006.

MULVIHILL, Erin E.; DRUCKER, Daniel J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 6, p. 992–1019, 2014.

NAG, S. et al. All-cause and cardiovascular mortality in diabetic subjects increases significantly with reduced estimated glomerular filtration rate (eGFR): 10 Years' data from the South Tees Diabetes Mortality study. **Diabetic Medicine**, v. 24, n. 1, p. 10–17, 2007.

NAKAMURA, Takashi et al. Cardiovascular efficacy of sitagliptin in patients with diabetes at high risk of cardiovascular disease: a 12 - month follow - up. **Cardiovascular Diabetology**, p. 1–10, 2016.

NAVAB, Mohamad; GHARAVI, Nima; WATSON, Andrew D. Inflammation and metabolic disorders. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 2008.

NISHIDA, Kazuhiko; OTSU, Kinya. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 4, p. 389–398, 2017.

PALA, L.; ROTELLA, C. M. The role of DPP4 activity in cardiovascular districts: in vivo and in vitro evidence. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

PALSSON, Regnar; PATEL, Uptal. D. Cardiovascular Complications of Diabetic Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 21, n. 3, p. 273–280, 2015.

PATIL, Harshal R. et al. Meta-analysis of effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Cardiology**, v. 110, n. 6, p. 826–833, 2012.

PICATOSTE, Belén et al. Sitagliptin Reduces Cardiac Apoptosis, Hypertrophy and Fibrosis Primarily by Insulin-Dependent Mechanisms in Experimental type-II Diabetes. Potential Roles of GLP-1 Isoforms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2013.

PITOCCO, Dario et al. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21525–50, 2013.

PONTES, Luana Braga et al. Vasodilatory activity and antihypertensive profile mediated by inhibition of phosphodiesterase type 1 induced by a novel sulfonamide compound. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 690–700, 2012.

PORTELLA, Viviane G. et al. Sepsis-surviving mice are more susceptible to a secondary kidney insult. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1056–68, 2013.

QI, Yajuan et al. Myocardial Loss of IRS1 and IRS2 Causes Heart Failure and Is Controlled by p38 a MAPK During Insulin Resistance. **Diabetes / Metabolism Research and Reviews**, v. 62, p. 3887–3900, 2013.

RAJESH, Mohanraj et al. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 716–727, 2012.

RAVASSA, Susana et al. The activity of circulating dipeptidyl peptidase-4 is associated with subclinical left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2013.

RAVASSA, Susana; ZUDAIRE, Amaia; DÍEZ, Javier. GLP-1 and cardioprotection: From bench to bedside. **Cardiovascular Research**, v. 94, n. 2, p. 316–323, 2012.

REIS, Flávio et al. The role of inflammation in diabetic cardiomyopathy. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v. Volume 4, p. 59, 2012.

REISNER, Andrew T.; CLIFFORD, Gari D.; MARK, Roger G. The Physiological Basis of the Electrocardiogram. In: **Biomedical Signal and Image Processing**, p. 1–25, 2012.

RESNICK, HE; HOWARD, BV. Diabetes and cardiovascular disease. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 245–67, 2002.

ROGLIC G., UNWIN N., BENNETT P.H., MATHERS C., TUOMILEHTO J., NAG S., CONNOLLY V., King H. The Burden of Mortality Attributable to diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 9, 2005.

RUEDEN, Curtis T. et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 529, 2017.

SAAD, Mohamed I.; KAMEL, Maher A.; HANAFI, Mervat Y. Modulation of adipocytokines production and serum NEFA level by metformin, glimepiride, and sitagliptin in HFD/STZ diabetic rats. **Biochemistry Research International**, v. 2015, 2015.

SAELY, Christoph H.; DREXEL, Heinz. Is type 2 diabetes really a coronary heart disease risk equivalent? **Vascular Pharmacology**, v. 59, n. 1–2, p. 11–8, 2013.

SALTIEL, AR; KAHN, CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. December, p. 799–806, 2001.

SAMUEL, Varman T.; SHULMAN, Gerald I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852–71, 2012.

SANTOS, Leonardo et al. Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure. **Circulation**, v. 128, n. 5, p. 1029–38, 2013.

SASIDHARAN, Suja Rani et al. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. **BioMed Research International**, 2013.

SATO, Youichi et al. Role of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) in the development of dyslipidemia: DPP4 contributes to the steroid metabolism pathway. **Life Sciences**, v. 88, n. 1–2, p. 43–9, 2011.

SATTAR, Naveed et al. Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, p. 633–44, 2018.

SCHEEN, André J. A review of gliptins for 2014. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, p. 43–62, 2015.

SCHINDELIN, Johannes et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–82, 2012.

SHIRAISHI, Isao et al. Nuclear Targetin of Akt Enhances Kinase Activity and

Survival of Cardiomyocytes. **Circulation Research**, v. 94, n. 7, p. 884–891, 2004.

SINGH, Awadhesh Kumar. Deciding oral drugs after metformin in type 2 diabetes: An evidence-based approach. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 617–23, 2014.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 313–320, 2005.

SUN, Mei et al. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. **Circulation**, v. 110, n. 20, p. 3221–3228, 2004.

T. J. ORCHARD, A. M. SECREST, R. G. MILLER, And T. Costacou. In the absence of renal disease, 20-year mortality risk in type 1 diabetes is comparable to that of the general population: A report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetologia**, v. 53, n. 11, p. 2312–2319, 2010.

TATE, Mitchel; GRIEVE, David J.; RITCHIE, Rebecca H. Are targeted therapies for diabetic cardiomyopathy on the horizon? **Clinical Science**, p. 897–915, 2017.

TEIXEIRA, Bruno Costa et al. Marcadores inflamatórios , função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 2, p. 108–115, 2013.

THALLAS-BONKE, Vicki et al. Inhibition of NADPH Oxidase Prevents Advanced Glycation End Product – Mediated Damage in Diabetic Nephropathy Through a Protein Kinase C-alpha-Dependent Pathway. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 460–9, 2008.

TOMKIN, Gerald H. Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors. **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 5, p. 636–50, 2014.

TRIGGLE, Chris R.; DING, Hong. Cardiovascular impact of drugs used in the treatment of diabetes. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 5, n. 6, p. 245–68, 2014.

USSHER, John R.; DRUCKER, Daniel J. Cardiovascular actions of incretin-based therapies. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1788–803, 2014.

VAN DEN OEVER, Inge a M. et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 923-93, 2010.

VILSBØLL, T. The effects of glucagon-like peptide-1 on the beta cell. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 11, p. 11–18, 2009.

WADA, Jun; MAKINO, Hirofumi. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clinical Science**, v. 124, n. 3, p. 139–52, 2013.

WANG, Xia et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 36, n. 1, p. 166–75, 2013.

WAUTIER, JL; SCHMIDT, AM. Protein glycation a firm link to endothelial cell dysfunction. **Circulation Research**, v. 95, n. 1524–4571, p. 233–238, 2004.

WELTY, Francine K.; ALFADDAGH, Abdulhamied; ELAJAMI, Tarek K. Targeting inflammation in metabolic syndrome Translational Research. **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 5, p. 636–50, 2016.

WEN, He Ling et al. Anti-inflammatory effects of triptolide improve left ventricular function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. **Cardiovascular Diabetology**, v. 12, n. 50, p. 1–11, 2013.

WOO, Minna et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. **Genes and Development**, v. 12, n. 6, p. 806–819, 1998.

XU, J.; ZOU, MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. **Circulation**, v. 120, n. 13, p. 1266–1286, 2009.

YAMASAKI, Yoshimitsu et al. Improved Lipid Profiles are Associated with Reduced Incidence of Coronary Vascular Events in Asymptomatic Patients with Type 2 Diabetes and Impaired Myocardial Perfusion. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, p. 5–7, 2012.

YAN, LJ. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 20, 2014.

YASUKO K. BANDO; TOYOAKI MUROHARA. Diabetes-Related Heart Failure - Does Diabetic Cardiomyopathy Exist? **Circulation Journal**, v. 78, p. 576–583, 2014.

YOCHUM, Maxime et al. Automatic detection of P , QRS and T patterns in 12 leads ECG signal based on CWT. **Elsevier**, 2016.

ZAPATA-SUDO, Gisele et al. Docking, synthesis and anti-diabetic activity of novel sulfonylhydrazone derivatives designed as PPAR-gamma agonists. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2037–48, 2012.

ZENG, Yanmei et al. The DPP-4 inhibitor sitagliptin attenuates the progress of atherosclerosis in apolipoprotein-E-knockout mice via AMPK-and MAPK-dependent mechanisms. **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, p. 1–10, 2014.

ZHANG, Cuihua. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, n. 5, p. 398–406, 2008.

ZHANG, Yixuan et al. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 8, p. 1531–1540, 2012.

ZIMMET, Paul; ALBERTI, K.; SHAW, Jonathan. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. December 2001, 2001.

9 ANEXOS



49th Brazilian Congress
of Pharmacology and
Experimental Therapeutics

CERTIFICATE

We certify that

Bryelle Eccard De Oliveira Alves

participated at the 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), held in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, from October 17 to 20, 2017. (28 hours workload)

Maria Christina W. Avellar
Congress President

17-20 October, 2017
Centro de Convenções



Ribeirão Preto, SP, Brazil

CERTIFICATE

 **SBFTE**
49th Brazilian Congress
of Pharmacology and
Experimental Therapeutics
51 Anos
1966 - 2017

We certify that the paper number **6008 "NOVEL DPP4 INHIBITOR REDUCES CARDIAC AND VASCULAR DYSFUNCTION INDUCED BY DIABETES TYPE 2 IN RATS"** by **Eccard B, Reina E, Araújo JSC, Barreiro EJ, Lima LM, Trachez MM, Sudo RT, Zapata-Sudo G** presented by **Bryelle Eccard O. Alves**, was awarded with the **4th** in the **2017 Edition of the José Ribeiro do Valle Award**, conferred annually by the Brazilian Society of Experimental Pharmacology and Therapeutics (SBFTE) in partnership with Biolab Sanus Farmacêutica.



Maria Christina W. Avellar
Congress President

 **biolab**
FARMACÊUTICA

17-20 October, 2017
Centro de Convenções



Ribeirão Preto, SP, Brazil



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 070913 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33663683000116

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Pedro Calmon, 550 - Cidade Universitária

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21941901

País: Brasil

Telefone: (21)37331793

Fax:

Email: agenciadelinovacao@inovacao.ufjf.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSTOS β -AMINO-N-ACILIDRAZÔNICOS E/OU β -AMINO-N-ACILIDRAZIDAS, SEUS SAIS FARMACÊUTICAMENTE ACEITÁVEIS E DERIVADOS, INIBIDORES DE ENZIMA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-4 (DPP4) COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA E/OU ANTI-CITOCINA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS, E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO

Resumo: A presente invenção é relacionada a derivados β -amino-N-acilidrazônicos e/ou β -amino-N-acilidrazidas e seus sais farmacêuticamente aceitáveis que apresentam atividade inibidora da enzima DPP4 e atividade anti-inflamatória e/ou anti-citocina, as composições farmacêuticas hipoglicemiantes compreendendo tais compostos, e processos para a produção dos mesmos. A presente invenção ainda proporciona um método de tratamento de doenças relacionadas com a diabetes mellitus tipo 2 e suas complicações crônicas, devido a propriedade de inibição de DPP4 e/ou a atividade anti-inflamatória e/ou anticitocina.

Figura a publicar: 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/10/2018 às 14:41, Petição 870180139923

Nome: BRYELLE ECCARD DE OLIVEIRA ALVES

CPF: 10563906707

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua José Monteiro da Silva

Cidade: Santo Antônio de Pádua

Estado: RJ

CEP: 28470-000

País: BRASIL

Telefone: (22) 998 030620

Fax:

Email: bryelleccard@gmail.com

Inventor 6 de 6

Nome: LUIS EDUARDO REINA GAMBÁ

CPF: 06262271783

Nacionalidade: Colombiana

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Uruguai 1948, COB: 3 - Andaraí

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20510-061

País: BRASIL

Telefone: (21) 982 154813

Fax:

Email: lereinag@unal.edu.co

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU-200 Nat.10 Dep.PI.pdf
Relatório Descritivo	Relat Descritivo_Inibidores de DPP4_final v3.pdf
Reivindicação	Reivindicacoes_Inibidores de DPP4_final v3.pdf
Desenho	Figuras_Inibidores de DPP4_final v1.pdf
Resumo	Resumo_Inibidores de DPP4_final v2.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/10/2018 às 14:41, Petição 870180139923

Reduction of cardiac and renal dysfunction by new inhibitor of DPP4 in diabetic rats - LASSBio-2124

Bryelle E. O. Alves, Allan K. N. de Alencar, PhD¹;; Margarete M. Trachez, MD, PhD¹; Josenildo S. C. Araújo, PhD¹, Tadeu L. Montagnoli¹, Luiza V. P. Mendes, PhD^{1,2}; Valéria do M. N. Cunha, PhD¹; Roberto T. Sudo, MD, PhD¹; Gisele Zapata-Sudo, MD, PhD^{1*}

¹ Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil

***Corresponding author:** Gisele Zapata-Sudo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, Bloco J, Sala 14, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21941-590 PH/FAX 55-21-39386505. Email: gzsudo@oi.com.br

Acknowledgements: CAPES, CNPq, FAPERJ, INCT-INOVAR

Abstract

Background: Increased mortality due to Diabetes Mellitus tipe 2 (DM2) has related to the combination of renal and/or cardiovascular dysfunction. Dipeptidil dipeptidase 4 inhibitors (iDPP4) may exert cardioprotective effects through their pleiotropic actions via glucagon-like peptide 1-dependent mechanisms, decreasing plasma glucose and lipids, acting on the vascular wall and cardiomyocytes, and reducing blood pressure, silent inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction. **Objective:** We had investigated the pharmacological profile of new DPP4 inhibitors with additional anti-inflammatory activity in rats with cardiac and renal dysfunction induced by diabetes. **Methods:** DM2 was induced in male Wistar rats after 2 weeks receiving high fat diet (composed (%): 45 fat, 35 carbohydrate and 20 protein) followed by intravenous injection of streptozotocin (35 mg/kg). Non-diabetic group received regular diet (10 fat, 70 carbohydrate and 20 protein) and injection of vehicle (tribasic sodium citrate buffer 3%). Animals were divided randomly in 4 groups (6 animals each): non-diabetic, DM2+vehicle, DM2+sitagliptin (22.6 μ mol/kg), DM2+compound named LASSBio-2124 (22.6 μ mol/kg). In all experimental groups, the following parameters were determined: plasmatic glucose, cholesterol and triglyceride before and after treatment with either the vehicle or new iDPP4. The insulin resistance was evaluated using the oral glucose tolerance test and the measurement of serum insulin level. Urinary flow, proteinuria and histological analysis of cortical glomerular tissues and tubular epithelium were determined to investigate renal dysfunction. At the endpoint, invasive measurements of the heart rate, blood pressure and left ventricular pressure were recorded. Vascular reactivity was observed after exposure of increasing concentration of phenylephrine and acetylcholine in aortic rings. Collagen deposition in left ventricle (VE) was evaluated in paraffin-embedded heart. Western blot analysis of heart tissues was used to evaluate specific proteins. **Results:** Glucose level (mg/dL) was increased from 100.8 ± 3.1 to 423.5 ± 8.1 after induction of DM2 which was reduced to 319.8 ± 13.2 and 279.7 ± 17.8 with sitagliptin and LASSBio-2124 administration, respectively. LASSBio-2124 also lowered cholesterol levels and triglycerides (mg/dL) from 76.8 ± 8.0 to 42.7 ± 3.2 and from 229.7 ± 25.4 to 100.7 ± 17.1 , respectively. Levels of plasmatic insulin (pmol/L) decreased in diabetic animals from 102.5 ± 3.6 to 36.5 ± 0.6 and treatment with sitagliptin and LASSBio-2124 increased to 71.2 ± 8.7 and 57.1 ± 9.1 . The new compound recovered the increased urinary flow observed in diabetic animals. Proteinuria (mg/24 h) has decreased from 23.7 ± 1.5 to 13.3 ± 2.8 after treatment with LASSBio-2124. Increased final systolic and diastolic VE pressure were observed and sitagliptin and LASSBio-2124 reversed those parameters. LASSBio-2124 improved acetylcholine-induced relaxation suggesting decreased endothelium dysfunction. An increase in interstitial collagen was found in the LV free wall of diabetic animals when compared to controls. Both treatments prevented its deposition. TNF- α and RAGE were overexpressed in hearts from DM2 rats and recovered with sitagliptin and LASSBio-2124. The activated caspase-3 has increased in DM2 but only LASSBio-2124 reduced that. **Conclusion:** LASSBio-2124 had hypoglycemic effect superior to sitagliptin, reduced final systolic and diastolic VE pressure, TNF α , caspase-3, RAGE, proteinuria and augmented interstitial collagen, and improved acetylcholine-induced relaxation. This new

prototype has shown promising use in DM2 to avoid possible comorbidities through cardioprotective and renalprotective action.

Keywords: Diabetes Mellitus tipe 2, cardiovascular, renal dysfunction, Dipeptidil dipeptidase 4 inhibitors, inflammation

Introduction

Diabetic cardiomyopathy (DCM), a significant contributor to morbidity and mortality in diabetes, is characterized by both diastolic and late-onset systolic dysfunction, hypertension and valvular heart disease [1,2]. Additionally, kidney disease secondary to diabetes mellitus, termed as diabetic nephropathy (DN), accounts for over 40% of end-stage renal disease. It is also a strong predictor of cardiovascular disease and associated mortality [3]. Among the patients with type 1 diabetes, the prevalence of DN is about 40% [4]. Ten years after the diagnosis of type 2 diabetes, about 25% patients have DN [5]. Accumulating evidence indicates that inflammation is an important pathogenic factor during development of both DCM and DN [6–8]. Several preclinical and clinical studies have been addressing that the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) enzyme with a subsequent elevation of plasma insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) represent a promising strategy for the treatment diabetes [9–13] and its comorbidities as cardiorenal dysfunction [14–16]. Nevertheless, there is still a room for development of new therapeutic strategies, mainly regarding a beneficial effect in the inflammatory and oxidative stress components of this deleterious metabolic disorder.

Accordingly, the rational planning for the development of new drugs emerges as an important strategy for expanding and innovating the available pharmacological arsenal. For the design of new molecules, the multifactorial character of this disease and its pathophysiological bases should be considered.

In this work, the molecular hybridization of an antihyperglycemic already used in clinical practice (Sitagliptin) with a compound which has an already characterized anti-inflammatory potential, LASSBio-1773 [17], was performed for the synthesis of a new prototype named LASSBio-2124. Suitably, the effects of this new substance was studied in an animal model of type 2 diabetes mellitus-induced DCM and DN.

Methods

1 Animals and experimental design

The study was developed with the approval of the Ethics and Animal Use Committee of UFRJ, under protocol number DFBCICB041. In the experiments were used male Wistar rats, raised in the Biothermium of the Graduate Program in Pharmacology and Medical Chemistry of the Biomedical Sciences Institute of the Federal University of Rio de Janeiro. For the induction of DM2 a hypercaloric ration (PRAGSOLUÇÕES biociências) was introduced consisting of (kcal%) protein, 20; carbohydrate, 25; fat, 45, this diet was maintained throughout the evaluation period. After 2 weeks the animals kept under this feeding were administered intravenously of streptozotocin (STZ), 35 mg/kg, single dose. In addition, control animals received throughout the normal diet protocol. Animals were considered viable for the experiment after 8 weeks of induction with streptozotocin to have a glycemia \geq 250 mg/dL in the DM2 group. The experimental groups were divided as follows: a. control, (regular diet); b. DM2+vehicle, (vehicle of the sitagliptin); c. DM2+sitagliptin (22,6 μ mol / Kg), and d. DM2+compound. Treatment occurred for fourteen days with daily administration and *p.o.*

2 Blood analyses and body weight

During the evaluation period, it was evaluated weight gain over time. Blood sample was collected from the caudal vein of the animals after a fast of 12-14 h for analysis of the following; glycemia, insulin, total cholesterol and plasma triglyceride. The glucose was determined using the Accu-Chek® monitoring system (ROCHE, Germany), insulin using an ELISA kit (Insulin Ultrasensitive ELISA, Germany) and cholesterol and triglyceride were determined using colorimetric kits (Bioclin, MG, Brazil). In addition, glucose tolerance was also assessed by oral glucose dosing at 2 g/kg, after 12-14 h of fasting of the animals, measurements were then taken prior to glucose administration, and at different times after administration, 15, 30, 60, and 120 min. The HOMA, a mathematical model for assessing insulin homeostasis and

predicting insulin resistance was used by a calculator provided by Oxford University (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>)

3 Treadmill test

The intolerance of exercise, rodent treadmill (EP-131, Insight®, SP, Brazil) was used to assess the exercise capacity, basically consisting of the observation of the time spent, the first three minutes being at an average velocity of 6 m/min from the fourth at 8 to 12 m/min and until animal fatigue at 18 m / min at a slope of 5°. The results obtained were the time traveled (s), distance traveled (m) and effort capacity (kg.m.θ). Exercise intolerance was determined by measuring the running distance until volitional fatigue, which was confirmed by loss of the animal's righting reflex.

4 Renal parameters

4.1 Evaluation of metabolic cages

The animals were housed in metabolic cages (Tecniplast) which provide samples for accurate metabolic monitoring, with dividers allowing separation of feed, water, feces and urine. They were acclimatized for 24 h in the cages and the protocol was performed in the following 24 h. Intake volume (mL / day), volume of urine excreted (mL / day), urinary flow (mL / min), mass of ingested feed (g / day) and mass of feces eliminated (g / day).

4.2 Evaluation of urinary profile

The urine sample (1 mL) was collected in eppendorfs, centrifuged at 13,500 rpm for 10 min, repeated 3 times. Were evaluated in urine: creatinine (mg / dL), proteinuria (mg / ml) and proteinuria and urinary creatinine ratio. The measurements were determined using the Gold Analisa Kit (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and analyzed according to the manufacturer's protocol. Urinary flow (V) was obtained using the following equation: $V = \text{urine volume (mL)} / 24 \text{ hours (1440 min)}$. The results obtained were correlated with histological findings (described below).

5 Cardiovascular function

5.1 Non-Invasive Blood Pressure

Through the tail platemograph (Model LE 5001 Pressure Meter) parameters were determined: systolic, diastolic and mean arterial blood pressure of the animals. These animals have previously acclimatized in the containment recipient. Prior to gauging the animals have kept under a radiant heat source (about 37 ° C). In the proximal portion of the tail has placed the cuff in combination with transducer membrane (tail-cuff), which was connected to the digital BP display panel. The instrument was then turned on and allowed to stabilize until steady pulse rate was observed. Once the “pulse level ready” signal appeared, the Blood Pressure recording button was pressed and the systolic, diastolic and mean arterial Blood Pressure was recorded. The blood pressure was recorded at various time intervals.

5.2 Cardiac function measured by invasive measurements of the heart rate

At the endpoint of the protocol the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (80 and 15 mg / dL, ip), after which the right carotid artery was dissected and a heparinized catheter with NaCl solution (0.96%) was inserted to a pressure transducer (MLT884, ADInstruments). After stabilization of blood pressure we evaluated systolic pressure and diastolic pressure, so the catheter was introduced reaching the Left Ventricle (LV). We evaluated the intraventricular hemodynamic parameters left ventricular systolic pressure (LVSP) and end-diastolic pressure (LVEDP) and. All records were stored on the computer for later analysis of results (Powerlab, ADInstruments, USA) using the Lab Chart program (7.0 Version, ADInstruments, USA). To record the electrocardiogram electrodes were placed on the surface of the animal in the thoracic region and the derivation II was used for QT interval analyzes.

6 Vascular reactivity of the aorta

In order to evaluate the vascular reactivity of the animals, after verification of the intraventricular pressure and euthanasia of the animal, the thoracic

portion of the aorta was dissected and sectioned in rings of approximately 2-3 mm. The vascular reactivity was evaluated according to the already published work [18].

7 Histological studies and weigh heart and kidneys

At the end of the experimental protocol the animals were euthanized under deep anesthesia through abdominal cavity dissection and the kidneys and heart before being cut and stored for histology were weighed and these values were normalized by the tibia length of each animal.

For histological analysis, right kidneys and heart apexes were fixed in Gendre's fluid and zinc formalin, respectively, and embedded in paraffin. Tissue blocks were sectioned at 5 μ m and stained for examination under a light microscope (Axiostar, Zeiss, Germany).

Left ventricular and tubulointerstitial collagen content were analyzed with Fiji cin picro-Sirius red stained sections and expressed as a mean of the red-stained area in 15-20 fields (400x magnification) without vessels and glomeruli.

Kidney sections were also stained by periodic acid-Schiff (PAS) for evaluation of tubular and glomerular injury. Mesangial area was measured in 20 random cortical glomeruli (1000x magnification) and expressed as a fraction of glomerular tuft area. Tubulointerstitial injury was analyzed in the whole section by means of a semi-quantitative score based on frequency and severity (0: absent; 1: minimal; 2: mild; 3: moderate; 4: severe) of five parameters (interstitial edema, luminal casts, tubular dilation, intracellular glycogen accumulation and epithelial injury) [19–23] and a mean score was thus obtained.

8 Immunohistochemistry

Coronal paraffin sections in the apical portion were performed immunohistochemical technique to evaluate the activation of the p38- α pathway. The sections were rehydrated and washed with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 minutes and, after antigen retrieval in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for 20 minutes, blocking of non-specific binding with PBS- 0.1% BSA for 30 minutes. The antibody was then incubated in the wet chamber with the primary antibody (anti-p38- α , AbCam, ab7952) diluted 1: 200 in 0.1% PBS-

BSA overnight at 4 ° C. After washing with PBS, the slides were incubated in 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidases and then incubated with the secondary antibody (Nichirei, 414191F) diluted 1: 3. Disclosure was performed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 minutes and counter-staining for 5 minutes in Harris hematoxylin. After dehydration and assembly of the slides, the activation of p38 was analyzed by the percentage of cardiomyocyte nuclei found with brown staining by the analysis of eight fields in the left ventricle under 1000x magnification.

9 Membrane preparations and Western blot analysis

The preparation of rat heart subcellular fractions and the subsequent western blot analysis and protein expression levels quantification were performed as the already published work [24].

10 Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance, two- way analysis of variance and multiple-comparison test when appropriate and t-test. The minimum acceptable level of significance was $P \leq 0.05$. Analyses were performed using GraphPad Prism, version 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

1 Blood analyses and body weight

During the evaluation period, the animals of the different experimental groups were weighted, with weight gain over time, but there was no significant difference between the experimental groups, indicating that the induction of type 2 DM, as well as the treatment of DM2 group with sitagliptin did not influence the weight gain of these animals (Figure 2A).

Glucose level (mg/dL) was increased from 100.8 ± 3.14 to 423.5 ± 8.1 after established the DM2 and treatment with sitagliptin and compound reduced to 319.8 ± 13.2 and 279.7 ± 17.8 , respectively. Two hours after OGTT, plasmatic level of glucose returned to normal in diabetic animals treated with sitagliptin or compound. The new inhibitor also lowered cholesterol levels and triglycerides (mg/dL) from 76.8 ± 8.0 to 42.7 ± 3.2 and from 229.7 ± 25.4 to 100.7 ± 17.1 , respectively. Insulin level (pmol/L) decreased in diabetic animals from 102.5 ± 3.6 to 36.5 ± 0.6 and recovered to 71.2 ± 8.7 and 57.1 ± 9.1 after treatment with sitagliptin and compound, respectively (Figure 2 B - F).

From the data of insulin and plasma glucose, the HOMA-IR index (homeostatic evaluation model) was calculated. According to Figure 2 G (insulin resistance) of the DM2 group treated with vehicle increased (7.8 ± 3.5) when compared to the control group (1.8 ± 0.1), indicating insulin resistance in these animals. However, treatment with the compound reduced this value to a value similar to the control (1.6 ± 0.2) and with a significant difference from treatment with sitagliptin (3.4 ± 0.5). The estimates of beta cell function (%B) has decreased in of the DM2 group treated with vehicle (from 102.0 ± 0.6 to 4.6 ± 0.4) and treatment with sitagliptin and compound has recovered, 10.3 ± 1.1 and 11.0 ± 2.2 , respectively (Data not show). HOMA-IR has been used for the diagnosis of DM2 and metabolic syndrome which are most often accompanied by obesity as we have seen in our DM2 groups, as well as increased levels of total cholesterol, hypertension, and other cardiovascular dysfunctions.

2 Treadmill test

After the experimental protocol of DM2, there was a significant decrease in the parameters evaluated in the treadmill test, but after two weeks of treatment none of the substances (sitagliptin or compound) were able to recover (Data not show).

3 Renal parameters

3.1 Functional aspects

Diabetic animals showed a high range of polyuria with an increase urinary flow (Figure 3 A) from 0.009 ± 0.0001 to 0.09 ± 0.003 (mL/min). Interestingly, the treatment of diabetic animals with LASSBio-2124 reduced partially to 0.07 ± 0.005 (mL/min, $P < 0.05$). Urine samples were collected to evaluate biochemical compositions like proteinuria (mg/24 hrs) (Figure 3 B). This parameter increased to 23.7 ± 1.5 (mg/24 hrs) compared to vehicle group and a significantly reduced proteinuria was observed in the LASSBio-2124 group (13.3 ± 2.8 , $P < 0.05$). In the end point experimental protocol kidney weight (Data not show) presented an increase in mass that only the treatment with LASSBio-2124 was able to reduce totally ($P < 0.05$).

3.2 Renal histological assessment

At 12 weeks, diabetic rats showed an evident expansion of glomerular mesangial matrix when compared to non-diabetic animals (Figure 3 C, $P < 0.05$) and either sitagliptin or LASSBio-2124 hampered its progression ($P < 0.05$ vs. diabetic-vehicle), in a close relation to proteinuria levels ($r = 0.61$, $P = 0.004$). However, neither treatment could ameliorate the increased tubular injury and tubulointerstitial collagen deposition (Figure 3 D and E) found in diabetic animals ($P < 0.05$, vs. controls) and these parameters correlated well with the persistent polyuria in diabetic groups ($r = 0.74$, $P = 0.0002$ vs. injury score; $r = 0.59$, $P = 0.006$ vs. collagen content).

4 Cardiovascular function

4.1 Non-Invasive Blood Pressure

The new compound presented similar responses in noninvasive blood pressure compared to the drug already used in clinical practice, sitagliptin. At systolic pressure decreases from 219.9 ± 7.8 (mmHg) to 143.8 ± 12.4 (mmHg) and in the diastolic pressure from 162.1 ± 7.02 (mmHg) to 111.5 ± 9.02 (mmHg) (Figure 4 A and B, respectively). The same we can observed in mean blood pressure (Figure 4 C).

4.2 Cardiac function measured by invasive measurements of the heart rate

Final systolic and diastolic LV pressure (mmHg) was increase (from 87.90 ± 5.35 and 7.81 ± 1.16 to 138.1 ± 4.79 and 44.79 ± 5.31) in diabetic animals and both parameters were reverted by sitagliptin (90.79 ± 3.99 and 6.98 ± 1.26) and compound (107.9 ± 7.08 and 6.52 ± 1.13) (Figure 5 B,C). Compere with non-diabetics, diabetics animals showed a decreased \pm dP/dt max ($P < 0.05$ vs. diabetic-vehicle), however LASSBio-2124 reversed the $-$ dP/dt max (Figure 5 D,E).

5 Heart weight, histological and immunohistochemistry assessment of the heart tissues

After the euthanasia of the animals, the DM2+Vehicle group presented an increase of the heart mass after normalized by tibia length of each animal (Figure 6 C) of 4.15 ± 0.08 (g/mm) (non-diabetic) to 4.59 ± 0.08 (g/mm) and only LASSBio-2124 was able of reverting completely (3.83 ± 0.11 g/mm, $P < 0.05$).

A increase in interstitial collagen was found in the LV free wall of diabetic animals when compared to controls (Figure 6 D, $P < 0.05$). Both treatments prevented its deposition ($P < 0.05$, vs. diabetic) and maintained collagen area at non-diabetic levels. In the immunohistochemistry assessment, the p38 α MAPK has showed an increase compared to normal animals, but none of the treatments were able to reverse this parameter (Figure 6 E, $P < 0.05$).

6 Vascular reactivity of the aorta

Only vehicle was shifted to the right of the aortic ring curve in comparison to the non-diabetic group, demonstrating reduced responsiveness to ACh indicating possible endothelial dysfunction. However, the aortic rings of DM2 animals that were treated with sitagliptin and LASSBio-2124 compound demonstrated increased responsiveness to ACh with displacement of the left shift response concentration curve (Figure 7). In Table 1 we calculated Ach-induced Relaxation and the mean excitatory concentration (EC50) of ACh in these same aortic rings, being decreased in the DM2 + vehicle groups when compared to the non-diabetic groups, whereas the EC50 of the DM2 + vehicle group is increased and treatment with LASSBio-2124 presented an equal response to treatment with sitagliptin. With power and fictivity similar to sitagliptin. LASSBio-2124 treatment improved the acetylcholine-induced relaxation of aorta from diabetic animals with efficacy and potency similar to sitagliptin, a drug already used in clinical practice indicating recovery of DM2-induced endothelium dysfunction.

7 Expression of cardiac proteins

Western blot analysis of heart tissues showed that DM2 increased the relative expression of PLB (DM2+vehicle vs. Non-diabetic, $P < 0.05$). This parameter was normalized after treatment with sitagliptin and LASSBio-2124 (DM2+LASSBio vs. DM2+vehicle, $P < 0.05$, Figure 8 C). TNF- α was overexpressed in hearts from DM2 rats ($P < 0.05$ vs. Non-diabetic), and partially recovered with sitagliptin and LASSBio-2124 (DM2+LASSBio vs. DM2+vehicle, $P < 0.05$, Figure 8 F). The same occur with caspase 3, but only LASSBio recovered completely (DM2+LASSBio vs. DM2+vehicle, $P < 0.05$, Figure 8 G). Downregulation of BCL2 were significantly in diabetic heart (DM2+vehicle vs. Non-diabetic, $P < 0.05$, Figure 8 H).

Discussion

The metabolic syndrome is a pre-existing diabetes mellitus type 2 (DM2) that is already present, and the metabolic disorder is present throughout the course of the disease and triggers inflammatory processes. Because of this, DM2 is considered to be a pro-inflammatory disease. Inflammation is the

triggering factor for changes in micro and macrovasculature that culminates in the pathophysiology of cardiomyopathy and diabetic nephropathy [25–29] and is closely related to fat deposition.

In our data the new compound reduced hyperglycemia and glucose intolerance better than sitagliptin. DPP-IV inhibitors, as sitagliptin, suppress the DPP-IV activity and consequently, prolong GLP-1 half-life. GLP-1 accounts for at least 50-70% of postprandial insulin secretion, improving the glycemic control by a glucose-dependent mechanism [30].

According to the criteria of the World Health Organization (WHO) and the National Cholesterol Education Program (NCEP) for diagnosis of metabolic syndrome, the change in lipid profile suggests a dyslipidemia. These data were observed in the animals used in this study after induction of DM2, by hypercaloric diet before and after the injection of low dose streptozotocin (HFD-STZ), which showed elevated serum triglycerides and total cholesterol, corroborating one of the diagnostic criteria. Other works in models close to the one used in the present study also found significantly higher values of triglycerides and cholesterol [31,32]. The mechanisms for this lipidemic control may be related to the GLP-1 effect on lipid absorption and metabolism [13,33] with a dual mechanism anti-inflammatory, that has been shown in previous studies to be an inhibitory mechanism for lipid accumulation [25,34,35].

HOMA-IR has been used for the diagnosis of DM2 and metabolic syndrome which are most often accompanied by obesity as we have seen in our DM2 groups, as well as increased levels of total cholesterol, hypertension, and other cardiovascular dysfunctions. The increase in glycemia in the diabetic group showed a greater reduction with the use of the new compound, which reflected in a decrease of the insulin resistance (IR) by the calculation of HOMA and an optimization of the function of β cells by the partial increase of the percentage of the mass of these cells. Glucose intolerance was confirmed by the oral glucose tolerance test with a significant difference between the DM2 group and the normal group with a significant reduction by the use of the new compound, which would also justify the decrease of IR even though there was no significant increase in levels insulin plastics.

The diabetic animals had a high polyuria with increased urinary flow and increased proteinuria. In the structural aspect we can observe in diabetic animals mesangial matrix expansion, collagen deposition and tubulointerstitial injury. DN is characterized by structural and functional changes. At the beginning of DN, tubular hypertrophy is present, but eventually interstitial fibrosis [26]. Possibly four primary factors responsible for the fibrosis mechanism observed in diabetic nephropathy, first the RAAS, which activates the transforming growth factor beta (TGF- β) pathway; followed AGE–RAGE axis, which suppresses collagen turnover via abnormal crosslinking of collagen. The hyperinsulinemia is other play, which impairs differentiation of fibroblast progenitor cells and dysregulation of extracellular matrix degradation because of hyperglycemia [36]. Functionally, there is early glomerular hyperfiltration and increased albumin excretion; and with advanced nephropathy, increasing proteinuria [26]. These data suggest that our animals are at a more advanced stage of the disease due to increased tubulointerstitial collagen deposition as well as increased levels of proteinuria. And the new compound was able to reverse both the functional and the mesangial expansion of diabetic rats. A possible mechanism of action, the reduction of hyperglycemia is followed by a decrease in oxidative stress with decrease of ROS. Studies have shown that blocking ROS formation is related to benefits in renal function, preventing the progression of ND [36–38].

In the cardiovascular action, the LASSBio-2124 was able to reverse both systolic and diastolic pressure corroborating previous studies where they demonstrated with the use of a DPP-4 inhibitor a cardiovascular protection in preclinical studies of normoglycemic and diabetic rodents and pigs, and reductions in blood pressure, postprandial lipids markers of inflammation, and oxidative stress in clinical studies [23,44,45].

The loss of this homeostase in the presence of hyperglycaemia, hyperlipidaemia and insulin resistance in diabetes causes ROS generation, endothelial cell activation and cardiac inflammation, leads cardiac energetic deficiency, mitochondrial dysfunction, myocardial structural damage, linking impaired cardiac function [36]. The reversal of cardiac dysfunction after treatment with LASSBio-2124 is due to the reestablishment of homeostasis in

these animals due to a decrease in blood glucose and an improvement in insulin resistance. The action of sitagliptin confers additive effect to the compound, since the two therapies act by different mechanisms to improve the insulin resistance which entails in a probable cardioprotective effect better than in relation to sitagliptin. These finds are consensus with a clinical studies of the Fujiwara et al [41], where they concluded wih DPP4 inhibitors improved left ventricular diastolic function in patients with DM who presented with MI. The increase in tension in the extracellular matrix, this is a signal to increase the local production of cytokines in the heart (mainly TNF-alpha), which accelerates the fibrosis process, which leads to cardiac dysfunction [42].

Histological assessment of the heart tissues of the diabetic animals have showed a increased collagen deposition in agreement with previous studies that have shown increased myocardial fibrosis with increased type I and III collagen deposition in the interstitial and perivascular regions of both ventricles [43]. Furthermore, the extent of fibrosis correlates with heart weight [44], which corroborates with our data. Cardiac fibrosis and impaired cardiac relaxation are considered to be a consequence of abnormalities in ECM signalling and structure in diabetic cardiomyopathy, due increased deposition of ECM proteins [42]. the increase of this deposition and reduction of the activity of enzymes degrading EMC, contributing to increase the myocardial stiffness and to promote the dilatation of the cardiac chamber secondary to the sliding of the myocyte [45]. A previous study has shown that sitagliptin was able to promote the antifibrotic effect in culture of cardiac devices. The effect may be related to the increased half-life intensity of GLP-1 [46], corroborating with our result. Activation of p38 in the heart by hyperinsulinemia or other metabolic stresses promotes IRS1 and IRS2 degradation and dysregulates cardiac glucose and lipid metabolism, mitochondrial biogenesis, calcium-handling, fibrosis, and motor gene expression, resulting in heart failure [47]. Being one of the possible mechanism of a poor cardiac prognosis. In a recent study have reported that TNF-a induces cardiomyocyte apoptosis by upregulating p38 phosphorylation [48]. With LASSBio-2124 treatment there was no recovery of this parameter, which could be an indication that the new compound would not act in this way, having other mechanisms in cardioprotection, such as activation of the kinase

pathway linked to injury / reperfusion in which one of the inhibited pathways are from Caspase-3, due to the increase in GLP-1 half-life and its direct action on cardiomyocytes through sitagliptin.

In the vascular reactivity test the compound treated group demonstrated increased ACh responsiveness with similar potency to sitagliptin, but with an increase in the percentage of partial relaxation. In a study with endothelial cell culture, increased Akt-eNOS activation by inhibition of DPP-4 induced the release of NO [49], which suggests a regulation of the vascular tonus of sitagliptin through the action of the NO system and an anti-inflammatory additive effect of the compound.

Increase of PLB in diabetic animals, suggest that Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum is reduced, which contributes to the Ca^{2+} overload. Consequently, the release of less Ca^{2+} upon activation reduces force development. The restored with the new compound increase the contractile force, improving hemodynamics in hearts from rats with LV diastolic dysfunction. In cardiomyocytes activation by metabolic disorders causes mitochondrial dysfunction, which leads to: 1 oxidative stress resulting in impaired insulin signaling and 2 endoplasmic reticulum stress which leads to abnormal manipulation of Ca^{2+} and death and rigidity of cardiomyocytes culminating in diabetic cardiomyopathy [50]. And the increased GLP-1 activity due sitagliptin, activated the eNOS/cGMP/PKG signaling pathway and inhibited the Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) pathways [51], indicating one of the possible mechanism of action of cardioprotection.

Inflammation is a key pathophysiologic factor in diabetic cardiomyopathy [52] and an anti-inflammatory effect is expected from the new compound by part of the molecule containing LASSBio-1772. TNF- α is involved in endothelial dysfunction, corrupting vascular homeostasis [53] since increase apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes [48]. The treatment with the novel compound was able to reverse the increase in TNF- α expression compared to diabetic animals. One of the reflexes may be reversion of adverse cardiac remodeling and improvement in vascular response.

In agreement with the previous result, where a decrease in TNF- α expression was observed, the new compound showed reversion in active

caspase-3, a protein that plays a central role in the execution phase of cellular apoptosis [54]. In a previous study, Ravassa et al.[55] have demonstrated a cardioprotection through the effects of incretin GLP-1 through the activation of the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway, which has anti-apoptotic and anti-necrotic action, culminating in cardiac survival and improved function.

Cardiac fibrosis is presumably similar to the mechanism observed in diabetic nephropathy [36], so one of the factors are AGE–RAGE axis. In diabetic animals the expression of RAGE have increased and both treatment reverted. The expression of receptors for the AGE (Advanced glycation end product) pathway activates extracellular matrix remodeling and myocardial fibrosis by increasing levels of oxidative stress. AGE / RAGE signaling causes the activation of multiple intracellular signal pathways involving NADPH oxidase, protein kinase C and MAPKs, resulting in NF-kappaB activity. And finally the expression of receptors for the AGE (Advanced glycation end product) pathway linked to oxidative stress [38,42,56,57]. Ultimately, the accumulation of myocardial fibrosis inevitably leads to cardiac dysfunction [42]. This information suggests that the new prototype may also be acting through a direct anti-oxidant mechanism or because of its anti-hyperglycaemic action inhibiting the cascade from damage and improving the adverse remodeling in the myocardium of diabetic rats. Further studies are need to elucidate these issues.

Conclusion

The new DPP4 inhibitor produced not only a hypoglycemic effect but also improved the glomerular, ventricular and vascular dysfunction induced by DM2. This new prototype could be useful to reduce the metabolic disturbance as well as to avoid possible comorbidities through possible cardiorenal protective action.

References

- [1] Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Diabetic cardiomyopathy: Understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Failure Reviews* 2012;17:325–44. doi:10.1007/s10741-011-9257-z.
- [2] Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects Sihem. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11:31–9. doi:10.1007/s11154-010-9131-7.Diabetic.
- [3] T. J. Orchard, A. M. Secrest, R. G. Miller and TC. In the absence of renal disease, 20-year mortality risk in type 1 diabetes is comparable to that of the general population: A report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2010;53:2312–9. doi:10.1007/s00125-010-1860-3.In.
- [4] Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: An epidemiological study. *Diabetologia* 1983;25:496–501. doi:10.1007/BF00284458.
- [5] Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney International* 2003;63:225–32. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00712.x.
- [6] Wen HL, Liang ZS, Zhang R, Yang K. Anti-inflammatory effects of triptolide improve left ventricular function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology* 2013;12:1–11. doi:10.1186/1475-2840-12-50.
- [7] Montserrat B Duran-Salgado AFR-GM. Diabetic nephropathy and inflammation. *World Journal of Diabetes* 2006;6:463–8. doi:10.1007/s11892-006-0080-1.
- [8] Rajesh M, Bátkai S, Kechrid M, Mukhopadhyay P, Lee WS, Horváth B, et al. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2012;61:716–27. doi:10.2337/db11-0477.
- [9] Kirino Y, Sato Y, Kamimoto T, Kawazoe K, Minakuchi K, Nakahori Y.

- Interrelationship of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) with the development of diabetes, dyslipidaemia and nephropathy: a streptozotocin-induced model using wild-type and DPP4-deficient rats. *The Journal of Endocrinology* 2009;200:53–61. doi:10.1677/JOE-08-0424.
- [10] Sato Y, Koshioka S, Kirino Y, Kamimoto T, Kawazoe K, Abe S, et al. Role of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) in the development of dyslipidemia: DPP4 contributes to the steroid metabolism pathway. *Life Sciences* 2011;88:43–9. doi:10.1016/j.lfs.2010.10.019.
- [11] Inzucchi SE, McGuire DK. New drugs for the treatment of diabetes: part II: Incretin-based therapy and beyond. *Circulation* 2008;117:574–84. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.735795.
- [12] Hinnen D, Nielsen L. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes. *The Journal of the ...* 2006;19:12–4.
- [13] Ussher JR, Drucker DJ. Cardiovascular actions of incretin-based therapies. *Circulation Research* 2014;114:1788–803.
- [14] Avogaro A, Kreutzenberg S, Fadini G. Dipeptidyl-peptidase 4 Inhibition: Linking Metabolic Control to Cardiovascular Protection. *Current Pharmaceutical Design* 2014;20:2387–94.
- [15] Santos L, Salles T a, Arruda-Junior DF, Campos LCG, Pereira AC, Barreto ALT, et al. Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure. *Circulation Heart Failure* 2013;6:1029–38.
- [16] Bittle PA. Use of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *The Nurse Practitioner* 2017;31–8. doi:10.1111/dme.12064.
- [17] Costa FP. Novos candidatos a protótipos de fármacos hipoglicemiantes com atividade anti-inflamatória: LASSBio-1773 e LASSBio-1774. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.
- [18] Pontes LB, Antunes F, Sudo RT, Raimundo JM, Lima LM, Barreiro EJ, et al. Vasodilatory activity and antihypertensive profile mediated by inhibition of phosphodiesterase type 1 induced by a novel sulfonamide compound. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2012;26:690–700.

doi:10.1111/j.1472-8206.2011.00999.x.

- [19] Gomes CLR, Leão CL, Venturotti C, Barreira AL, Guimarães G, Fonseca RJC, et al. The protective role of fucosylated chondroitin sulfate, a distinct glycosaminoglycan, in a murine model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *PloS One* 2014;9:e106929. doi:10.1371/journal.pone.0106929.
- [20] Landgraf SS, Silva LS, Peruchetti DB, Sirtoli GM, Moraes-Santos F, Portella VG, et al. 5-Lipoxygenase products are involved in renal tubulointerstitial injury induced by albumin overload in proximal tubules in mice. *PloS One* 2014;9:e107549. doi:10.1371/journal.pone.0107549.
- [21] Grgic I, Campanholle G, Bijol V, Wang C, Sabbisetti VS, Ichimura T, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney International* 2012;82:172–83. doi:10.1038/ki.2012.20.
- [22] Portella VG, Silva-Filho JL, Landgraf SS, de Rico TB, Vieira MAR, Takiya CM, et al. Sepsis-surviving mice are more susceptible to a secondary kidney insult. *Critical Care Medicine* 2013;41:1056–68. doi:10.1097/CCM.0b013e3182746696.
- [23] Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. *Toxicologic Pathology* 2012;40:14S–86S. doi:10.1177/0192623312438736.
- [24] Alencar AKN, Pereira SL, Da Silva FE, Mendes LVP, Cunha VDMN, Lima LM, et al. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. *International Journal of Cardiology* 2014;173:154–62. doi:10.1016/j.ijcard.2014.02.022.
- [25] Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2015;24:283–307. doi:10.1517/13543784.2015.974804.
- [26] Lim AK. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* 2014;7:361–81.

doi:10.2147/IJNRD.S40172.

- [27] Navab M, Gharavi N, Watson AD. Inflammation and metabolic disorders. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2008. doi:10.1097/MCO.0b013e32830460c2.
- [28] Yamasaki Y, Katakami N, Kaneto H, Nakajima K, Kusuoka H. Improved Lipid Profiles are Associated with Reduced Incidence of Coronary Vascular Events in Asymptomatic Patients with Type 2 Diabetes and Impaired Myocardial Perfusion 2012;5–7.
- [29] Hwang J, Wu T, Chou SC, Ho C, Chang P, Tsao K, et al. Development of Multiple Complications in Type 2 Diabetes Is Associated With the Increase of Multiple Markers of Chronic Inflammation 2008;13:6–13. doi:10.1002/jcla.
- [30] Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocrine Reviews* 2014;35:992–1019. doi:10.1210/er.2014-1035.
- [31] Saad MI, Kamel MA, Hanafi MY. Modulation of adipocytokines production and serum NEFA level by metformin, glimepiride, and sitagliptin in HFD/STZ diabetic rats. *Biochemistry Research International* 2015;2015. doi:10.1155/2015/138134.
- [32] Mansor LS, Gonzalez ER, Cole M a, Tyler DJ, Beeson JH, Clarke K, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovascular Diabetology* 2013;12:136. doi:10.1186/1475-2840-12-136.
- [33] Cobble M. Differentiating among incretin-based therapies in the management of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012;4:8. doi:10.1186/1758-5996-4-8.
- [34] Lopes-Virella MF, Virella G. The role of immunity and inflammation in the development of diabetic complications. *Diabetology International* 2013;4:1–8. doi:10.1007/s13340-013-0105-3.
- [35] Cruz NG, Sousa LP, Sousa MO, Pietrani NT, Fernandes AP, Gomes KB. The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2013;99:85–92.
- [36] Yasuko K. Bando; Toyooki Murohara. Diabetes-Related Heart Failure -

- Does Diabetic Cardiomyopathy Exist? *Circulation Journal* 2014;78:576–83.
- [37] Arora MK, Singh UK. Oxidative Stress: Meeting Multiple Targets in Pathogenesis of Diabetic Nephropathy Polyol Pathway Glucose. *Current Drug Targets* 2014;15:531–8.
- [38] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 2010;107:1058–70.
- [39] Lee TI, Kao YH, Chen YC, Huang JH, Hsu MI, Chen YJ. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-sitagliptin modulates calcium dysregulation, inflammation, and PPARs in hypertensive cardiomyocytes. *International Journal of Cardiology* 2013;168:5390–5. doi:10.1016/j.ijcard.2013.08.051.
- [40] Triggle CR, Ding H. Cardiovascular impact of drugs used in the treatment of diabetes. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 2014;5:245–68. doi:10.1177/2040622314546125.
- [41] Fujiwara T, Yoshida M, Nakamura T, Sakakura K, Wada H, Arao K, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors are associated with improved left ventricular diastolic function after acute myocardial infarction in diabetic patients. *Heart and Vessels* 2015;30:696–701. doi:10.1007/s00380-014-0509-4.
- [42] Tate M, Grieve DJ, Ritchie RH. Are targeted therapies for diabetic cardiomyopathy on the horizon? 2017:897–915.
- [43] Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, et al. Nuclear Targetin of Akt Enhances Kinase Activity and Survival of Cardiomyocytes. *Circulation Research* 2004;94:884–91. doi:10.1161/01.RES.0000124394.01180.BE.
- [44] Guo S, Dunn SL, White MF. The Reciprocal Stability of FOXO1 and IRS2 Creates a Regulatory Circuit that Controls Insulin Signaling. *Molecular Endocrinology* 2006;20:3389–99. doi:10.1210/me.2006-0092.
- [45] PPARs as therapeutic targets in cardiovascular disease n.d.
- [46] Picatoste B, Ramirez E, Caro-Vadillo A, Iborra C, Egido J, Tuñon J, et al. Sitagliptin Reduces Cardiac Apoptosis, Hypertrophy and Fibrosis Primarily by Insulin-Dependent Mechanisms in Experimental type-II Diabetes. Potential Roles of GLP-1 Isoforms. *PLoS ONE* 2013.

doi:10.1371/journal.pone.0078330.

- [47] Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H, et al. Myocardial Loss of IRS1 and IRS2 Causes Heart Failure and Is Controlled by p38 a MAPK During Insulin Resistance 2013;62:3887–900. doi:10.2337/db13-0095.
- [48] Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK. IL-10 attenuates TNF- α -induced NF κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovascular Research* 2009;82:59–66. doi:10.1093/cvr/cvp040.
- [49] Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: Beyond GLP-1. *Vascular Pharmacology* 2011;55:10–6. doi:10.1016/j.vph.2011.05.001.
- [50] Jia G, Demarco VG, Sowers JR, Drive OH. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy 2016;12:144–53.
- [51] Chen J, Wang D, Wang F, Shi S, Chen Y, Yang B, et al. Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca²⁺homeostasis in rats with heart failure via the GLP-1 receptor through the eNOS/cGMP/PKG pathway. *Peptides* 2017;90:69–77. doi:10.1016/j.peptides.2017.02.008.
- [52] Liu YS, Huang ZW, Wang L, Liu XX, Wang YM, Zhang Y, et al. Sitagliptin alleviated myocardial remodeling of the left ventricle and improved cardiac diastolic dysfunction in diabetic rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 2015;127:260–74.
- [53] Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Research in Cardiology* 2008;103:398–406.
- [54] Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, et al. Essential contribution of caspase 3/CPPp32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes and Development* 1998;12:806–19.
- [55] Ravassa S, Zudaire A, Díez J. GLP-1 and cardioprotection: From bench to bedside. *Cardiovascular Research* 2012;94:316–23.
- [56] Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14:21525–50.
- [57] Goldin A, Beckman J a., Schmidt AM, Creager M a. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 2006; 114:597–605.

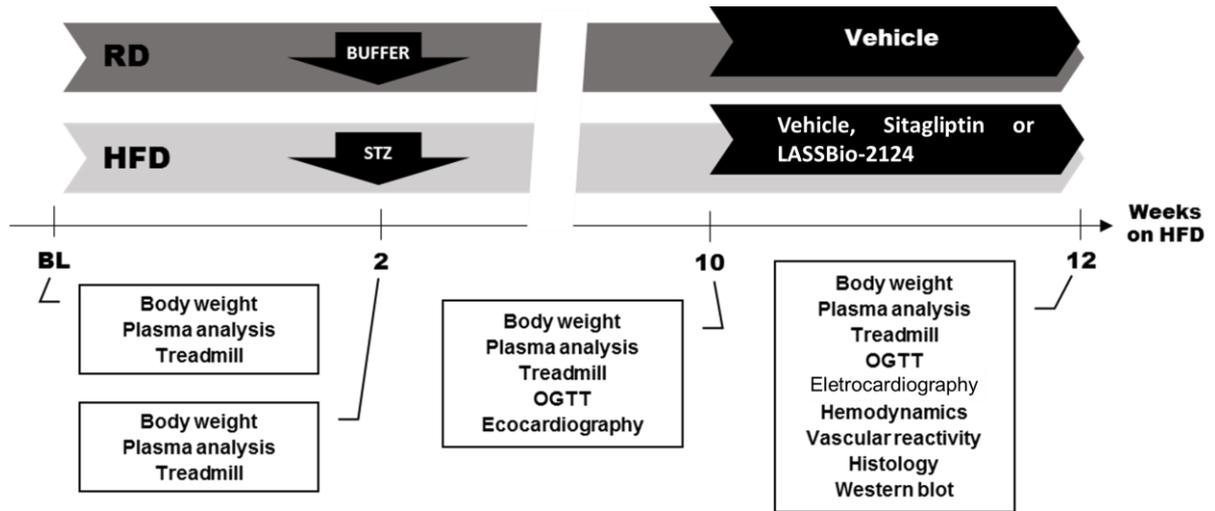


Fig. 1. Experimental protocols. Overview of the study.

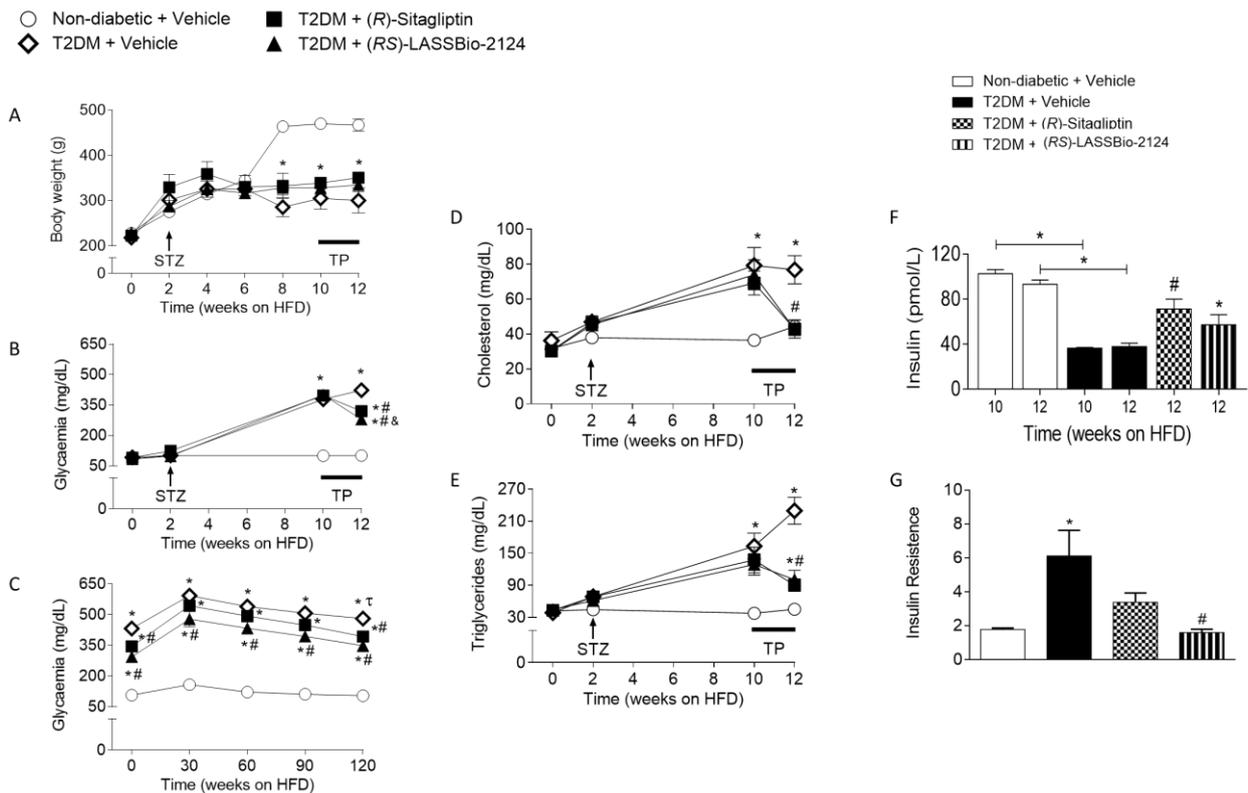


Fig. 2. Blood analysis demonstrating metabolic disturbance and body weight. (A) Body weight and the blood analysis: (B) Plasma glucose, (C) Oral glucose tolerance test after 2 weeks orally treatment, (D) Cholesterol and (E) Triglycerides. The (F) Insulin over 10 weeks of protocol and orally treatment during 2 weeks. After calculating the HOMA index we obtained the (G) Insulin Resistance. Data represent the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ rats per group). * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic; # $P < 0.05$ vs. T2DM + Vehicle; & $P < 0.05$ vs. T2DM + Sitagliptin; † $P < 0.05$ vs. 120 min. by two-way ANOVA and one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. HFD = High Fat Diet; STZ = Streptozotocin; TP = therapeutic protocol.

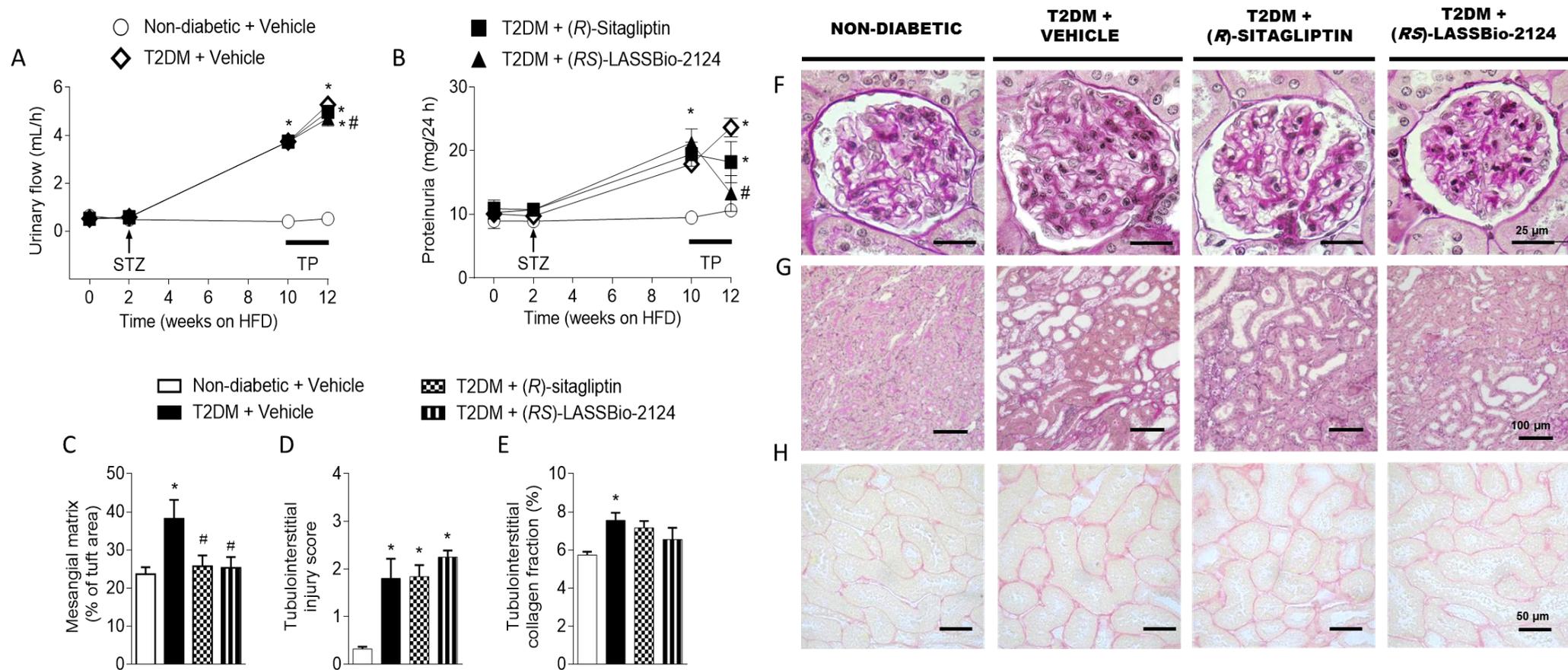


Fig. 3. Renal functional and histological analysis. Urinary flows (A) were observed in diabetic groups, irrespective of treatment, but 24 h-proteinuria (B). Accentuated mesangial expansion (C) was found only in vehicle treated diabetic animals ($P < 0.05$ vs. non-diabetic). Higher injury scores (D) and collagen fractions (E) showed significant improvement in sitagliptin and LASSBio groups ($P < 0.05$ vs. diabetic+vehicle). Representative images of cortical glomeruli (D, PAS stain; bar: 25 μ m) and tubular epithelium (E, PAS stain, bar: 100 μ m; and F, PSR stain, bar: 50 μ m) showing histological alterations in diabetic animals. Analyze by two-way ANOVA and one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

○ Non-diabetic + Vehicle ◇ T2DM + Vehicle ■ T2DM + (R)-Sitagliptin ▲ T2DM + (RS)-LASSBio-2124

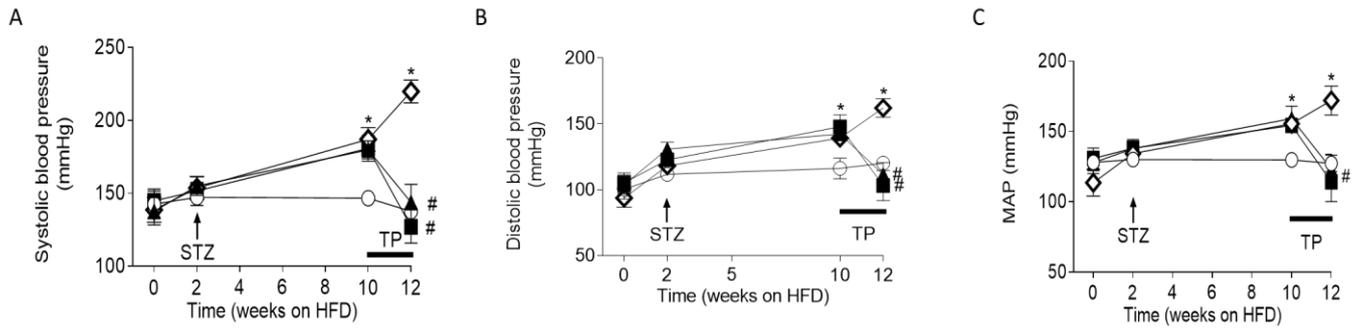


Fig. 4. **Non-invasive pressure.** (A) Systolic blood pressure, (B) Distolic blood pressure and (C) Mean arterial pressure (MAP). Datas represent the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ rats per group). * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic; # $P < 0.05$ vs. DM2 + Vehicle. Analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

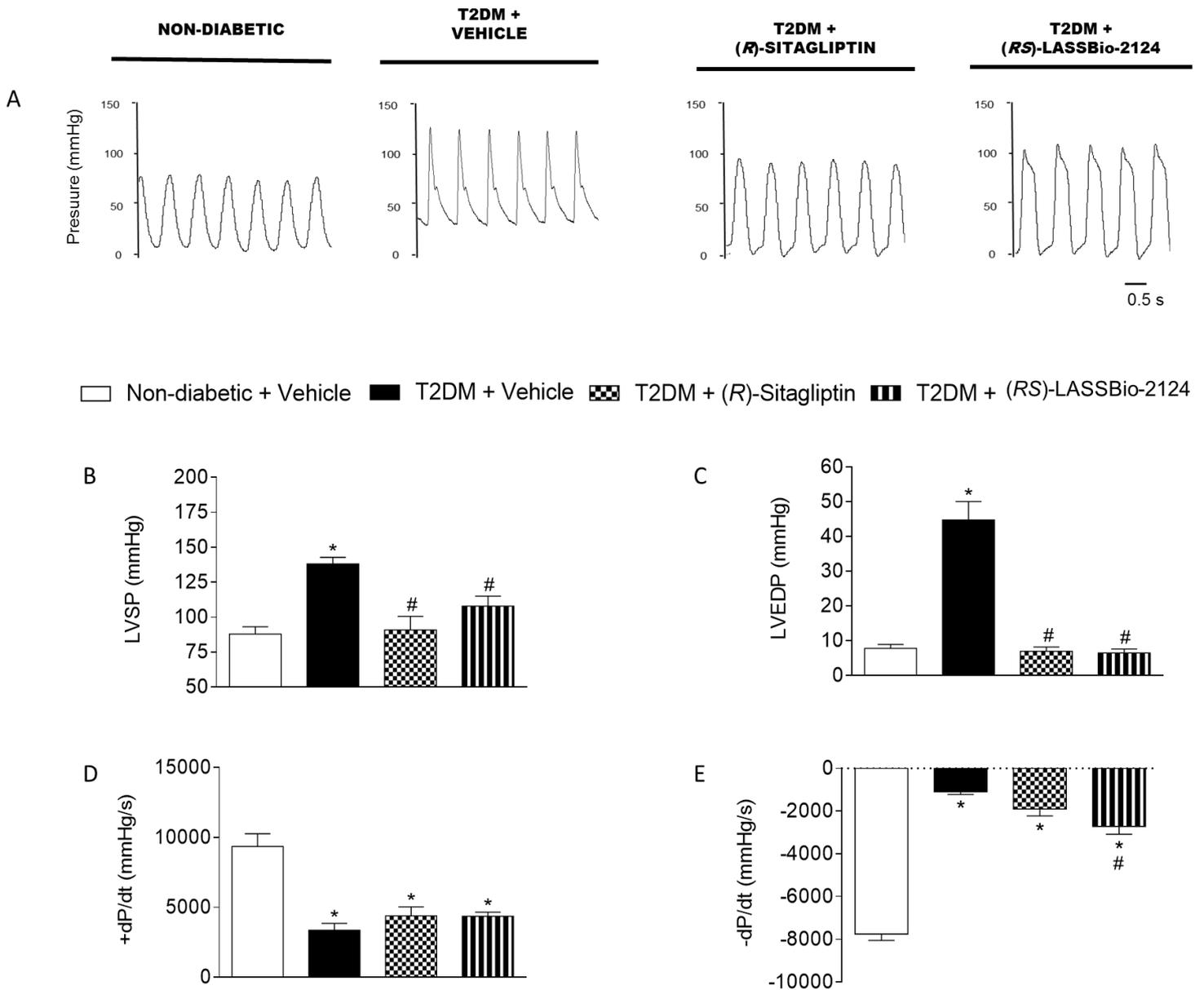


Fig. 5. Cardiac function measured by invasive measurements of the heart rate. (A) Left Intracavitary Hemodynamics. Representative (B) LVSP, (C) +dP/dt, (D) LVEDP e (E) -dP/dt. Datas represent the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ per group). * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic + Vehicle; # $P < 0.05$ vs. T2DM + Vehicle. LVSP, Left Ventricular Systolic Pressure and LVEDP, Left Ventricular End Dyastolic Pressure. Analyze by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

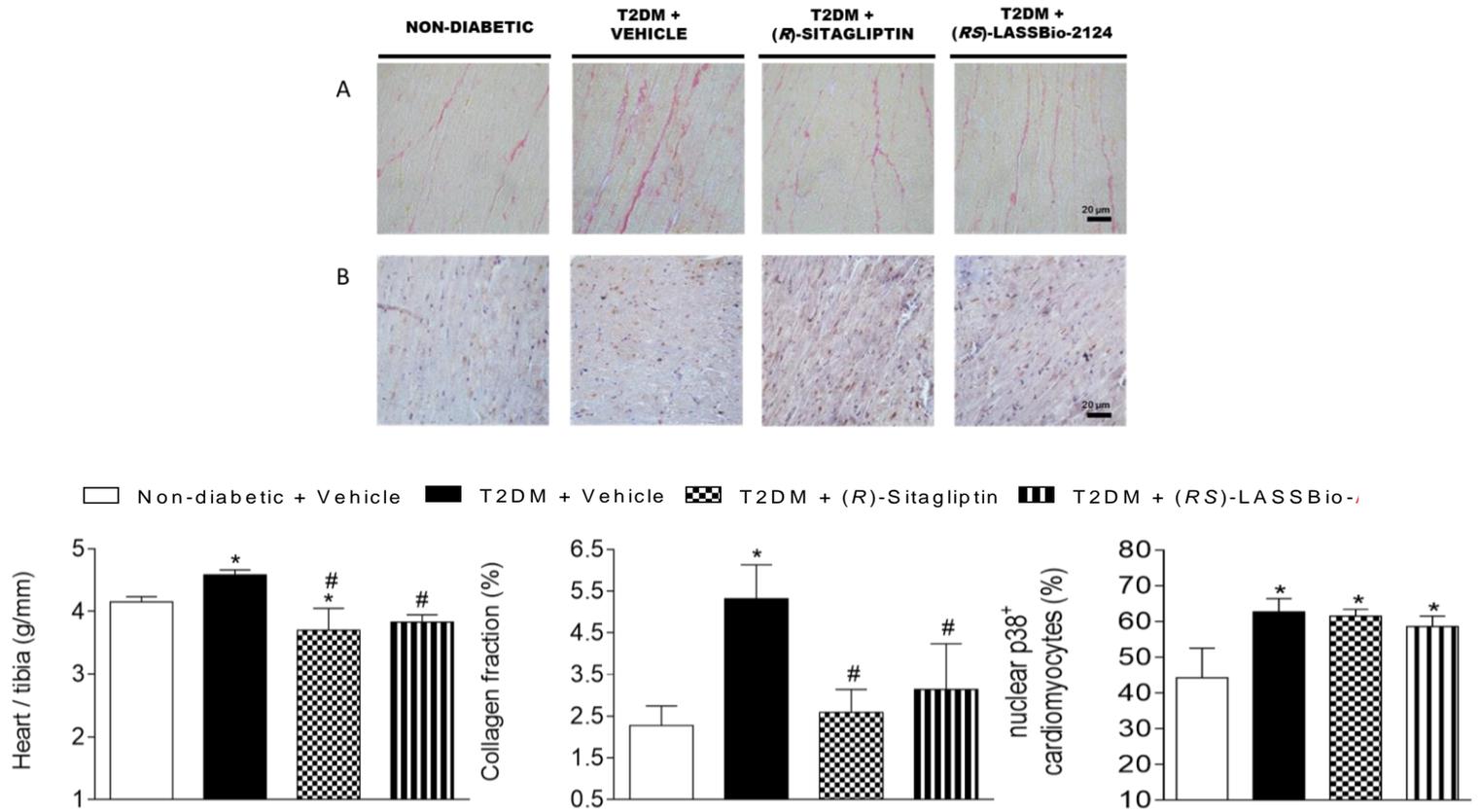


Fig. 6. **Heart weight, microscope and immunohistochemistry of the heart tissues.** (A) Images with picrosirius red staining and immunohistochemistry of the (B) P38 α MAPK. (C) heart weight was normalized by the length of the tibia, (D) collagen fraction, (E) P38 α MAPK. Datas represent the mean \pm S.E.M. (n = 6 rats per group). * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic + Vehicle; # $P < 0.05$ vs. T2DM + Vehicle. Analyze by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

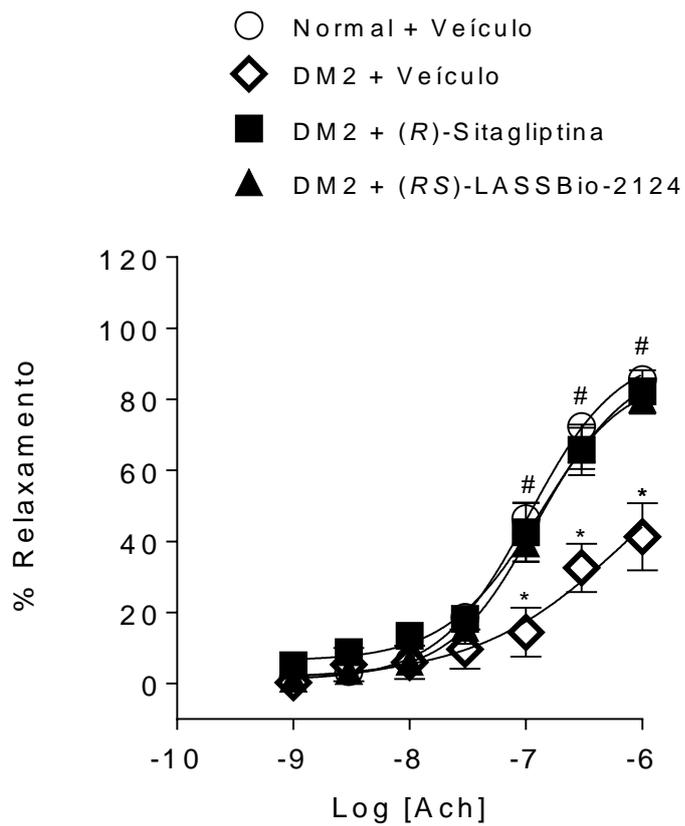


Fig. 7. **Vascular reactivity of the aorta.** Data represent the mean \pm S.E.M. (n = 6 rats per group). * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic + Vehicle; # $P < 0.05$ vs. T2DM + Vehicle. Analyze by two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

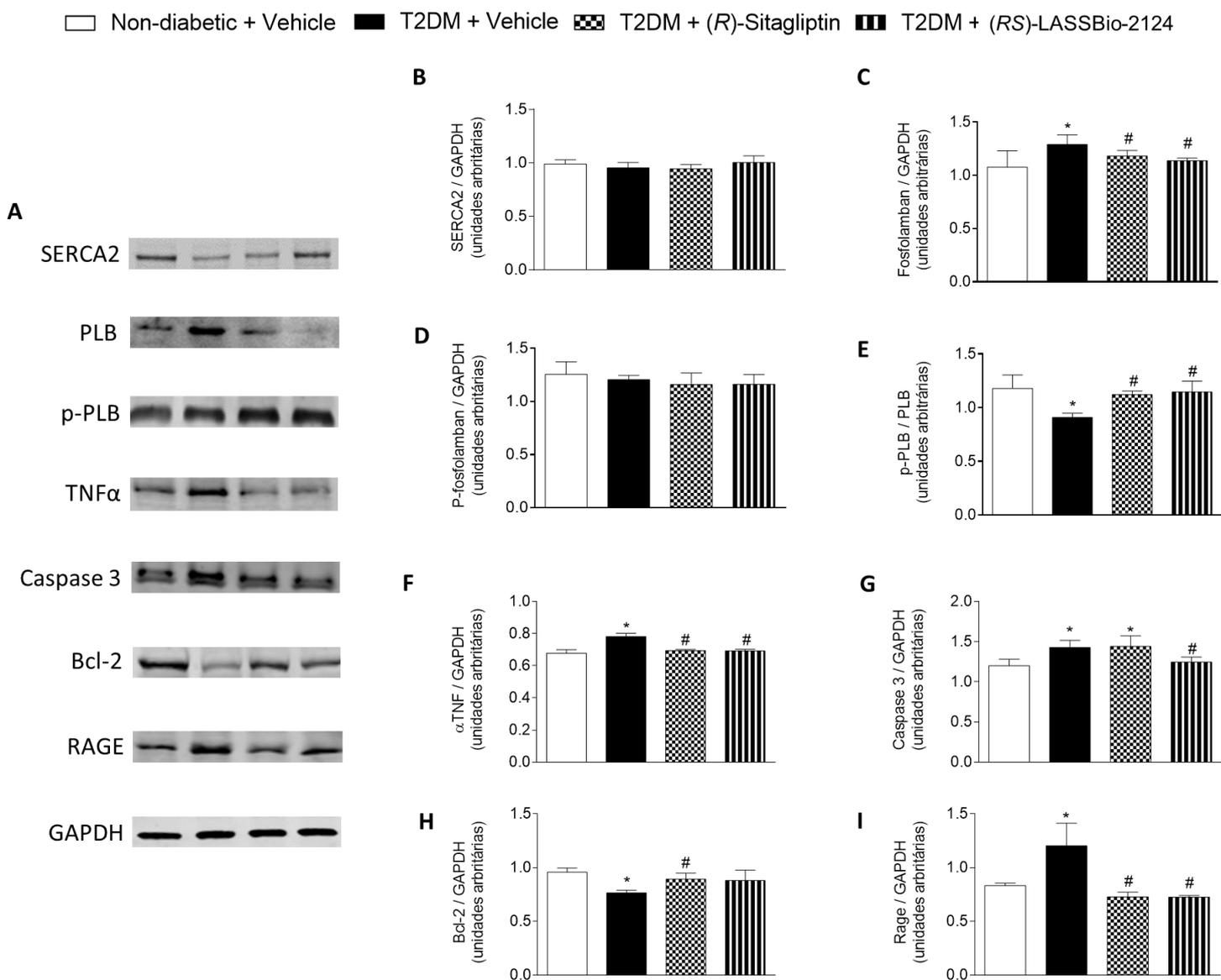


Fig. 8. Expression of cardiac protein. (A) Representative western blot of SERCA, Phospholamban, P- phospholamban, TNF α , Caspase 3, Bcl-2 and RAGE. Expression Quantification of (B) SERCA (n=4), (C) Phospholamban (n=5), (D) p- phospholamban (n=5), (E) p-PLB/PLB (n=5), (F) TNF α (n=4), (G) Caspase (n=4), (H) Bcl-2 (n=4) and (I) RAGE (n=5) expression and GAPDH typical expression from no-diabetic, Vehicle, Rats treated with sitagliptin and LASSBio. GAPDH was used for normalization. Datas represent the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic + Vehicle; # $P < 0.05$ vs. T2DM + Vehicle.

Table 1. Effects of treatments in the vascular reactivity of the aorta.

Groups	Ach-induced Relaxation	EC₅₀ (μM)
Non-diabetic	95,0 ± 1,9	0,10 ± 0,02
T2DM + Vehicle	68,0 ± 4,0*	1,5 ± 0,9
T2DM + (R)-Sitagliptin	91,5 ± 3,6#	0,2 ± 0,06
T2DM + (RS)-LASSBio-2124	87,1 ± 3,6#	0,1 ± 0,02

Each value represents the mean ± S.E.M (n = 6 rats per group). * $P < 0.05$ vs. Non-diabetic + Vehicle; # $P < 0.05$ vs. T2DM + Vehicle; & $P < 0.05$ vs. T2DM + (R)-Sitagliptin.