



**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 qualificação de doutorado

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lídia Moreira Silva

Rio de Janeiro, RJ

Mai de 2018

Bryelle Eccard de Oliveira Alves

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

Dissertação 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zapata-Sudo

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lídia Moreira Silva

Rio de Janeiro, RJ

Maio de 2018

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	4
LISTA DE TABELAS .....	6
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	7
1 INTRODUÇÃO .....	8
2 OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
3 METODOLOGIA.....	24
3.1 Local de pesquisa .....	24
3.2 Comitê de ética .....	24
3.3 Animais e desenho experimental .....	24
3.4 Análise de sangue e peso corporal .....	25
3.5 Parâmetros renais .....	26
3.6 Função cardiovascular .....	26
3.7 Reatividade vascular da aorta .....	28
3.8 Estudos histológicos e peso do coração e rins.....	28
3.9 Imunohistoquímica .....	29
3.10 Expressão de proteínas cardíacas .....	29
3.11 Análise estatística .....	30
4 RESULTADOS .....	301
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
6 CONCLUSÕES .....	56
7 REFERÊNCIAS.....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ações da insulina nas principais tecidos sensíveis à insulina .....	10
Figura 2. Sinalização da insulina na homeostase .....	11
Figura 3. Sinalização da insulina no diabetes .....	13
Figura 4. Efeitos vasculares da insulina em condições caracterizadas por aumento do estresse oxidativo e resistência à insulina .....	14
Figura 5. Planejamento estrutural dos novos protótipos LASSBio e série congênere .....	20
Figura 6. DPP (IV) Inibitor Screening Assay kit e curva resposta do padrão Sitagliptina.....	21
Figura 7. Curva resposta dos compostos DiF, DiCl e DiMeO.....	22
Figura 8. Delineamento experimental dos protocolos I e II .....	25
Figura 9 (Protocolo I). Análise de sangue demonstrando distúrbio metabólico e peso corporal.....	32
Figura 10 (Protocolo II). Análise de sangue demonstrando distúrbio metabólico e peso corporal.....	33
Figura 11 (Protocolo I). Análise funcional e histológica renal.....	34
Figura 12 (Protocolo II). Análise funcional e histológica renal.....	35
Figura 13 (Protocolo I). Pressão não invasiva.....	36
Figura 14 (Protocolo II). Pressão não invasiva.....	36
Figura 15 (Protocolo I). Morfologia do coração medida pela ecocardiografia .....	37
Figura 16 (Protocolo II). Morfologia do coração medida pela ecocardiografia .....	38
Figura 17 (Protocolo I). Função cardíaca medida pela ecocardiografia .....	39
Figura 18 (Protocolo II). Função cardíaca medida pela ecocardiografia .....	40
Figura 19 (Protocolo I). Função cardíaca medida por medidas invasivas da frequência cardíaca.....	41

Figura 20 (Protocolo II). Função cardíaca medida por medidas invasivas da frequência cardíaca.....	42
Figura 21 (Protocolo I). Reatividade vascular da aorta .....	43
Figura 22 (Protocolo II). Reatividade vascular da aorta .....	43
Figura 23 (Protocolo I). Fração de colágeno e peso do coração.....	44
Figura 24 (Protocolo II). Fração de colágeno, imunohistoquímica e peso do coração .....	45
Figura 25 (Protocolo I). Expressão de proteínas cardíacas .....	46
Figura 26 (Protocolo II). Expressão de proteínas cardíacas .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos dos tratamentos na reatividade vascular da aorta.....	44
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IRS	SUBSTRATOS DO RECEPTOR DA INSULINA
MAPK	<i>MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE</i>
ERK	<i>EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE</i>
PI3K	<i>PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE</i>
Akt	PROTEÍNA QUINASE B
PKC $\alpha$ /I	PROTEÍNA QUINASE C $\alpha$ /I
TNF- $\alpha$	FATORES DE NECROSE TUMORAL ALFA
ERK	<i>EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES</i>
IKK	<i>I KAPPA B KINASE</i>
NF- $\kappa$ B	FATOR NUCLEAR KAPPA B
AGE	PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA
RAGE	RECEPTORES DOS PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA
ROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
IDF	<i>INTERNATIONAL DIABETES FOUNDATION</i>
ADA	<i>AMERICAN DIABETES ASSOCIATION</i>
SRAA	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSIANA-ALDESTORANA

# 1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 422 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por diabetes e uma perspectiva para 2040 de aproximadamente 600 milhões (World Health Organization - *Campaigns World Health Day* 2016), no Brasil este número chega a 12 milhões (DataSUS, 2012). O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentismo na população a nível mundial <sup>1</sup>. Quantificar o predomínio atual de DM (*Diabetes mellitus*) e estimar o número de pessoas com diabetes no futuro é importante pois possibilita planejar e alocar recursos de maneira racional.

O ônus com diabetes 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*). E 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 com diabetes (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 reduzida de insulina <sup>2</sup>, esta corresponde por cerca de 90% dos casos de diabetes em todo o mundo (WHO) e qual será o foco do presente trabalho.

A história natural do diabetes tipo 2 começa com a resistência à insulina <sup>3</sup>. Antes do estabelecimento da doença, surge uma série de características físicas e metabólicas (por vezes acompanhada de hipertensão, hiperuricemia e anormalidades nos fatores hemostáticos) chamado de síndrome metabólica, embora estas características persistam após o diagnóstico <sup>3</sup>. Acúmulo de lipídios, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias causam ativação de quinases sensíveis ao estresse com consequente inibição da sinalização da insulina <sup>4</sup>. Alterações na concentração e funcionalidade da insulina promovem anormalidades no metabolismo lipídico favorecendo as complicações microvasculares e macrovasculares no diabetes <sup>5</sup>.

Dentre as principais comorbidades relacionados a progressão da DM2 esta a nefropatia diabética que responde por aproximadamente 40% dos novos casos de doença renal terminal a cada ano <sup>6</sup>. A detecção precoce de DM e nefropatia é crucial para reduzir as complicações, a morbidade e a mortalidade, bem como o impacto social e econômico que traz junto a si a doença DM nessa população.

Os riscos cardiovasculares associados com a síndrome metabólica têm sido relatados <sup>2,3</sup>, bem como a associação da diabetes tipo 2 no desenvolvimento de doenças cardiovasculares <sup>3,7,8</sup>. 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 pessoas com diabetes <sup>9</sup>.

E é bem conhecido que pacientes com DM2 com comprometimento renal têm um risco aumentado de mortalidade, especialmente um risco maior de morte cardiovascular (CV), quando comparado a outros pacientes diabéticos sem insuficiência renal <sup>6,10,11</sup>.

### **1.1 Cascata de sinalização da insulina**

A insulina, um hormônio anabólico, está envolvida numa série de processos celulares, ela também estimula o crescimento e diferenciação celular, e promove o armazenamento de substratos em tecido adiposo, fígado e músculo, estimulando a lipogênese, glicogênio e síntese de proteínas, e inibição de lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas (Figura 1) <sup>4</sup>.

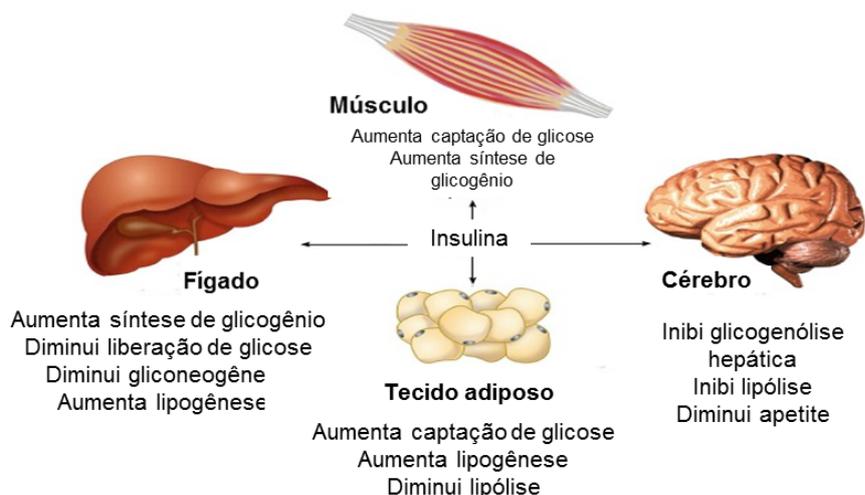
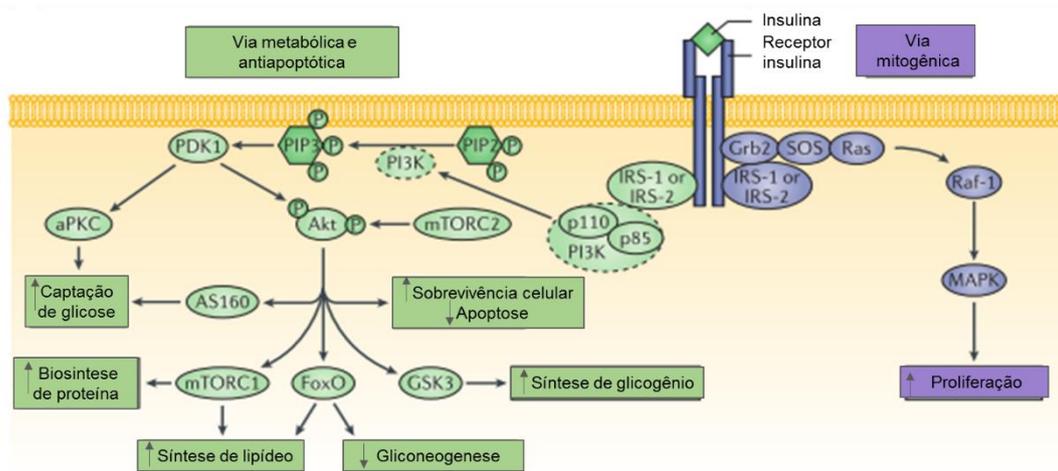


Figura 1. Ações da insulina nos principais tecidos sensíveis à insulina. Adaptado de 4.

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 é governado pelo equilíbrio entre a absorção de glicose a partir do intestino, a produção pelo fígado e absorção e metabolismo pelos tecidos periféricos. A insulina aumenta a captação de glicose, servindo assim como a principal reguladora da concentração de glicose no sangue. Quando ocorre o aumento da glicose, a insulina é sintetizada e secretada pelas células  $\beta$ -pancreáticas na corrente sanguínea <sup>12</sup>.

Sob condições fisiológicas, como mostra a Figura 2, a ligação da insulina ao seu receptor desencadeia a fosforilação de substratos intracelulares incluindo a família dos substratos do receptor da insulina (IRS) que por sua vez são capazes de ativar diferentes vias de sinalização. Duas principais vias são ativadas. A via da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) / *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), que regula a expressão gênica e o crescimento celular, e a via da *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) / Akt, que está preferencialmente envolvida na maioria das ações metabólicas da insulina <sup>4,12</sup>.



**Figura 2. Sinalização da insulina na homeostase.** Em condições normais após ingestão de alimentos, células beta pancreáticas secretam insulina que se ligam a seus receptores no dímero extracelular alfa de membrana do tipo tirosina cinase em tecidos sensíveis a insulina, ativando-o na unidade alfa (extracelular), promovendo autofosforilação de resíduo de tirosina, subunidade do dímero beta (intracelular) que serve como ancoramento para proteínas alvo como isoformas do IRS e consequente ativação do (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 das MAPKs aumentando a proliferação celular. Adaptado Artunc F. *et al.* 2016 <sup>14</sup>.

A PI3K, estimulada pela insulina, produz um metabólito que ativa a proteína quinase B (Akt) e proteína quinase C  $\lambda/1$  (PKC $\lambda/1$ ), o que leva a síntese de proteína, glicogênio e inibe a lipólise. PKC $\lambda/1$ , que também depende de lipídios para a ativação, pode inibir a sinalização de insulina por um mecanismo de feedback<sup>4</sup>. Akt ativada é essencial para a translocação da GLUT4 (transportador de glicose), fazendo com que esta se funda a membrana e ocorra a passagem da glicose do meio extra para o intracelular <sup>4,13</sup>.

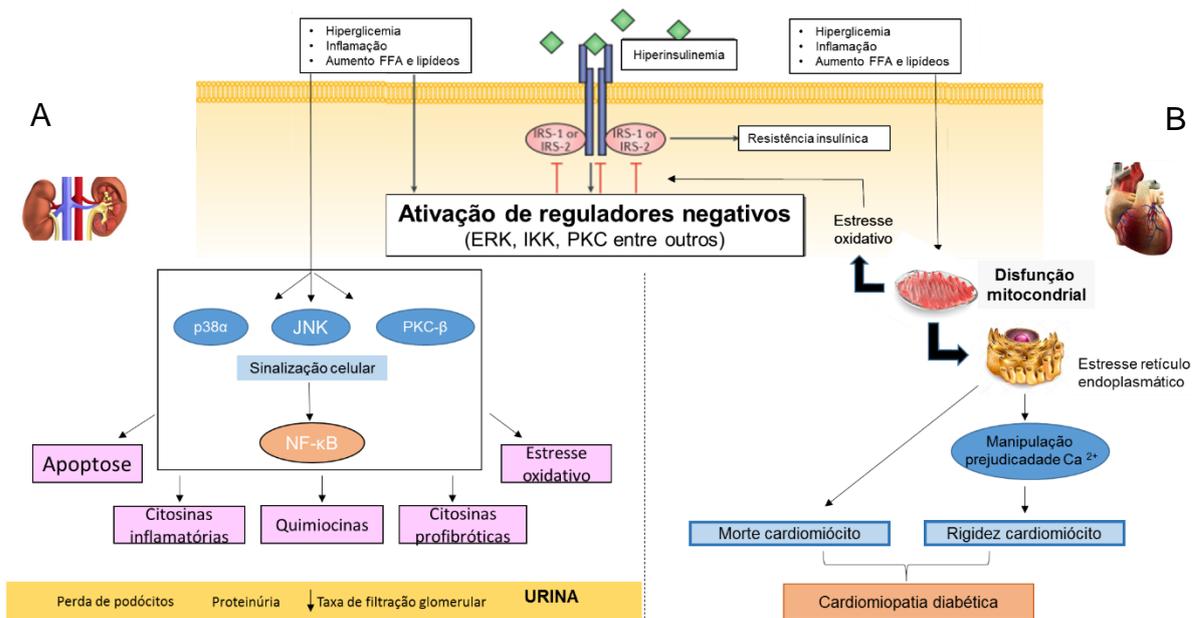
## 1.2 Fisiopatologia do Diabetes tipo 2 e acometimento nos rins e coração

A história natural do diabetes tipo 2, como citado, começa com a resistência à insulina, e este estado pode preceder a um diagnóstico por vários anos <sup>3</sup>. O acúmulo de lipídios, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias causam ativação de quinases sensíveis ao estresse com consequente inibição da sinalização da insulina <sup>4</sup>. Alterações na concentração e na funcionalidade da insulina promovem anormalidades no metabolismo lipídico favorecendo as complicações cardiovasculares no diabetes <sup>5</sup>.

Num quadro de síndrome metabólica leva ao desenvolvimento da resistência insulínica que caracteriza-se por falhas das células-alvo em responder aos níveis normais de insulina circulantes, resultando hiperinsulinemia inicial compensatória na tentativa de se obter uma resposta fisiológica adequada <sup>12,15</sup>. Como podemos observar na Figura 3, hiperglicemia, inflamação (liberação de interleucinas e TNF- $\alpha$ ) e aumento de ácidos graxos livres atuando diretamente em diferentes sítios e ocasiona um aumento da fosforilação das serinas e diminuição da fosforilação das tirosinas dos IRS-1, fosforilação anormal dos receptores de insulina. Ou de maneira indireta estes fatores levam a uma disfunção mitocondrial ou uma indução do estresse do retículo endoplasmático resultando na ativação de reguladores negativos (ERK, IKK, PKC entre outros) que cronicamente reduz a resposta celular a insulina <sup>14</sup>. Essas alterações em órgãos sensíveis a ação da insulina como rins e coração desenvolvem comorbidades consequentes do diabetes.

Nos rins, distúrbios metabólicos e alteração hemodinâmica ativam o sistema renina-angiotensina desencadeia sinalização nas células renais, a exemplo células mesangiais, que medeiam uma resposta celular através da ativação de fatores-chave de transcrição, como NF- $\kappa$ B. As células renais podem produzir quimiocinas e citosinas pro-fibróticas. Quimiocinas promovem o recrutamento de monócitos a partir da circulação, já macrófagos ativados podem produzir citocinas pro-inflamatórias e pro-fibróticas, estresse oxidativo que contribuem para o ciclo de injúria celular e então perda de podócitos, diminuição da taxa de filtração glomerular que contribuem para aumentar a proteinúria durante o desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética <sup>16</sup> (Figura 3 A).

Já nos cardiomiócitos a ativação pelos distúrbios metabólicos ocasionam disfunção mitocondrial, o que leva: 1 ao estresse oxidativo resultando em comprometimento da sinalização de insulina e 2 estresse retículo endoplasmático o que acarreta manipulação anormal de Ca <sup>2+</sup> ao que leva a morte e rigidez dos cardiomiócitos culminando em cardiomiopatia diabética <sup>17</sup> (Figura 3 B).



**Figura 3. Sinalização da insulina no diabetes.** Hiperglicemia, inflamação (liberação de interleucinas e TNF-alfa) e aumento de ácidos graxos livres atuando aumento da fosforilação das serinas, fosforilação anormal dos receptores de insulina. Ou de maneira indireta estes fatores levam a uma disfunção mitocondrial ou uma indução do estresse do retículo endoplasmático resultando na ativação de reguladores negativos que reduz a resposta celular a insulina. (A) Alterações nas células renais e (B) nos cardiomiócitos.

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

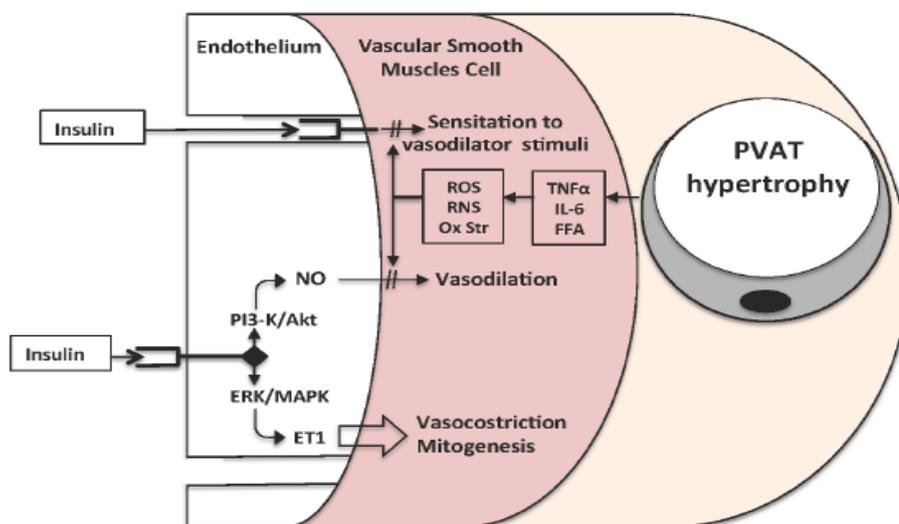
Inúmeros marcadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), proteína cinase c Jun NH2 terminal (JNK), NF $\kappa$ B, MAPK, IKK, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), PI3K, receptores tipo *Toll* (TLR), auto anticorpos, caspases e inflamassomas tem sido evidenciados durante a instalação e evolução do DM. A inflamação tem sido associada tanto na diminuição da síntese e liberação de insulina pelas células  $\beta$  como pelo aumento da resistência à insulina (ou diminuição da sensibilidade) causando injúria e disfunção nos mais diferentes tecidos <sup>18-20</sup>.

Altos níveis de glicose no sangue são capazes de induzir danos vasculares e neurais, mediante uma série complexa de interações que incluem as vias do polioli (aldose redutase), hexosamina, PKC (*Protein kinase C*), PARP (*Poly (ADP-ribose) polymerase*), AGE/RAGE, ROS (*Reactive oxygen species*);

assim como diferentes vias de sinalização (RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR e JNK/STAT), fatores de transcrição e citosinas pro-inflamatórias <sup>20,21</sup>.

A insulina, em concentrações fisiológicas, atua como um vasodilatador e estimula a produção endotelial de NO. No endotélio, a ativação da via PI3K é capaz de regular a produção do NO insulino-dependente. A presença de resistência à insulina, determina um defeito combinado no transporte de glicose e na vasodilatação endotélio-dependente <sup>22</sup>.

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 <sup>23</sup>. O MAPK atua como fator estimulador do crescimento celular. Na vasculatura, medeia a habilidade das células endoteliais, das células musculares lisas e monócitos em migrarem. Além disso, parece mediar a expressão de fatores pró-trombóticos e pró-fibróticos. Consequentemente, os efeitos resultantes dessa ativação são pró-aterogênicos <sup>5,22</sup>.



**Figura 4.** Efeitos vasculares da insulina em condições caracterizadas por aumento do estresse oxidativo e resistência à insulina. TAP = Tecido Adiposo Perivascular. Adaptado de <sup>5</sup>.

Sob condição de hiperglicêmica, a glicose no citosol é desviada para a via do polioliol, em que a enzima Aldose Redutase reduz a glicose em sorbitol, utilizando como cofactor a NADPH a partir da via das pentoses fosfato e este consumo excessivo culmina na depleção do NADPH e resulta na geração de ROS (*Reactive Oxygen Species*). Estes ROS estimula a oxidação da

lipoproteína de baixa densidade (LDL), e ox-LDL, que não são reconhecidas pelo receptor de LDL e são captados por macrófagos que conduzem à formação de células espumosas e placas ateroscleróticas, o que leva a distúrbios vasculares associado ao diabetes <sup>24,25</sup>.

Produção excessiva de ROS causam danos induzidos pela hiperglicemia através da ativação de vários mecanismos <sup>5</sup>, como por exemplo:

1. Aumento de AGEs (*Advanced Glycation End products*) formação, decorrente da glicação não-enzimática de proteínas plasmáticas e o que leva ao seu depósito na camada sub-endotelial e induz disfunção endotelial. Com efeito, AGEs podem diretamente inativar o eNO que determinar o impedimento da vasodilatação endotélio-dependente <sup>26</sup>. Por sua vez, o receptor para a ligação de AGE (RAGE) induz a produção de ROS, que ativa o NF-κB, causando múltiplas alterações patológicas na expressão do gene <sup>27</sup>.

2. PKC, proteína quinase C, uma família de enzima composta por aproximadamente 15 isoformas <sup>24</sup>. Ativação persistente de várias isoformas de PKC implica na diminuição da produção de NO (redução da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células de músculo liso e aumento do VEGF, o que aumenta permeabilidade vascular <sup>5</sup>.

3. Via de formação de poliois. A via dos poliois é baseada numa família de enzimas caracterizadas como aldose redutase (AKR, *aldo-keto reductase*) que podem utilizar como substrato uma grande variedade de compostos carbonilados e pela ação do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH, *nitric acid adenine dinucleotide phosphate*) que os reduzem em seus respectivos açúcares alcoólicos (poliois). Estas enzimas são onipresentes com maior densidade em tecidos excitáveis como células endoteliais, músculos em geral, glomérulo, neurônios e retina. O consumo do NADPH pela via dos poliois irá diminuir a sua biodisponibilidade, que por sua vez é o cofator essencial para a regeneração da glutathione reduzida (GSH, *reduced glutathione*), um potente sequestrador de ROS (antioxidante), resultando em aumento do estresse oxidativo e suas consequências <sup>28</sup>.

4. Via do fluxo das hexosaminas. A inibição de GAPDH aumenta as concentrações de F-6-P dentro da célula e sofre ação da enzima frutose-6-fosfato-amido-transferase (GFAT, *Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase*) convertendo-se em glicosamina-6-P, em seguida em UDP-N-GlcNAc por orto-glico-n-acilação em resíduos de serina e treonina de proteínas citoplasmáticas e nucleares alterando suas respectivas funções causando injúria tecidual <sup>28</sup>.

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, poliol, PKC, PARP e AGE <sup>29</sup>. Isto ocasiona glucotoxicidade e acumulação de AGE nas células, que como resposta, incrementam a produção de ROS, citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e fatores de crescimento (VEGF, IGF-1), os quais uma vez liberados na retina são capazes de regular a apoptoses das células endoteliais e pericitos, além de estimular leucostasis via inflamação e de ocasionar vazamento e crescimento anormal dos vasos sanguíneos da retina (no estado inicial da patologia) <sup>29,30</sup>.

Estas alterações vasculares na retina levam a uma degradação da barreira hemato-retiniana, edema macular, hipoxia (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 <sup>31</sup>.

Na nefropatia diabética, caracterizada pelo espessamento da membrana basal glomerular, hipertrofia glomerular e aumento da matriz mesangial, os desordens metabólicos e hemodinâmicos (sistema renina-angiotensina) geram estresse oxidativo, inflamação e fibroses, os quais são os principais fatores que contribuem na progressão da doença <sup>16</sup>.

Hiperglicemia e/ou pressão alta geram uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ROS, o que altera o balanço oxidação/redução iniciando um estado de estresse oxidativo, o que por sua vez promove a ativação de NADPH-oxidase (NOX) e PKC, incrementando a formação de AGE e da via poliol, 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- $\kappa$  $\beta$  e AP-1, que por sua vez incrementam a expressão de

quemoquinas proinflamatórias como CCL2, que estimula a infiltração de um maior número de macrófagos e monócitos capazes de produzir citosinas profibróticas (TGF- $\beta$ ), fatores de crescimento de tecido conectivo (CTGF) e fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) <sup>32</sup>.

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 sistema renina-angiotensina-aldosterona, inflamação, estresse oxidativo e resposta imune mal-adaptativa <sup>17</sup>. A resposta inflamatória envolve uma complexa cascata de eventos envolvendo muitos tipos de células que possuem funções inter-relacionadas. A interleucina 6 (IL-6) regula a expressão da proteína C-reativa (PCR). O tecido adiposo está associado ao aumento da produção de IL-6 e PCR, esses marcadores inflamatórios estão relacionados à resistência à insulina <sup>3</sup>. A sinalização inflamatória nos cardiomiócitos geralmente ocorre precocemente a resposta à lesão miocárdica e implica superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais <sup>33</sup>. A ativação de várias vias de sinalização, como NF- $\kappa$ B, c-jun NH2-terminal quinase ou p38-MAPK, pode mediar um estado de inflamação, que está ligado a resistência à insulina, desempenhando um papel importante nas complicações diabéticas. De fato, o NF- $\kappa$ B representa um dos mais importantes mediadores do processo inflamatório. A ativação do NF- $\kappa$ B está associada a liberação aumentada de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que está frequentemente envolvido em danos cardíacos e leva à ativação do NF- $\kappa$ B, contribuindo para a intensificação de efeitos adversos no coração diabético <sup>34</sup>. Além disso, a superexpressão cardíaca do TNF- $\alpha$  tem sido associada à hipertrofia e fibrose cardíaca, bem como à disfunção do VE <sup>35</sup>.

## **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  $\alpha$ -glicosidase (acarbose) (RANG *et al.*, 2007).

As biguanidas, representadas principalmente pela metformina, geralmente é o fármaco de primeira escolha <sup>36,37</sup> por apresentar uma modesta perda de peso <sup>37</sup>. 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 <sup>36</sup>. Seu principal mecanismo de ação é inibir a abertura dos canais  $K_{ATP}$  resultando na despolarização das células  $\beta$ , subsequente aumento no influxo de cálcio intracelular e, portanto, a promoção da liberação de insulina <sup>38</sup>. Nos EUA, esses medicamentos possuem tarja preta, uma preocupação da FDA por eles poderem aumentar o risco cardiovascular <sup>39</sup>.

As tiazolidinadionas se ligam os receptores intracelulares PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) que regulam a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico, responsáveis pela captação de glicose mediada por insulina no tecidos periféricos e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (o que contribui para o efeito indesejável de ganho de peso) (RANG *et al.*, 2007). Há relatos também de alta hepatotoxicidade e efeito negativo na função cardíaca por causar retenção hídrica <sup>38</sup>.

Acarbose e drogas afins são eficazes por via oral e devem ser tomadas em conjunto com as refeições <sup>38</sup>. Estes medicamentos não interferem na secreção de insulina, retarda a absorção de carboidratos, reduzindo o aumento pós-prandial da glicemia. Causa flatulência e diarreia (RANG *et al.*, 2007).

Neste contexto, os inibidores da DDP4 e os incretinomiméticos (agonistas de GLP-1) estão no foco como uma nova classe de agentes anti-diabéticos, pois demonstram uma baixa incidência de hipoglicemia e não provocaram o ganho de peso <sup>40</sup>, efeitos secundários apresentados pelos anti-

diabéticos clássicos, como a insulina e tiazolidinodiona <sup>41</sup>. Além de apresentarem redução em eventos cardiovasculares <sup>42</sup>.

#### 1.4.2 Inibidores da DPP4

As incretinas são hormônios peptídicos secretados a partir do intestino. As principais são GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) e o GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), responsáveis por aumentar a liberação de insulina a partir de células- $\beta$  pancreáticas de modo dependente da glicose e estão associados com a biossíntese de insulina, a proliferação de células- $\beta$  pancreáticas, e a inibição da ingestão de alimentos <sup>43</sup>. Em pacientes com DM2, ou indivíduos com intolerância à glicose (pré-diabetes), esta resposta é defeituosa, resultando em concentrações circulantes reduzidas de GLP-1 pós-prandial, o qual contribui para uma resposta secretora de insulina atenuada durante as refeições <sup>40</sup>.

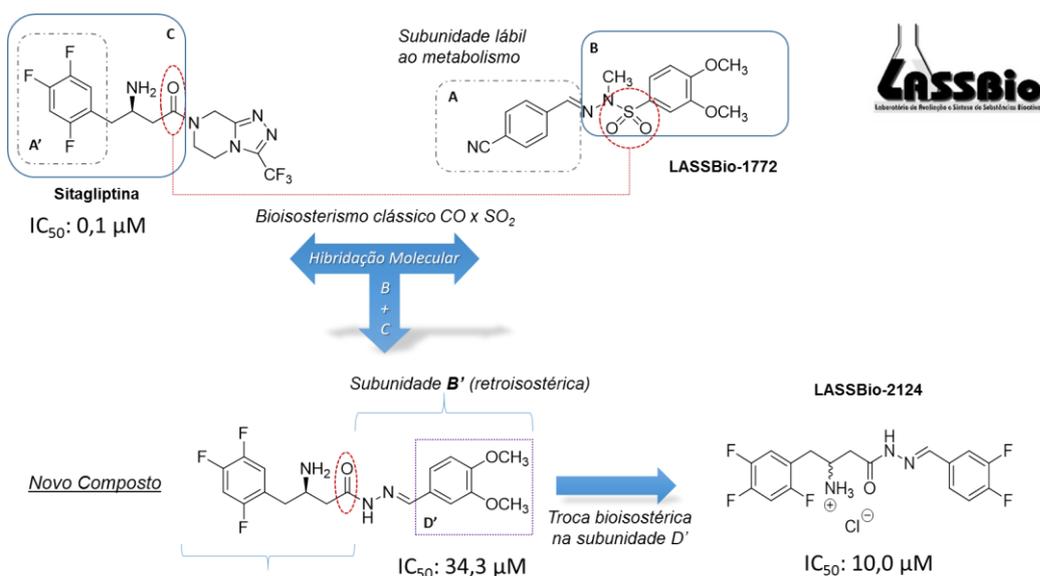
Porém a meia vida dessas incretinas são curtas, pois imediatamente são degradadas pela DPP4 (*Dipeptidyl peptidases 4*) <sup>41</sup>. A DPP4 é uma glicoproteína transmembranar expressa na superfície de vários tipos de células (pâncreas exócrino, rins, tracto gastrointestinal, trato biliar, timo, nódulos linfáticos, útero, placenta, próstata, supra-renal, glândulas sudoríparas, glândulas salivares e glândulas mamarias) e está solubilizado em fluídos corporais (plasma e no fluido cerebrospinal). Possui atividade serino protease cujos alvos são substratos péptidos N-terminais contendo prolina ou alanina, que incluem factores de crescimento, quimiocinas, neuropéptidos, além das incretinas GLP-1 e GIP <sup>41,44</sup>.

Atualmente, muitos estudos, tanto em humanos como em modelos animais estabeleceram inibição DPP4, seguido pela elevação do GLP-1, como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de diabetes <sup>40,41,45-47</sup>. Bem como uma ação protetora destes novos fármacos em relação ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares <sup>42,48</sup>, não apenas em pacientes com diabetes <sup>44</sup>.

### 1.5 Planejamento e síntese de novos inibidores da DPP4

A etapa de planejamento prevê obter compostos híbridos entre o protótipo LASSBio-1772, os quais tem apresentado atividade anti-inflamatória, embora seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado. Segundo citado por Costa 2013<sup>49</sup> em sua tese de mestrado, o LASSBio-1772 apresentou in vitro uma atividade moduladora de TNF- $\alpha$  por diminuir sua concentração em cultura de célula de macrófagos peritoniais de camundongo. E a sitagliptina, fármaco inibidor da enzima dipeptil peptidase 4 (DDP4-i).

A modificação do protótipo LASSBio-1772 implica a aplicação da 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 5). Cabe mencionar neste ponto que na subunidade B do novo protótipo, o grupo sulfonilhidrazona será substituído por um grupo acil hidrazona, isto aproveitando o bioisosterismo clássico entre o grupo sulfona e carbonila. Além disso se planeja realizar a construção de uma série congênere trocando a subunidade D pelos anéis apresentados no quadro vermelho, isto com o objetivo de explorar diferentes tipos de interações (eletrostáticas, hidrofóbicas, ligação de hidrogênio, etc.) que melhorem o perfil de reconhecimento molecular do novo protótipo com a enzima alvo.



**Figura 5.** Planejamento estrutural dos novos protótipos LASSBio e série congênere. Barreiro E. & Fraga C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3Ed. Porto Alegre-RS 2015, 347.

### 1.5.1 Escolha do novo composto utilizado

Para escolha dos protótipos sintetizados que iria ser utilizado no presente estudo, foi realizado um ensaio de *screening* (Cayman chemical) para detetminação da inibição da DPP-4, onde a própria sitagliptina foi utilizada como padrão de inibição. O ensaio consiste 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 6). Ao adicionar os protótipos, foi observada a inibição da reação pela diminuição da fluorescência (Figura 7). Foram 3 protótipos inicialmente testados: DiFlúor, Dicloro e Dimetoxi e os seus respectivos sais. O acréscimo dos sais foram utilizados apenas para melhorar perfil farmacocinético dos protótipos.

O composto que apresentou melhor resposta, ou seja, resposta mais próxima a da Sitagliptina foi o composto DiF, e a molécula utilizada para tratamento no presente estudo foi a DiF-HCl, que após registro na biblioteca de moléculas do LASSBio, passou a ser denominada LASSBio-2124.

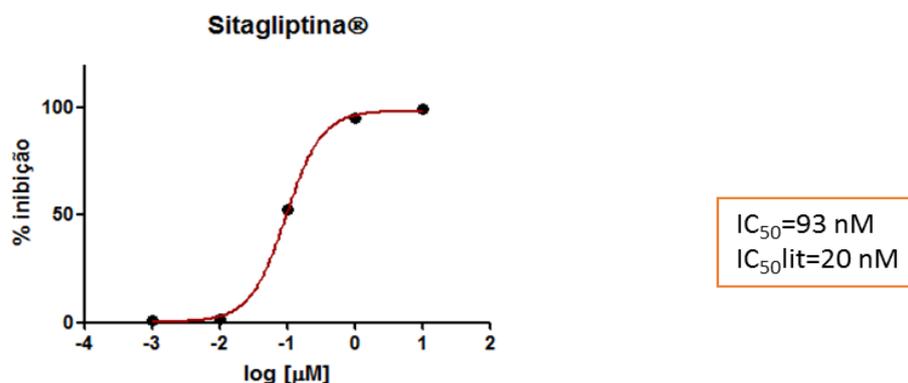
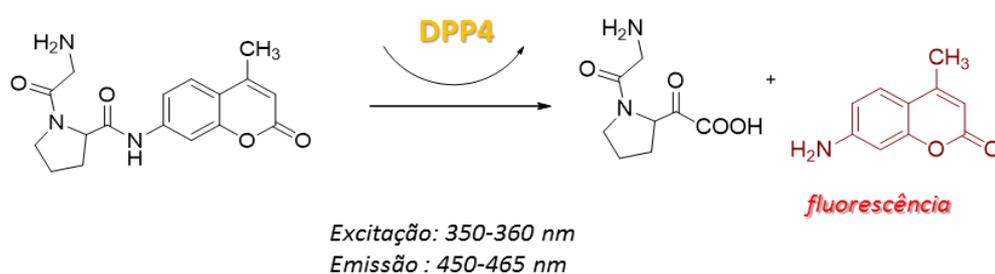
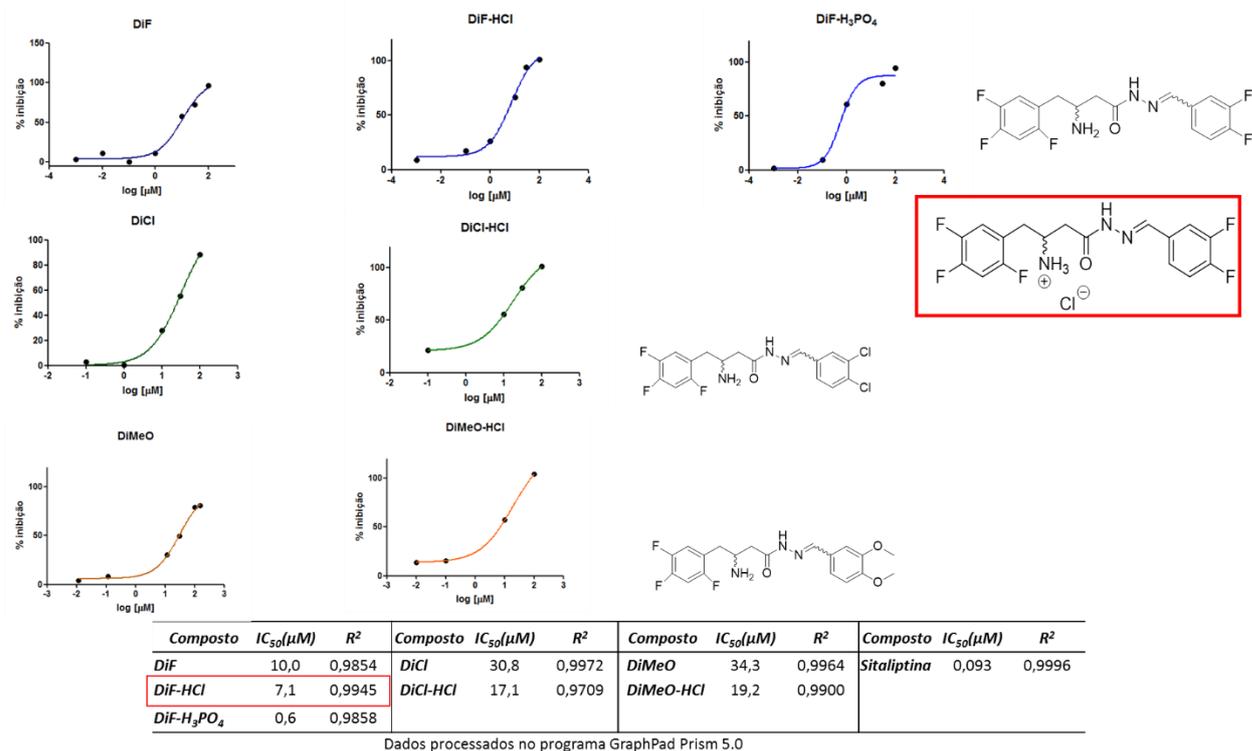


Figura 6. DPP (IV) Inhibitor Screening Assay kit e curva resposta do padrão Sitagliptina.



**Figura 7.** Curva resposta dos compostos DiF, DiCl e DiMeO. No quadro vermelho está representado a molécula do LASSBio-2124 utilizado no tratamento do presente estudo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar efeitos do novo protótipo inibidor de DPP-4 e anti-inflamatório, LASSBio-2124, para o tratamento das alterações renais e cardiovasculares decorrentes do DM2 em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos do tratamento com os protótipos nos parâmetros bioquímicos urinários e plasmáticos;
- Avaliar a estrutura e função cardíacas dos animais através de ecocardiografia transtorácica, após tratamento com as substâncias;
- Analisar parâmetros hemodinâmicos;
- Avaliar as alterações histopatológicas renais;
- Avaliar as alterações histopatológicas e imunohistoquímicas do miocárdio;
- Estudo dos mecanismos moleculares relacionados a fisiopatologia do DM2;
- Avaliação histológica da estrutura e composição dos rins através de métodos de coloração em HE, PAS e picrosírius;
- Avaliação histológica da estrutura e composição do coração através das mesmas técnicas de coloração e
- Identificar os prováveis mecanismos de ação dos novos derivados sulfonilhidrazônicos testados.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Local da pesquisa**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e no Laboratório de Farmacologia do Acoplamento Excitação-Contração Muscular e com colaboração do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas pertencentes aos Programas de Pós Graduação em Farmacologia e Química Medicinal (PPGFQM) e de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade do Brasil, então Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As substâncias foram sintetizadas no LASSBio (ICB/UFRJ) e as imagens de ecocardiografia foram realizadas no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO/UFRJ).

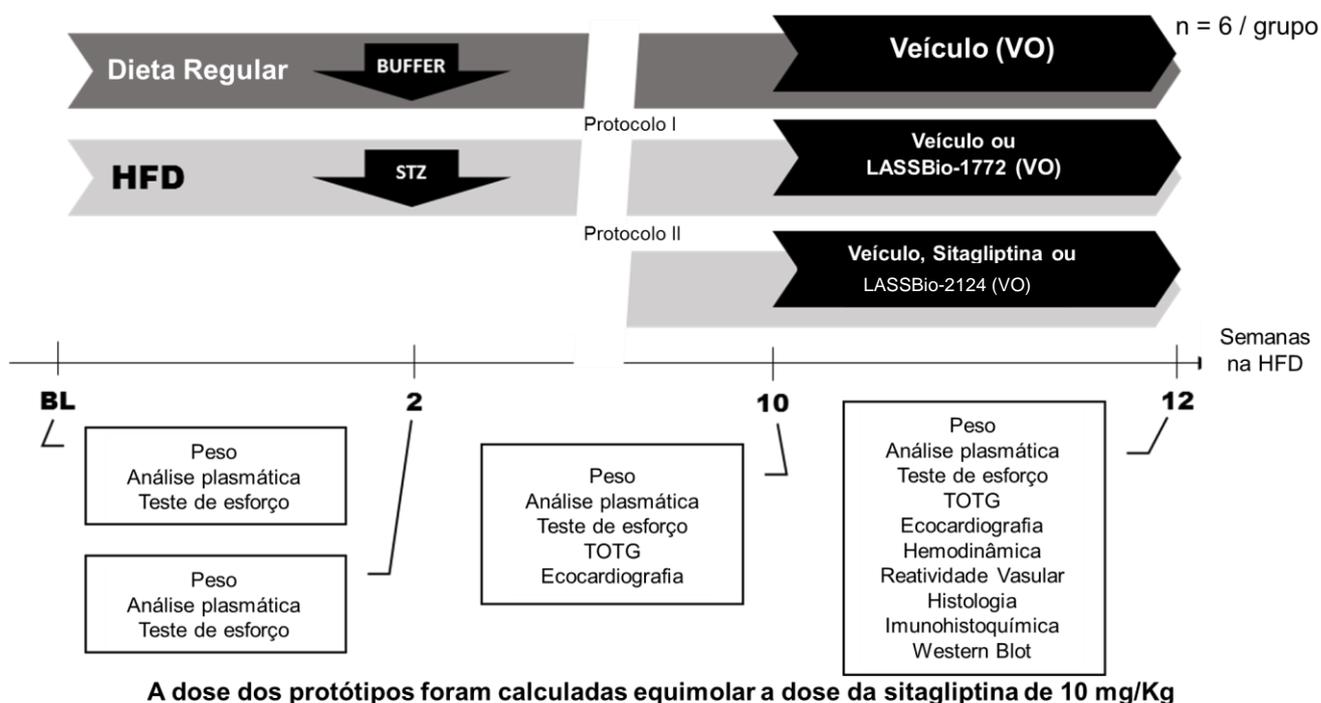
#### **3.2 Comitê de ética**

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas de Boas Práticas de Uso em Experimentação Animal, tendo o pesquisador recebido um treinamento prévio. O projeto foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRJ sob o número de protocolo DFBCICB041.

#### **3.3 Animais e desenho experimental**

Nos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 240 e 300 g. Os animais foram 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 proteína (kcal%), 20; carboidrato, 25; gordura, 45, essa dieta foi mantida durante todo o período de avaliação. Após 2 semanas os animais mantidos sob esta alimentação foram administrados por via intravenosa de estreptozotocina (STZ), 35 mg / kg, dose

única. Em contra partida, os animais do grupo normal receberam durante todo o protocolo dieta normal. Os animais diabéticos foram considerados viáveis para o experimento após 8 semanas de indução com estreptozotocina, os que apresentaram uma glicemia  $\geq 250$  mg / dL no grupo DM2. Os animais foram alocados em grupos experimentais (6 animais em cada) de acordo com o protocolo I e II ambos o grupo normal e diabético tratado com veículo (veículo da sitagliptina) estavam presentes. No protocolo I o grupo DM2 tratado com LASSBio-1772 (22,6  $\mu\text{mol}$  / kg) e II DM2 + Sitagliptina (22,6  $\mu\text{mol}$  / kg) e DM2 + LASSBio-2124 (22,6  $\mu\text{mol}$  / kg), todos receberam tratamento via oral por duas semanas.



**Figura 8.** Delineamento experimental dos protocolos I e II.

### 3.4 Análises de sangue e peso corporal

Durante o período de avaliação, foi avaliado o ganho de peso ao longo do tempo. Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal dos animais após um jejum de 12-14 h para análise dos seguintes; 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 ELISA (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 dosagem oral de glicose a 2 g / kg, após 12-14 h de jejum dos animais, as medidas foram tomadas antes da administração de sobre carga de glicose e em diferentes momentos após a administração, 15, 30, 60 e 120 min. O HOMA, um modelo matemático para avaliar a homeostase da insulina e prever a resistência à insulina foi utilizado por uma calculadora fornecida pela Universidade de Oxford (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>).

### **3.5 Parâmetros renais**

#### **3.5.1 Função renal**

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas (Tecniplast) que fornecem amostras para monitoramento metabólico preciso, com divisores permitindo separação de ração, água, fezes e urina. Eles foram aclimatados por 24 horas nas gaiolas e o protocolo foi realizado nas 24 h seguintes. Volume de ingestão (mL / dia), volume de urina excretado (mL / dia), fluxo urinário (mL / min), massa de ração ingerida (g / dia) e massa de fezes eliminadas (g / dia).

#### **3.5.2 Avaliação do perfil urinário**

A amostra de urina (1 mL) foi coletada em eppendorfs, centrifugada a 13.500 rpm por 10 min, repetida 3 vezes. Foi avaliado na urina a proteinúria (mg / ml) através da utilização do Kit Gold Analisa (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e analisadas de acordo com o protocolo do fabricante. O fluxo urinário (V) foi obtido pela seguinte equação:  $V = \text{volume de urina (mL)} / 24 \text{ horas (1440 min)}$ . Os resultados obtidos foram correlacionados com os achados histológicos (descritos abaixo).

### **3.6 Função Cardiovascular**

#### **3.6.1 Pressão Arterial Não Invasiva**

Através do platermógrafo de cauda (Medidor de Pressão Modelo LE 5001) foram determinados os parâmetros: pressão arterial sistólica, diastólica e média. Estes animais foram previamente aclimatados no recipiente de

contenção. Antes da aferição, os animais mantiveram-se sob uma fonte de calor radiante (cerca de 37 ° C). Na porção proximal da cauda, colocou o manguito em combinação com a membrana do transdutor (manguito da cauda), que foi conectada ao painel digital. O instrumento foi então ligado e deixado estabilizar até que a taxa de pulso estável fosse observada. Uma vez que o sinal de "pulso pronto" apareceu, o botão de pressão arterial foi pressionado e a pressão arterial sistólica, diastólica e média foi registrada. A pressão arterial foi registrada em vários intervalos de tempo.

### 3.6.2 Função cardíaca avaliada pela ecocardiografia

Ratos Wistar machos foram anestesiados com isoflurano a 4% (96% O<sub>2</sub>) e mantidos a 1,5-2% (~ 98% O<sub>2</sub>). A função cardíaca foi avaliada por um sistema de ecocardiografia equipado com um transdutor mecânico de 10 MHz (Vevo 770, 30 MHz, Visual Sonics, Canadá). Eixo curto e longo B-paraesternais vista para o ventrículo esquerdo (VE). O débito cardíaco e o volume sistólico foram obtidos a partir do eixo longo do modo B, de acordo com o método de Simpson (Lang et al., 2006). O diâmetro da artéria e a espessura da parede do VE foram obtidos no modo-M. Todas as medidas foram obtidas de acordo com a *American Society of Echocardiography Guidelines*.

### 3.6.3 Função cardíaca avaliada por medidas invasivas do ventrículo esquerdo

No final do protocolo os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (80 e 15 mg / dL, ip), após a artéria carótida direita foi dissecada e um cateter heparinizado com solução de NaCl (0,96%) foi inserido em um transdutor de pressão. (MLT884, ADInstruments). Após a estabilização da pressão arterial, avaliamos a pressão sistólica e a pressão diastólica, para que o cateter fosse introduzido até o Ventrículo Esquerdo (VE). Foram avaliados os parâmetros hemodinâmicos intraventriculares, pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e pressão diastólica final (PDFVE) e. Todos os registros foram armazenados no computador para posterior análise dos resultados (Powerlab, ADInstruments, EUA) usando o programa Lab Chart (versão 7.0, ADInstruments, EUA).

### **3.7 Reatividade vascular da aorta**

Para avaliar a reatividade vascular dos animais, após verificação da pressão intraventricular e eutanásia do animal, a porção torácica da aorta foi dissecada e seccionada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Dois anéis de cada animal foram colocados em hastes experimentais, uma fixo e outra móvel, e colocados em tanques experimentais preenchidos com 20 mL de solução nutritiva modificada de Tyrode constituída de (mM): NaCl, 123; KCl, 4,7; MgCl<sub>2</sub>, 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; dextrose, 11,5; NaHCO<sub>3</sub>, 15,5; CaCl<sub>2</sub>, 1,2, continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantido a 37 e pH 7,4. A voltagem gerada foi digitalizada (Digidata 1322A) e os dados armazenados em computador para posterior análise utilizando o programa AxoScope 8.1 (Axon Instruments, Inc). Após o período de estabilização do estresse (1g e 4 lavagens de 30 min), o tecido foi exposto a concentrações crescentes de fenilefrina (Phe, Phenylephrine, 1 nM - 10 µM), a fim de obter uma curva de contração máxima. O tecido foi então exposto a concentrações crescentes de acetilcolina (Ach, acetilcolina, 1 nM - 10 µM), a fim de avaliar a função endotelial através da capacidade de resposta de Ach indicado pelo relaxamento da artéria.

### **3.8 Estudos histológicos e peso do coração e rins**

Ao final do protocolo experimental os animais foram eutanasiados sob anestesia e realizado dissecação da cavidade abdominal e os rins e coração antes de serem cortados e armazenados para histologia foram pesados e esses valores foram normalizados pelo comprimento da tíbia de cada animal.

Para análise histológica, rins direitos e ápices cardíacos foram fixados em líquido de Gendre e formol zinco, respectivamente, e embebidos em parafina. Os blocos de tecido foram seccionados a 5 µm e corados para exame sob um microscópio de luz (Axiostar, Zeiss, Alemanha).

O conteúdo de colágeno ventricular esquerdo e tubulointerstitial foi analisado com Fiji<sup>50,51</sup> em cortes corados com picro-Sirius vermelho e expressos como média da área corada de vermelho em campos de 15-20 (aumento de 400x) sem vasos e glomérulos. As secções renais também foram

coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação da lesão tubular e glomerular. 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 semiquantitativo 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) <sup>52-56</sup> e assim foi obtido um escore médio.

### **3.9 Imunohistoquímica**

Cortes parafinados de coração na porção apical foi realizada técnica imunohistoquímica para avaliar a ativação da via da p38- $\alpha$ . Os cortes foram reidratados 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- $\alpha$ , AbCam, ab7952) diluído a 1:200 em PBS-BSA 0,1% *overnight* a 4°C. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% para bloqueio de peroxidases endógenas para em seguida serem incubadas com o anticorpo secundário (Nichirei, 414191F) diluído a 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.

### **3.10 Expressão de proteínas cardíacas**

#### **3.10.1 Extração da proteína tecidual**

Extratos de tecido cardíaco foram coletados dos ratos por homogeneização das amostras em tampão de lise com inibidores de protease e congelados em nitrogênio líquido imediatamente até a 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. Os sobrenadantes (cerca de 1 mL) foram coletados e congelados a - 80 ° C.

### 3.10.2 Análise de Western Blot

As concentrações totais de proteína em cada amostra foram determinadas espectrofotometricamente 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: SERCA2a, BCL2, Caspase-3 ativa, RAGE (Abcam), PLB (Santa Cruz Biotecnologia, Dallas, Texas, EUA ), p-PLB, TNF $\alpha$  e GAPDH (proteína de carga). 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 normalizada para GAPDH foi medida usando Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, EUA).

### 3.11 Análise estatística

Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. As análises estatísticas foram realizadas usando análise de variância unidirecional, análise de variância bidirecional e teste de comparação múltipla quando apropriado e teste t. 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).

## 4 RESULTADOS

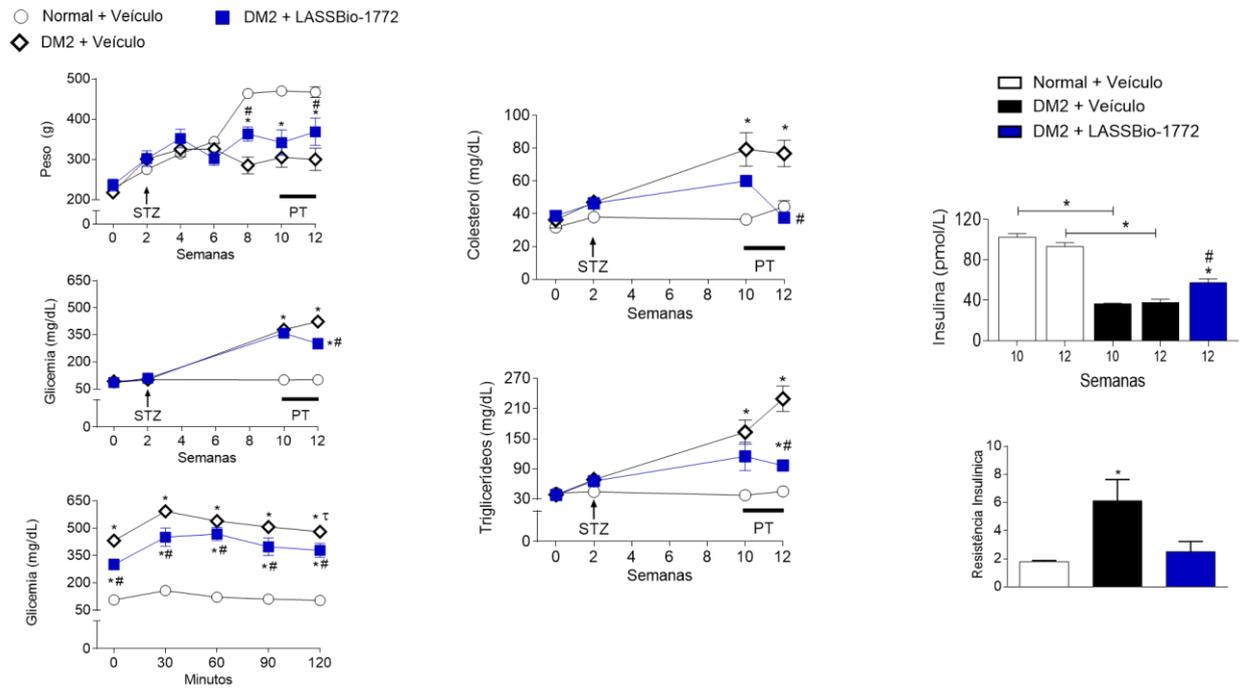
### 4.1 Análises de sangue e peso corporal

Durante o período de avaliação, os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados, com ganho de peso ao longo do tempo, mas não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, indicando que a indução do DM tipo 2, bem como o tratamento do grupo DM2 com a sitagliptina não influenciou o ganho de peso desses animais (Figura 9 A Protocolo I e Figura 10 A II).

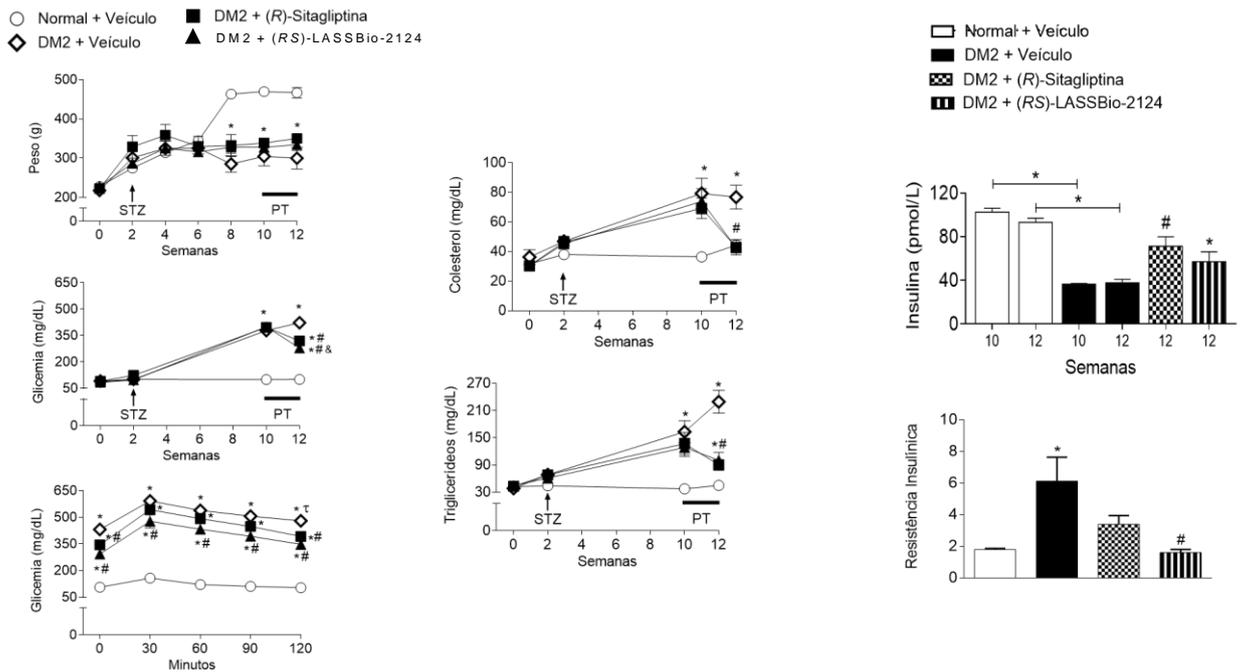
O nível de glicose (mg / dL) foi aumentado de  $100,8 \pm 3,14$  para  $423,5 \pm 8,1$ , após o estabelecimento do DM2 e o tratamento Com LASSBio-1772 reduziu apenas parcialmente para  $300 \pm 15,63$  com sitagliptina e novo composto reduzido para  $319,8 \pm 13,2$  e  $279,7 \pm 17,8$ , respectivamente. Duas horas após o TOTG, o nível plasmático de glicose voltou ao normal em animais diabéticos tratados com LASSBio-1772, sitagliptina ou composto. O novo inibidor também 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. O nível de insulina (pmol / L) diminuiu em animais diabéticos de  $102,5 \pm 3,6$  para  $36,5 \pm 0,6$  e recuperou para  $57,40 \pm 5,12$ ,  $71,2 \pm 8,7$  e  $57,1 \pm 9,1$  após tratamento com LASSBio-1772, sitagliptina e composto, respectivamente (Figura 9 B – F Protocolo I e Figura 10 B – F Protocolo II ).

A partir dos dados de insulina e glicose plasmática, foi calculado o índice HOMA-IR (modelo de avaliação homeostática). De acordo com a Figura 9 G Protocolo I e Figura 10 G Protocolo II (resistência à insulina) do grupo DM2 tratado com veículo aumentou ( $7,8 + 3,5$ ) quando comparado ao grupo controle ( $1,8 + 0,1$ ), indicando resistência à insulina nesses animais. No entanto, o tratamento com o composto reduziu este valor para um valor semelhante ao do grupo normal ( $1,6 + 0,2$ ) e com uma diferença significativa do tratamento com sitagliptina ( $3,4 + 0,5$ ). Já o tratamento com LASSBio-1772 não apresentou nenhuma melhora nesse parâmetro. O HOMA-IR tem sido utilizado para o diagnóstico de DM2 e síndrome metabólica, que são mais frequentemente acompanhados de obesidade, como vimos em nossos grupos de DM2, bem

como aumento dos níveis de colesterol total, hipertensão e outras disfunções cardiovasculares.



**Figura 9 (Protocolo I). Análise de sangue demonstrando distúrbio metabólico e peso corporal.** (A) Peso corporal e análise do sangue: (B) Glicose plasmática, (C) Teste oral de tolerância à glicose após 2 semanas de tratamento oral, (D) Colesterol e (E) Triglicédeos. A (F) insulina 10 semanas de protocolo e tratamento por via oral após 2 semanas. Após o cálculo do índice HOMA obtivemos a (G) Resistência insulínica. 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; &  $P < 0,05$  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; PT = protocolo terapêutico.



**Figura 10 (Protocolo II). Análise de sangue demonstrando distúrbio metabólico e peso corporal.** (A) Peso corporal e análise do sangue: (B) Glicose plasmática, (C) Teste oral de tolerância à glicose após 2 semanas de tratamento oral, (D) Colesterol e (E) Triglicerídeos. A (F) insulina 10 semanas de protocolo e tratamento por via oral após 2 semanas. Após o cálculo do índice HOMA obtivemos a (G) Resistência insulínica. 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; & 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; PT = protocolo terapêutico.

## 4.2 Teste de esteira

Após o protocolo experimental do DM2, houve uma diminuição significativa nos parâmetros avaliados no teste de esteira, mas após duas semanas de tratamento nenhuma das substâncias (LASBio-1772, sitagliptina ou LASSBio-2124) foi capaz de recuperar (dados não mostrados).

## 4.3 Parâmetros Renais

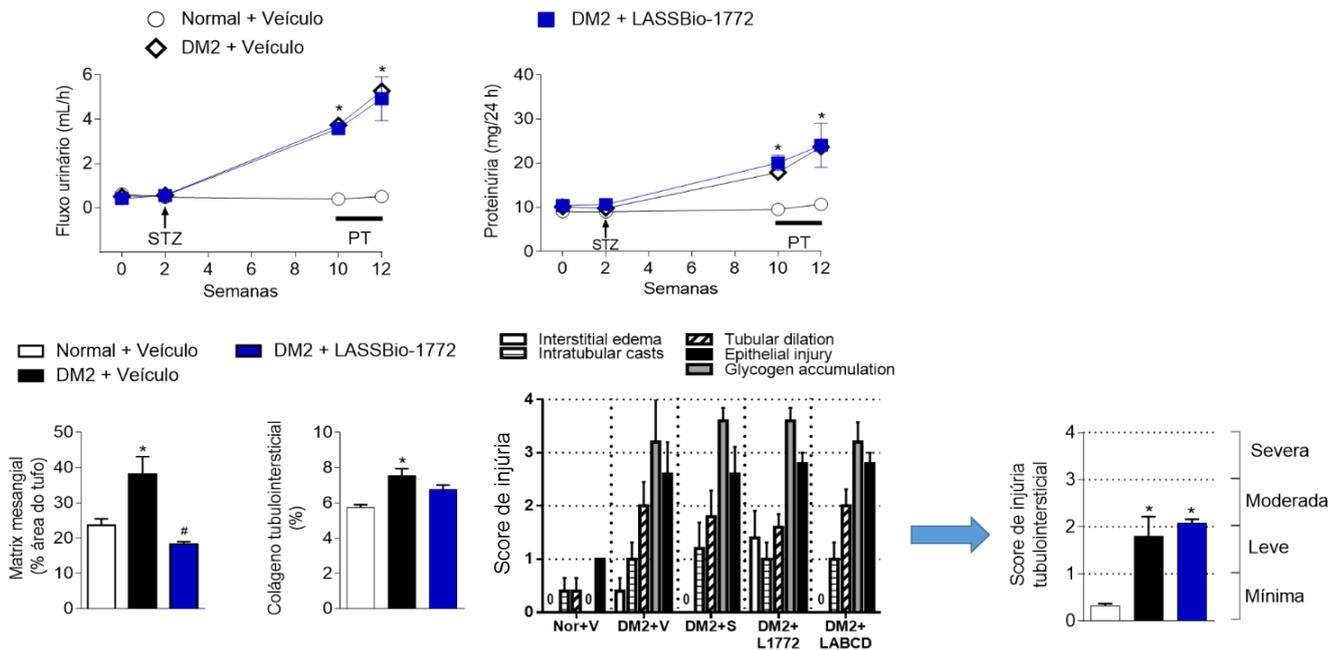
### 4.3.1 Aspectos funcionais

Os animais diabéticos mostraram uma elevada poliúria com um aumento do fluxo urinário (Figura 11 A Protocolo I e Figura 12 A Protocolo II) de  $0,009 \pm 0,0001$  para  $0,09 \pm 0,003$  (mL / min). Curiosamente, apenas o tratamento de animais diabéticos com LASSBio-2124 reduziu parcialmente para  $0,07 \pm 0,005$  (mL / min, P < 0,05). Amostras de urina foram coletadas para

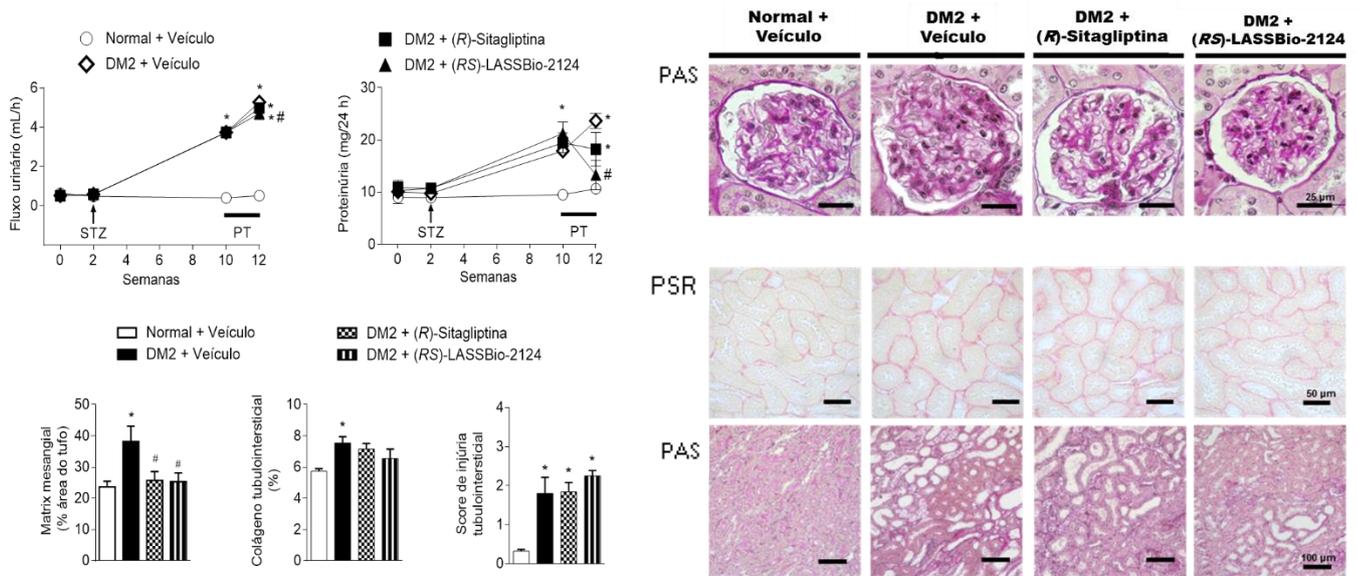
avaliar as composições bioquímicas, como proteinúria (mg / 24 horas) (Figura 11 B Protocolo I e Figura 12 B Protocolo II). Estes parâmetros aumentaram para 23,7 + 1,5 (mg / 24 horas) em comparação com o grupo veículo e uma proteinúria significativamente reduzida foi observada no grupo LASSBio-2124 (13,3 + 2,8, P <0,05). No ponto final, o protocolo experimental de peso dos rins (dados não mostrados) apresentou um aumento na massa que apenas o tratamento com LASSBio-2124 foi capaz de reduzir totalmente (P <0,05).

#### 4.3.2 Avaliação histológica

Às 12 semanas, os ratos diabéticos mostraram uma evidente expansão da matriz mesangial glomerular quando comparados aos animais não diabéticos (Figura 11 C, P <0,05 Protocolo I e Figura 12 C, P <0,05 Protocolo II) e tanto o LASSBio-1772, a sitagliptina quanto o LASSBio-2124 dificultaram sua progressão (P <0,05 vs. veículo diabético).



**Figura 11 (Protocolo I). Análise funcional e histológica renal.** 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 tubulointersticiais (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.



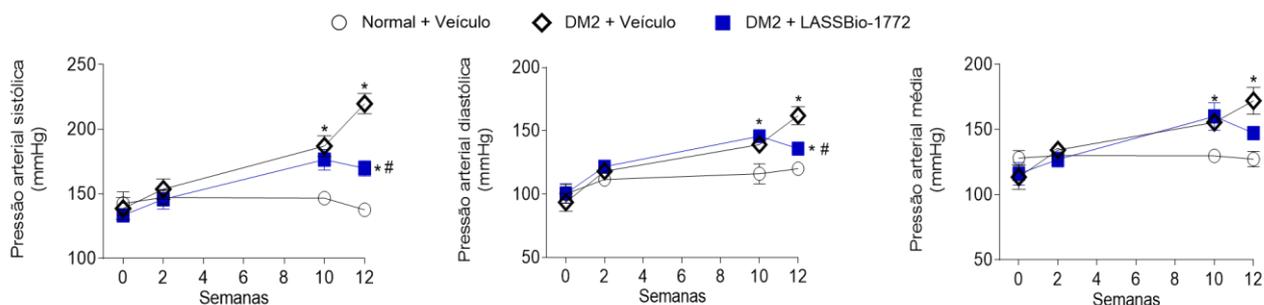
**Figura 12 (Protocolo II). Análise funcional e histológica renal.** Fluxo urinário (A) e proteinúria de 24 horas (B). Expansão mesangial acentuada (C) foi encontrada apenas em animais diabéticos tratados com veículo ( $P < 0,05$  vs. Normal). Frações de colágeno (D) e média das injúrias ranqueadas em scores (E) ( $P < 0,05$  vs. DM2 + Veículo). Imagens representativas de glomérulos corticais (F, coloração PAS; barra: 25  $\mu$ m) e epitélio tubular (G, coloração PSR, barra: 50  $\mu$ m e H, coloração PAS, barra: 100  $\mu$ m) mostrando alterações histológicas em animais diabéticos. 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.

## 4.4 Função Cardiovascular

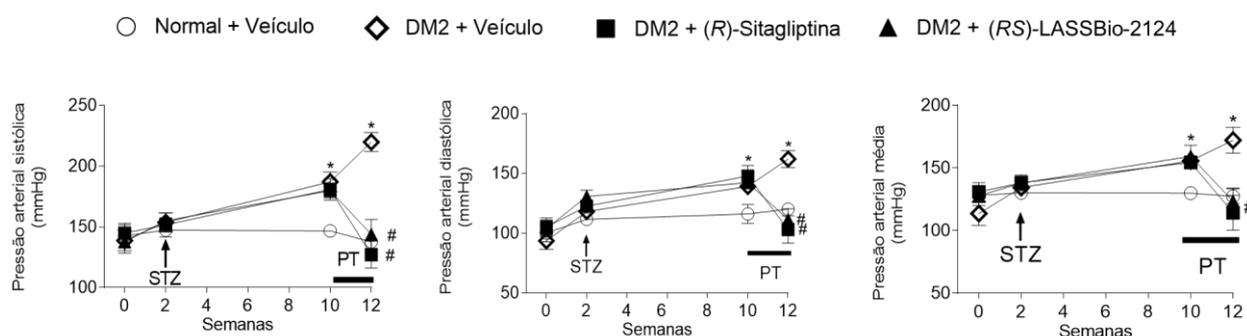
### 4.4.1 Pressão Arterial Não Invasiva

Na pressão não invasiva através do plestimógrafo de cauda, no Protocolo I, LASSBio-1772 reverteu parcialmente os parâmetros de pressão sistólica e pressão diastólica (Figura 13 A e B, respectivamente), enquanto não teve alteração com o tratamento na pressão arterial média (Figura 13 C).

Já o novo composto, LASSBio-2124 reverteu todos os parâmetros. Apresentou respostas semelhantes na pressão arterial não invasiva em comparação ao fármaco já utilizado na prática clínica, a sitagliptina. Na pressão sistólica diminuiu de 219,9 + 7,8 (mmHg) para 143,8 + 12,4 (mmHg) e na pressão diastólica de 162,1 + 7,02 (mmHg) para 111,5 + 9,02 (mmHg) (Figura 14 A e B, respectivamente). O mesmo podemos observar na pressão arterial média (Figura 14 C).



**Figura 13 (Protocolo I). Pressão não invasiva.** (A) Pressão Arterial Sistólica, (B) Pressão Arterial Distólica e (C) Pressão Arterial Média (PAM). 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.



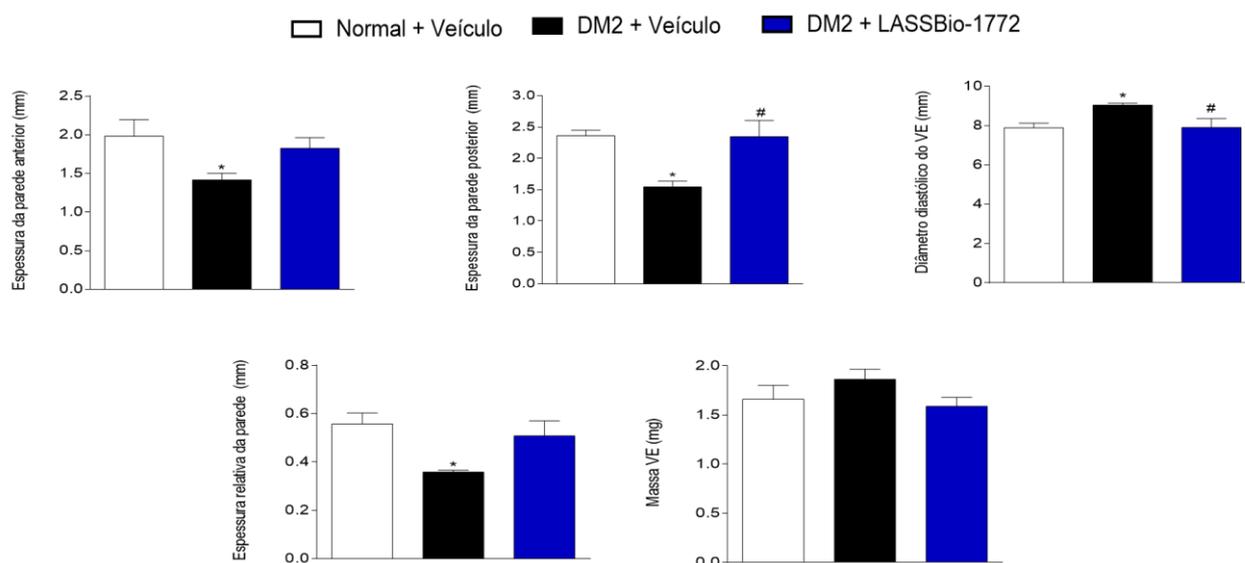
**Figura 14 (Protocolo II). Pressão não invasiva.** (A) Pressão Arterial Sistólica, (B) Pressão Arterial Distólica e (C) Pressão Arterial Média (PAM). Os dados representam a média  $\pm$  S.E.M. (n = 6 ratos por grupo). \* P < 0,05 vs. Normal + Veículo e # P < 0,05 vs. DM2 + Veículo. Analisado por ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.4.2 Morfologia cardíaca avaliada pela ecocardiografia

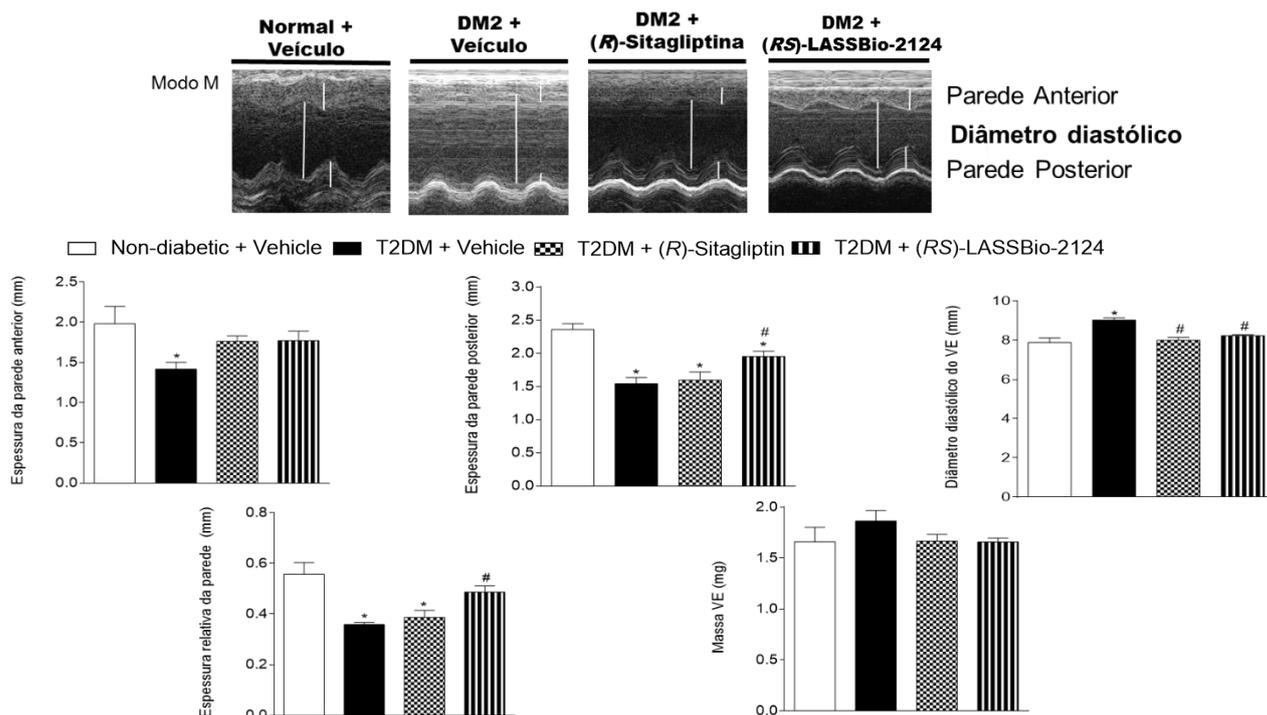
A espessura da parede anterior do ventrículo esquerdo (VE) foi quantificada em diástole e demonstrou diminuição para o grupo DM2 tratado com veículo de  $2,00 \pm 0,21$  mm (grupo não-diabético) para  $1,48 \pm 0,09$  mm, porém nenhum tratamento foi capaz para reverter (Figura 15 A Procolo I e Figura 16 B Procolo II). Na espessura da parede posterior há também uma redução de  $2,36 \pm 0,09$  mm (grupo não-diabético) para  $1,55 \pm 0,09$  mm no grupo tratado com veículo, mas o LASSBio-1772 reverteu esse parâmetro para  $2,35 \pm 0,23$  mm (Figura 15 B Protocolo I) e LASSBio-2124  $1,95 \pm 0,08$  mm (Figura 16 C Potocolo II). No diâmetro diastólico do VE diastólico aumentou de  $7,88 \pm 0,24$  mm para  $9,04 \pm 0,11$  mm no grupo Veículo e o LASSBio-1772 diminuiu este parâmetro para  $7,90 \pm 0,43$  mm (Figura 15 C Protocolo I). Já

LASSBio-2124 reverteu este parâmetro (semelhante ao grupo tratado com sitagliptina) para  $8,24 \pm 0,05$  mm (Figura 16 D Protocolo II).

Quando a espessura da parede posterior foi normalizada com o diâmetro interno na diástole do VE, o parâmetro encontrado foi a espessura relativa da parede (Figura 16 E Protocolo II) que mostrou redução no grupo veículo  $0,36 \pm 0,008$  mm em relação ao grupo normal  $0,56 \pm 0,04$  mm, revertida apenas no grupo DM2 + LASSBio-2124 para  $0,49 \pm 0,02$  mm. Através dessas análises, a massa do VE foi calculada, porém nenhuma alteração foi observada (Figura 16 F Protocolo II).



**Figura 15 (Protocolo I). Morfologia do coração medida pela ecocardiografia.** Dimensões do ventrículo esquerdo: (A) espessura da parede anterior, (C) espessura da parede posterior, (D) diâmetro diastólico do VE, (E) espessura relativa da parede e (F) massa ventricular esquerda. O peso do coração (G) não foi normalizado pelo comprimento da tíbia. 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 one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

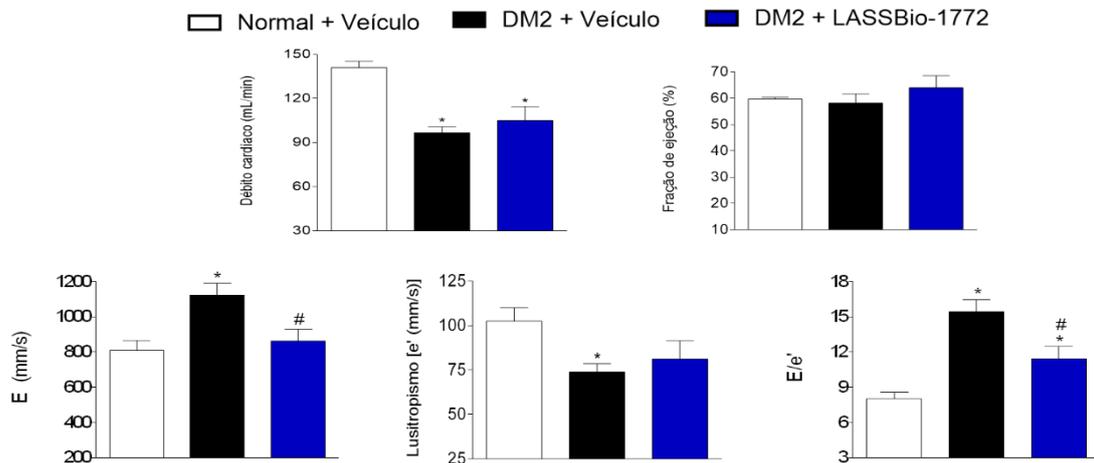


**Figura 16 (Protocolo II). Morfologia do coração medida pela ecocardiografia.** Dimensões do ventrículo esquerdo (A) imagens em modo M da (B) espessura da parede anterior, (C) espessura da parede posterior, (D) diâmetro diastólico do VE, (E) espessura relativa da parede e (F) massa ventricular esquerda. O peso do coração (G) não foi normalizado pelo comprimento da tíbia. 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 one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

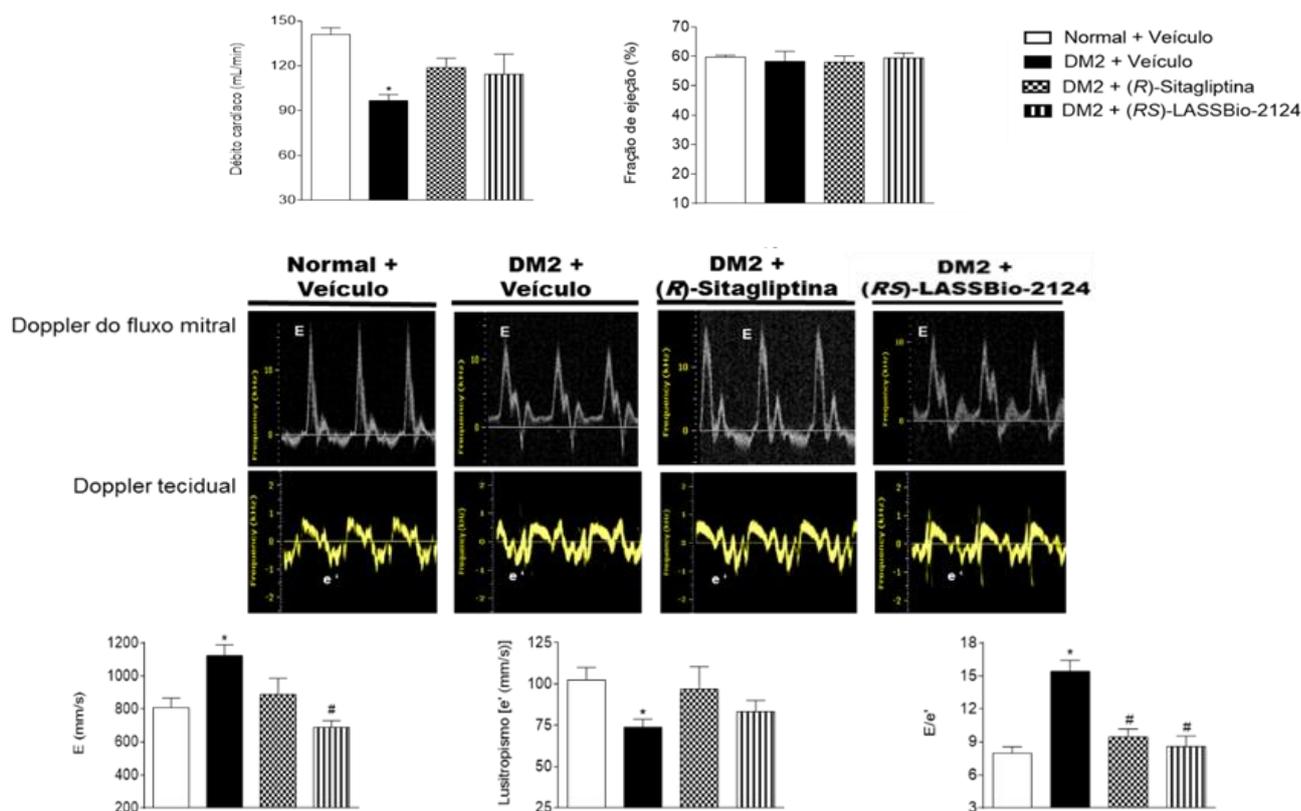
#### 4.4.3 Função cardíaca avaliada pela ecocardiograma

O ecocardiograma também foi utilizado para avaliações da função sistólica e diastólica. Na função sistólica, o débito cardíaco (Figura 17 A Protocolo I e Figura 18 A Protocolo II) apresentou diferença significativa entre o grupo normal e o grupo DM2, mas nenhum tratamento reverteu esse parâmetro. A fração de ejeção (Figura 17 B Protocolo I e Figura 18 B Protocolo II) permaneceu preservada entre todos os grupos. Na função diastólica, foi detectada disfunção diastólica, pois o E (mm / s) máximo aumentou de  $825,8 \pm 62,22$  para  $1038 \pm 65,53$  e normalizou-se parcialmente com o LASSBio-1772 e totalmente com o novo inibidor da DPP-4,  $861,70 \pm 67,61$  (Figura 17 C Protocolo I) e  $688,4 \pm 41,0$  (Figura 18 E Protocolo II), respectivamente. No Doppler tecidual, há uma diminuição em  $e'$  de  $102,5 \pm 7,59$  para  $73,89 \pm 4,70$  (Figura 17 E Protocolo I e Figura 18 F Protocolo II), mas não foi revertida com os tratamentos. A pressão de enchimento, correspondente à relação  $E / e'$ ,

aumentou de  $8,17 \pm 0,68$  para  $14,25 \pm 1,04$  nos animais DM2 + Veículo e que o grupo tratado no protocolo I com o LASSBio-1772 diminuiu apenas para  $11,42 \pm 1,04$  (Figura 17 E) e com LASSBio-2124 reverteu para  $8,58 \pm 0,93$  similar ao do fármaco sitagliptina (Figura 18 G Protocolo II).



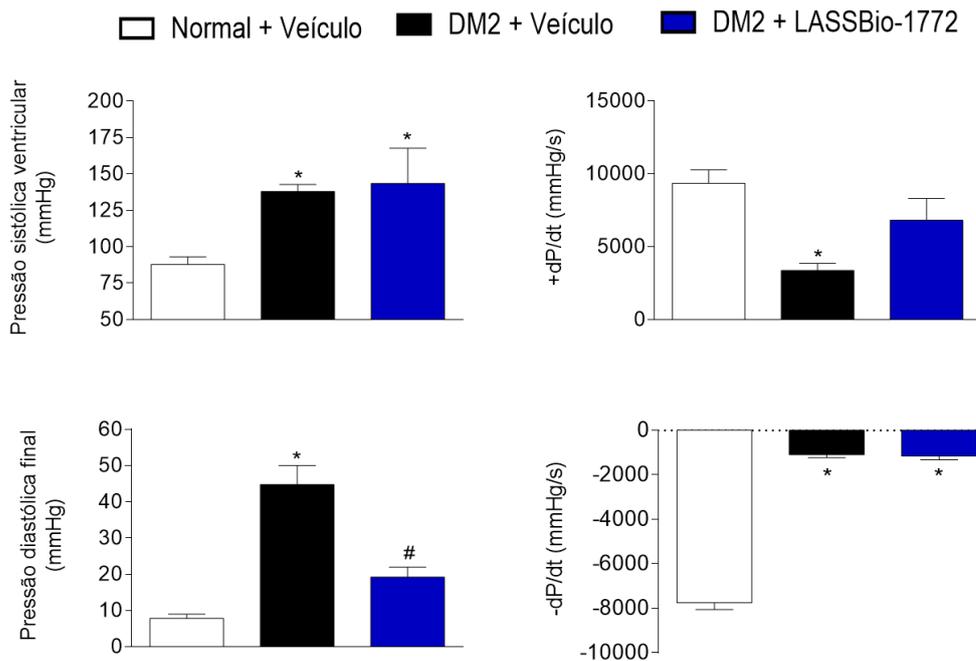
**Figura 17 (Protocolo I). Função cardíaca medida pela ecocardiografia.** A função cardíaca foi avaliada com função sistólica: (A) débito cardíaco e (B) fração de ejeção. A função diastólica foi detectada com os ecocardiogramas Doppler do fluxo mitral onde observou-se (C) onda E e com Doppler tecidual (D) onda 'e (E) E / e'. 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 one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey.



**Figura 18 (Protocolo II). Função cardíaca medida pela ecocardiografia.** A função cardíaca foi avaliada com função sistólica: (A) débito cardíaco e (B) fração de ejeção. A função diastólica foi detectada com os ecocardiogramas (C) Doppler do fluxo mitral e (D) Doppler tecidual. Os parâmetros observados foram: (E) onda E, (F) e' e (G) E / e'. 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 one-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey.

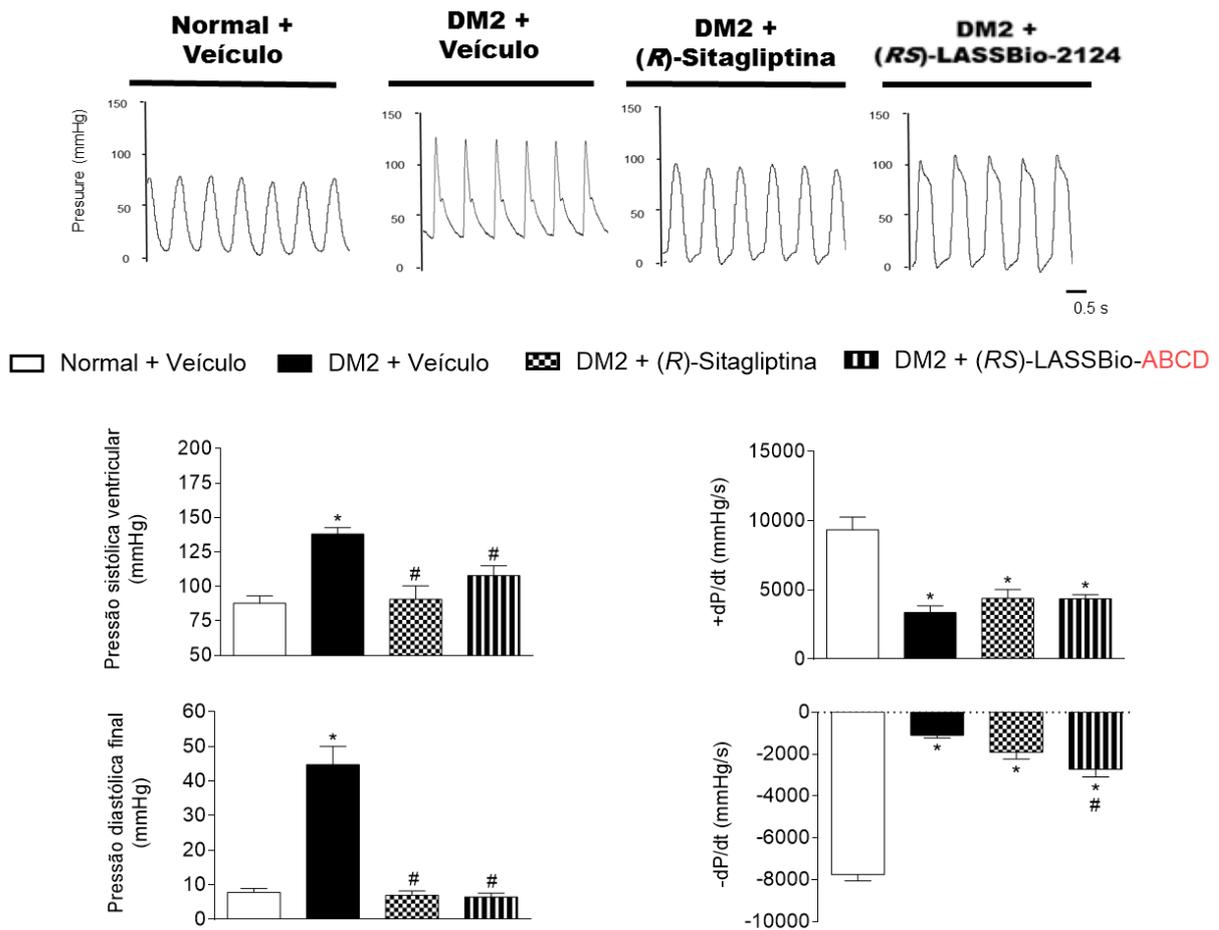
#### 4.4.4 Função cardíaca por medidas invasivas do ventrículo esquerdo

A pressão sistólica e diastólica final do VE (mmHg) foi aumentada (de  $87,90 \pm 5,35$  e  $7,81 \pm 1,16$  para  $138,1 \pm 4,79$  e  $44,79 \pm 5,31$ ) em animais diabéticos e ambos os parâmetros foram revertidos por sitagliptina ( $90,79 \pm 3,99$  e  $6,98 \pm 1,26$ ) e composto ( $107,9 \pm 7,08$  e  $6,52 \pm 1,13$ ) (Figura 20 B e C Protocolo II). Porém no Protocolo I o LASSBio-1772 reverte apenas pressão diastólica final do VE (mmHg) (Figura 19 A e B).



**Figura 19 (Protocolo I). Função cardíaca medida por medidas invasivas da frequência cardíaca.** LVSP representativo (A), (B) + dP / dt, (C) LVEDP e (D) -dP / dt. Os dados representam a média ± S.E.M. (n = 6 por grupo). \* P <0,05 vs. Normal + Veículo; # P <0,05 vs. DM2 + Veículo. PSVE, Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo e PDFVE, Pressão Diastólica no Ventrículo Esquerdo. Análise por ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

Comparado com não-diabéticos, os animais diabéticos mostraram um decréscimo +dP / dt max (P <0,05 vs. DM2 + Veículo), porém o LASSBio-2124 reverteu o -dP / dt max (Figura 20 D, E Protocolo II).

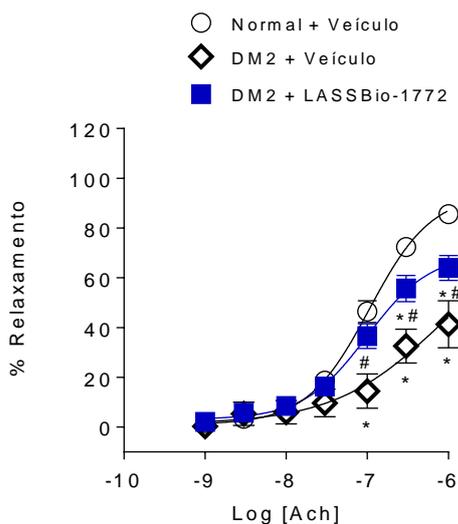


**Figura 20 (Protocolo II). Função cardíaca medida por medidas invasivas da frequência cardíaca.** (A) Hemodinâmica Intracavitária Esquerda. LVSP representativo (B), (C) + dP / dt, (D) LVEDP e (E) -dP / dt. Os dados representam a média  $\pm$  S.E.M. (n = 6 por grupo). \* P <0,05 vs. Normal + Veículo; # P <0,05 vs. DM2 + Veículo. PSVE, Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo e PDFVE, Pressão Diastólica no Ventrículo Esquerdo. Análise por ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

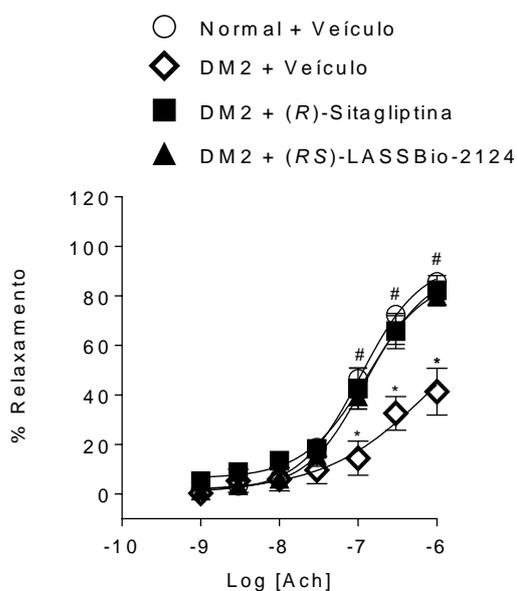
#### 4.5 Reatividade vascular da aorta

Apenas o veículo foi deslocado para a direita da curva do anel aórtico em comparação ao grupo não-diabético, demonstrando uma resposta reduzida à ACh, indicando possível disfunção endotelial. No entanto, os anéis aórticos de animais DM2 que foram tratados com sitagliptina e composto LASSBio-2124 demonstraram uma resposta aumentada à ACh com o deslocamento da curva para esquerda (Figura 21 Protocolo I e Figura 22 Protocolo II), uma resposta parcial com o LASSBio-1772. Na Tabela 1, calculamos o relaxamento máximo induzido por Ach e a concentração excitatória média (EC50) da ACh nesses mesmos anéis aórticos. Diminuindo nos grupos DM2 quando comparado ao grupo normal em relação ao relaxamento máximo, enquanto a EC50 do DM2 +

veículo está aumentado e o tratamento com LASSBio-2124 apresentou uma resposta igual ao tratamento com sitagliptina. O tratamento com LASSBio-2124 melhorou o relaxamento da aorta induzida pela acetilcolina de animais diabéticos com eficácia e potência similares à sitagliptina, um fármaco já utilizado na prática clínica, indicando a recuperação da disfunção do endotélio induzida por DM2.



**Figura 21 (Protocolo I). Reatividade vascular da aorta.** 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.



**Figura 22 (Protocolo II). Reatividade vascular da aorta.** 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.

**Tabela 1.** Efeitos dos tratamentos na reatividade vascular da aorta.

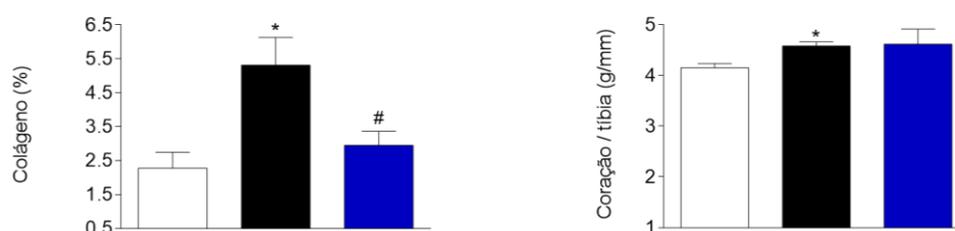
Grupos	% Relaxamento	EC <sub>50</sub> (μM)
Normal + Veículo	95,0 ± 1,9	0,10 ± 0,02
DM2 + Veículo	68,0 ± 4,0*	1,5 ± 0,9
DM2 + LASSBio-1772	70,5 ± 4,5*	0,4 ± 0,02
DM2 + (R)-Sitagliptina	91,5 ± 3,6#	0,2 ± 0,06
DM2 + (RS)-LASSBio-2124	87,1 ± 3,6#	0,1 ± 0,02

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.

#### 4.6 Avaliação histológica e imunohistoquímica dos tecidos cardíacos e peso

Um aumento no colágeno intersticial foi encontrado na parede livre do VE de animais diabéticos quando comparado aos normais (Figura 23 A Protocolo I e Figura 24 B Protocolo II, P <0,05). Ambos os tratamentos preveniram sua deposição (P <0,05, vs. DM2) e mantiveram a área de colágeno em níveis normais.

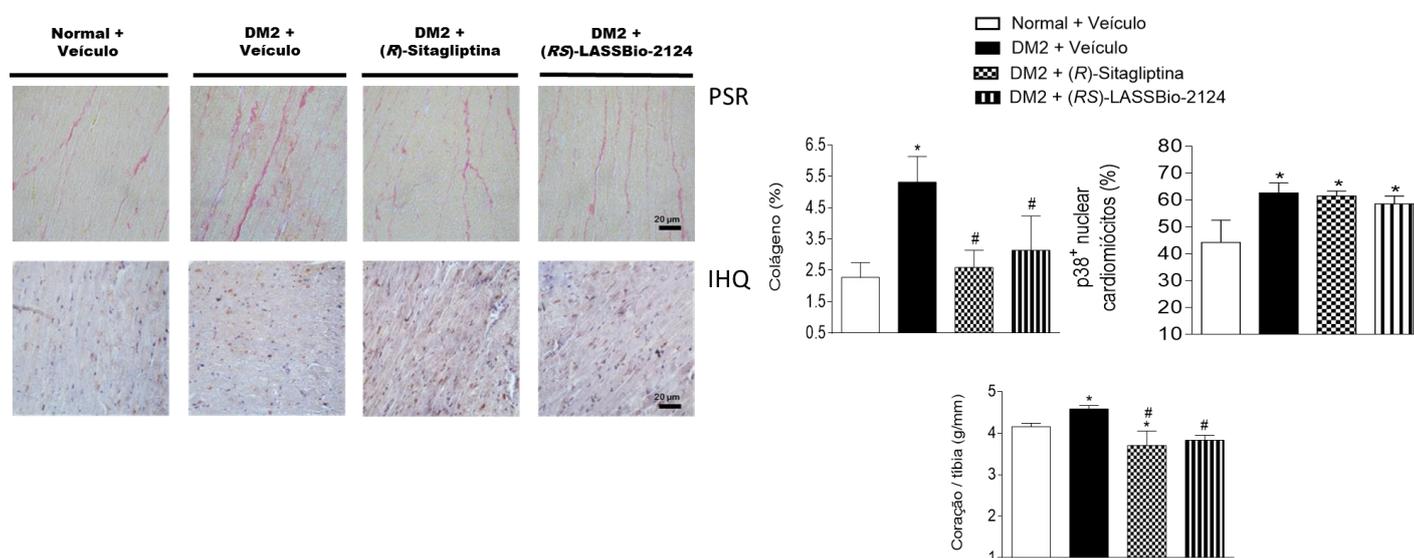
□ Normal + Veículo    ■ DM2 + Veículo    ■ DM2 + LASSBio-1772



**Figura 23 (Protocolo I). Fração de colágeno e peso do coração.** A fração de colágeno obtido através da coloração picosirius, resultado demonstrado no gráfico A e peso do coração normalizado pelo comprimento da tibia. Valores representados como média ± E.P.M. (n = 6 ratos por grupo). \* P < 0.05 vs. Normal; # P < 0.05 vs. DM2 + Veículo. Análise por one-way ANOVA seguido por Tukey's post-hoc test.

Na avaliação imunohistoquímica, realizada apenas no protocolo II, a p38  $\alpha$  MAPK apresentou um aumento em comparação aos animais normais porém nenhum dos tratamento foi capaz de reverter este parâmetro (Figura 24 C Protocolo II,  $P < 0,05$ ).

Após a eutanásia dos animais, o grupo DM2 + Veículo apresentou aumento da massa cardíaca após normalização pelo comprimento da tíbia de cada animal (Figura 24 D Protocolo II) de  $4,15 \pm 0,08$  (g / mm) (Normal) para  $4,59 \pm 0,08$  (g / mm) e somente LASSBio-2124 foi capaz de reverter completamente ( $3,83 \pm 0,11$  g / mm,  $P < 0,05$ ).

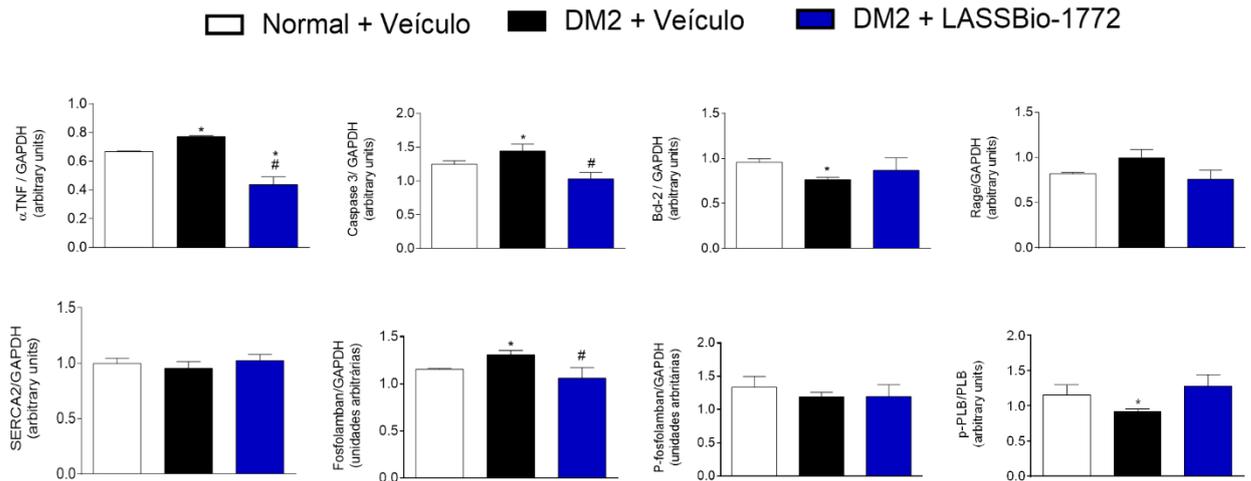


**Figura 24 (Protocolo II). Fração de colágeno, imunohistoquímica e peso do coração.** Podemos observar A deposição de coágênio nos tecidos cardíacos através da coloração picrossirius e abaixo a imunohistoquímica de tecido cardíaco embebido em parafina, mostrando localização nuclear da Phospho-p38  $\alpha$  MAPK. e os gráficos de B fração de colágeno, C p38 nuclear nos cardiomiócitos e D peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia. Valores representados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6 ratos por grupo). \*  $P < 0,05$  vs. Normal; #  $P < 0,05$  vs. DM2 + Veículo. Análise por one-way ANOVA seguido por Tukey's post-hoc test.

#### 4.7 Expressão de proteínas cardíacas

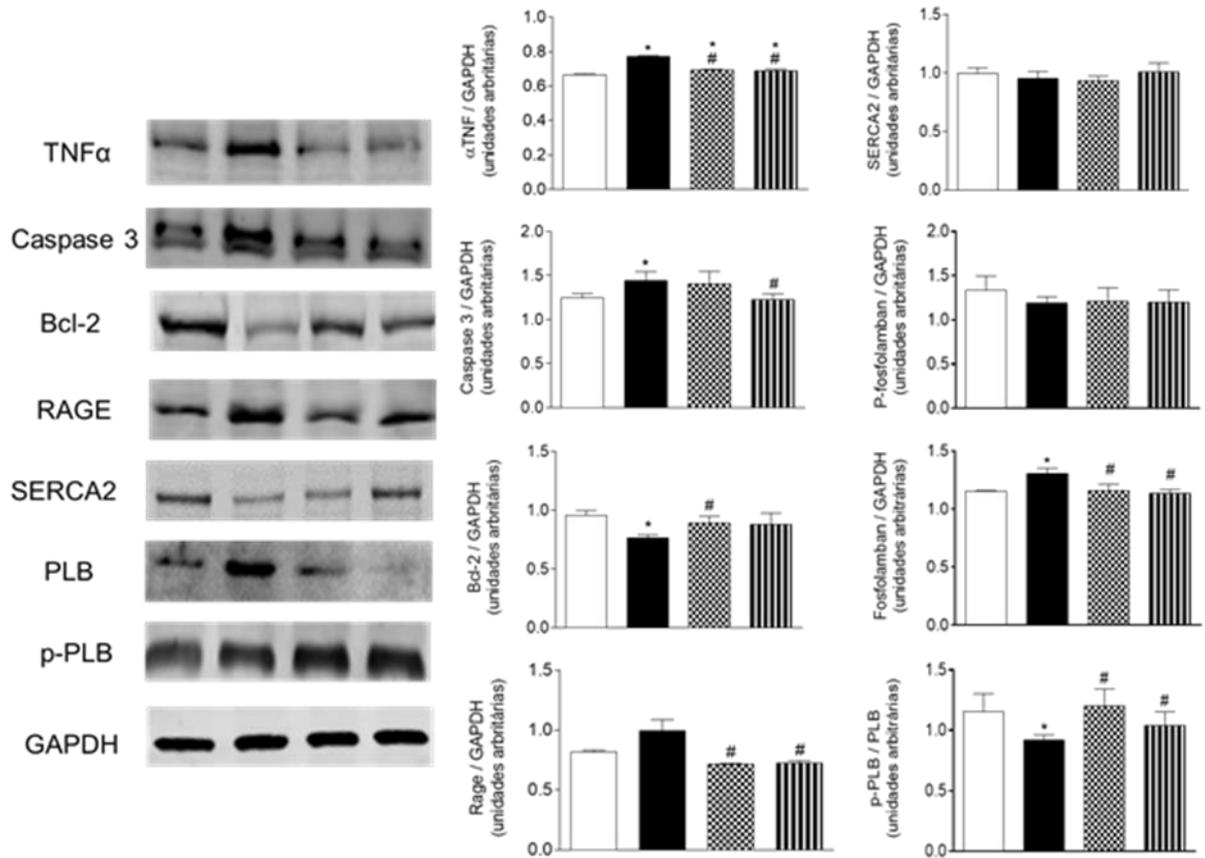
Análises de Western blot de tecidos cardíacos mostraram que no diabético o TNF- $\alpha$  foi superexpresso em corações de ratos DM2 ( $P < 0,05$  vs. não-diabéticos) e parcialmente recuperado com sitagliptina e LASSBio-2124 (DM2 + veículo vs. DM2 + LASSBio-2124,  $P < 0,05$ , Figura 26 B). O mesmo ocorre com a caspase 3, mas apenas o LASSBio-2124 se recuperou completamente (DM2 + veículo vs. DM2 + LASSBio-2124,  $P < 0,05$ , Figura 26

C). A regulação negativa de BCL2 foi significativamente no coração diabético (DM2 + veículo vs. Normal,  $P < 0,05$ , Figura 26 D). A expressão relativa de PLB (DM2 + Veículo vs. Normal,  $P < 0,05$ ). Este parâmetro foi normalizado após tratamento com sitagliptina e LASSBio-2124 (DM2 + veículo vs. DM2 + LASSBio-2124,  $P < 0,05$ , Figura 26 H).



**Figura 25 (Protocolo I). Expressão de proteínas cardíacas.** Quantificação de expressão de (A) TNF $\alpha$  (n = 3), (B) Caspase 3 ativa (n = 3), (C) Bcl-2 (n = 4), (D) RAGE (n = 2), (E) SERCA 2A (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.

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



**Figura 26 (Protocolo II). Expressão de proteínas cardíacas.** (A) Western blot representativo de TNF $\alpha$ , Caspase 3, Bcl-2, RAGE, SERCA, Phospholamban e P-fosfolamban. Quantificação de expressão de (B) TNF $\alpha$  (n = 3), (C) Caspase 3 ativa (n = 3), (D) Bcl-2 (n = 4), (E) RAGE (n = 2), (F) SERCA 2A (n = 3), (G) p-fosfolamban (n = 3), (H) fosfolamban (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.

## 5 DISCUSSÃO

A síndrome metabólica é um quadro pré-existente no diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e está presente durante todo o curso da doença e desencadeia, dentre outros, processos inflamatórios. Por causa disso, o DM2 é considerado uma doença pró-inflamatória. A inflamação é o fator desencadeante de alterações na micro e macrovasculatura que culmina na fisiopatologia da cardiomiopatia e nefropatia diabética<sup>57,16,58-60</sup> e está intimamente relacionado com a deposição de gordura.

Em nossos dados, o novo composto reduziu a hiperglicemia e a intolerância à glicose melhor do que a sitagliptina. Os inibidores da DPP-IV, como a sitagliptina, suprimem a atividade da DPP-IV e, conseqüentemente, prolongam a meia-vida do GLP-1. O GLP-1 é responsável por pelo menos 50-70% da secreção de insulina pós-prandial, melhorando o controle glicêmico por um mecanismo dependente de glicose<sup>61</sup>.

De acordo com os critérios do WHO (*World Health Organization*) e do NCEP (*National Cholesterol Education Program*) para o diagnóstico de síndrome metabólica, a mudança no perfil lipídico sugere uma dislipidemia e 3 dos 5 fatores diagnósticos (**Circunferência abdominal:** homens  $\geq 102$  cm e mulheres  $\geq 88$  cm; **Triglicerídeo:**  $\geq 150$  mg/dL; **HDL:** homens  $< 140$  mg/dL e mulheres  $< 50$  mg/dL; **Pressão arterial:**  $\geq 130$  mmHg /  $\geq 85$  mmHg e **Glicose:**  $\geq 100$  mg/dL) presentes qualificam um paciente para síndrome metabólica<sup>62</sup>. Esses dados foram observados nos animais utilizados neste estudo após a indução do DM2, pela dieta hipercalórica após a injeção de baixa dose de estreptozotocina (HFD-STZ), que mostrou níveis elevados de triglicérides séricos e colesterol total, corroborando com um dos critérios diagnósticos de síndrome metabólica. Outros trabalhos com modelos semelhantes ao utilizado no presente estudo também encontraram valores significativamente maiores de triglicérides e colesterol<sup>63,64</sup>. Os mecanismos para este controle lipídico podem estar relacionados ao efeito do GLP-1 na absorção e metabolismo lipídico<sup>47,65</sup> com um mecanismo duplo anti-inflamatório, que foi demonstrado em estudos anteriores como um mecanismo inibitório para o acúmulo de lipídios<sup>57,66,18</sup>.

O HOMA-IR tem sido utilizado para o diagnóstico de DM2 e síndrome metabólica, que são mais frequentemente acompanhados de obesidade, como vimos em nossos grupos de DM2, bem como aumento dos níveis de colesterol total, hipertensão e outras disfunções cardiovasculares. O aumento da glicemia no grupo diabético mostrou uma redução maior com o uso do novo composto, que refletiu na diminuição da resistência à insulina (RI) pelo cálculo do HOMA e uma otimização da função das células  $\beta$  pelo aumento parcial da percentagem da massa destas células (dados não mostrados). A intolerância à glicose foi confirmada pelo teste oral de tolerância à glicose, com diferença significativa entre o grupo DM2 e o grupo normal, com redução significativa pelo uso do novo composto, o que também justificaria a diminuição da RI, embora não houvesse aumento significativo dos níveis de insulina plástica.

Os animais diabéticos apresentaram uma alta poliúria com aumento do fluxo urinário e aumento da proteinúria. No aspecto estrutural, podemos observar a expansão da matriz mesangial dos animais diabéticos, deposição de colágeno e lesão tubulointersticial. A nefropatia diabética (ND) é caracterizada por mudanças estruturais e funcionais. No início da ND, hipertrofia tubular está presente, mas eventualmente a fibrose intersticial <sup>16</sup>. Possivelmente, quatro fatores primários responsáveis pelo mecanismo de fibrose são observados na nefropatia diabética, primeiro o Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que ativa a via do fator transformador do crescimento beta (TGF- $\beta$ ); o eixo AGE-RAGE, que suprime a renovação do colágeno através da reticulação anormal de colágeno. A hiperinsulinemia é outro fator que prejudica a diferenciação das células progenitoras dos fibroblastos e a desregulação da degradação da matriz extracelular devido à hiperglicemia <sup>67</sup>. Funcionalmente, há hiperfiltração glomerular precoce e aumento da excreção de albumina; e com nefropatia avançada, aumento da proteinúria <sup>16</sup>. Esses dados sugerem que nossos animais estão em um estágio mais avançado da doença devido ao aumento da deposição de colágeno tubulointersticial, bem como ao aumento dos níveis de proteinúria. E o novo composto foi capaz de reverter tanto o fator funcional quanto a expansão mesangial de ratos diabéticos. Um possível mecanismo de ação, a redução da hiperglicemia é acompanhada por uma diminuição do estresse oxidativo com a

diminuição das Espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos mostraram que o bloqueio da formação de EROs está relacionado a benefícios na função renal, impedindo a progressão da ND <sup>24,67,28</sup>.

Na ação cardiovascular, o LASSBio-2124 foi capaz de reverter a pressão sistólica e diastólica, corroborando com estudos prévios onde demonstraram com o uso de um inibidor DPP-4 uma proteção cardiovascular em estudos pré-clínicos de roedores e suínos normoglicêmicos e diabéticos, e reduções na pressão arterial, marcadores lipídicos pós-prandiais de inflamação e estresse oxidativo em estudos clínicos <sup>38,47,68</sup>.

O novo composto reverteu o remodelamento miocárdico e a resposta da sitagliptina utilizada na dose de 10 mg / Kg no presente estudo apresentou resposta semelhante ao estudo anterior que utilizou doses mais elevadas desse fármaco, 30 e 50 mg / kg <sup>69</sup>. Segundo outros estudos com pacientes com DM2, a inibição da DPP4 com o uso das gliptinas pode diminuir o risco de insuficiência cardíaca e outros eventos cardiovasculares adversos <sup>70-72</sup>. Estudo recente demonstrou que a sinalização insulínica é responsável pela energética, estrutura, função e sobrevivência do miocárdio <sup>73</sup>. De acordo com o descrito, o estudo com camundongos com deleção específica do coração dos genes IRS-1 e IRS-2 desenvolveu cardiomiopatia dilatada e morreram de insuficiência cardíaca com 6 a 9 semanas de idade <sup>74</sup>. A perda desta homeostase na presença de hiperglicemia, hiperlipidemia e resistência à insulina no diabetes causa geração de EROs, ativação de células endoteliais e inflamação cardíaca, leva à deficiência energética cardíaca, disfunção mitocondrial, dano estrutural do miocárdio, podendo evoluir para uma função cardíaca prejudicada <sup>67</sup>. A reversão do remodelamento cardíaco após o tratamento com LASSBio-2124 deve-se ao restabelecimento da homeostase nesses animais, devido à diminuição da glicemia e melhora da resistência à insulina, sendo este um dos prováveis mecanismos, além da hipótese de uma atuação direta nos cardiomiócitos, ativando vias de sinalização que seriam protetoras e essenciais para a sobrevivência / recuperação dessas células. Porém mais estudo seriam necessários para confirmação da atuação deste composto nessas vias, além da determinação de quais seriam as vias envolvidas.

O novo composto pode melhorar a função diastólica do ventrículo esquerdo em ratos diabéticos, reduzindo E máximo e pressão de enchimento (E / e'). Além do novo composto, promover redução da hemodinâmica intracavitária esquerda expressa pela pressão sistólica ventricular e pressão diastólica final, corroborando com Connelly e cols.<sup>75</sup>. Assim, o novo composto pode desempenhar um papel essencial na cardiomiopatia diabética, melhorando a disfunção diastólica.

O efeito benéfico dos fatores hemodinâmicos do LASSBio-2124 sugerimos estar relacionado com a diminuição dos níveis circulantes da glicemia e dos ácidos graxos, diminuindo a produção e biodisponibilidade de ROS melhorando a contratilidade cardíaca ao mesmo tempo que promove um aumento da sensibilidade das vias induzidas pela insulina como PI3K/Akt e diminuição da via ERK / MAPK, promovendo uma maior produção de NO e diminuindo o estresse oxidativo celular. A diminuição da glicemia também está relacionada com a diminuição da atividade de NFAT, responsável pela transcrição de genes da osteopontina, MCP-1, ICAM-1 e IL-6 que promovem aterosclerose, hipertrofia, fibrose e por fim, insuficiência cardíaca <sup>27,76</sup>.

Em comparação com outras formas de disfunção cardíaca, o coração diabético é particularmente suscetível ao remodelamento da matriz extracelular (MEC), levando ao comprometimento característico do relaxamento miocárdico <sup>77</sup>. A ação da sitagliptina confere efeito aditivo ao composto, uma vez que as duas terapias agem por mecanismos diferentes para melhorar a resistência à insulina, o que implica um provável efeito cardioprotetor melhor do que em relação à sitagliptina. Esses achados são consensos com estudos clínicos de Fujiwara e cols. <sup>78</sup>, onde concluíram que os inibidores da DPP4 melhoraram a função diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes com DM que apresentavam IM. O aumento da tensão na matriz extracelular, é um sinal para aumentar a produção local de citocinas no coração (principalmente TNF-alfa), que acelera o processo de fibrose, o que leva à disfunção cardíaca <sup>77</sup>.

No contexto da diabetes, a disfunção sistólica do VE geralmente ocorre subsequente à disfunção diastólica, como indicado pelo comprometimento do desempenho contrátil e da dilatação da câmara. As características da insuficiência cardíaca também se tornam aparentes,

incluindo aumento do VE e afinamento da parede, bem como diminuição do débito cardíaco <sup>77</sup>. Estes dados sugerem que nosso modelo pode estar em fase compensatória de cardiomiopatia diabética, apresentando uma fração de ejeção ainda preservada. Nossa hipótese é que prolongando o tempo de doença desses animais, eles podem vir a desenvolver a insuficiência cardíaca.

A avaliação histológica dos tecidos cardíacos dos animais diabéticos mostrou um aumento na deposição de colágeno de acordo com estudos anteriores que mostraram aumento da fibrose miocárdica com aumento da deposição de colágeno tipo I e III nas regiões intersticial e perivascular de ambos os ventrículos <sup>79</sup>. Além disso, a extensão da fibrose correlaciona-se com o peso do coração <sup>80</sup>, o que corrobora com nossos dados. A fibrose cardíaca e o relaxamento cardíaco prejudicado são considerados uma consequência de anormalidades na sinalização e estrutura da MEC na cardiomiopatia diabética, devido ao aumento da deposição de proteínas da MEC <sup>77</sup>. O aumento desta deposição e redução da atividade de enzimas que a degradam, contribui para aumentar a rigidez miocárdica e promover a dilatação da câmara cardíaca secundária ao deslizamento do miócito <sup>81</sup>. Estudo anterior demonstrou que a sitagliptina foi capaz de promover o efeito antifibrótico em cultura de células cardíacas. O efeito pode ser relacionado com o aumento da intensidade do tempo de meia vida do GLP-1 <sup>82</sup>, corroborando com o nosso resultado. A ativação de p38 no coração por hiperinsulinemia ou outros estresses metabólicos promove degradação de IRS1 e IRS2 e desregula o metabolismo de glicose e lipídios cardíacos, biogênese mitocondrial, manipulação de cálcio, fibrose e expressão de genes motores, resultando em insuficiência cardíaca <sup>74</sup>. Sendo um dos possíveis mecanismos de um mau prognóstico cardíaco. Em um estudo recente relataram que o TNF- $\alpha$  induz a apoptose de cardiomiócitos aumentando a fosforilação da p38 <sup>83</sup>. Com tratamento LASSBio-2124 não apresentou recuperação deste parâmetro, o que poderia ser um indicativo que o novo composto não atuaria por esta via, tendo mecanismos outros na cardioproteção, como ativação da via de cinases ligada a injúria / reperfusão no qual uma das vias inibidas são da Caspase-3, devido ao aumento da meia vida da GLP-1 e sua atuação direta nos cardiomiócitos através da sitagliptina.

No teste de reatividade vascular, o grupo tratado com o composto demonstrou maior responsividade da ACh com eficácia e potência semelhante à sitagliptina. Em um estudo com cultura de células endoteliais, o aumento da ativação de Akt-eNOS pela inibição da DPP-4 induziu a liberação de NO <sup>84</sup>, o que sugere uma regulação do tônus vascular da sitagliptina através da ação do sistema NO e um efeito aditivo anti-inflamatório do composto. Esses resultados podem ser extrapolados para o endotélio da microvasculatura, favorecendo a diminuição da resistência vascular periférica (RVP), refletido na diminuição das PAS, PAD e PAM.

O aumento do PLB em animais diabéticos sugere que a captação de Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático é reduzida, o que contribui para a sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>. Consequentemente, a menor liberação de Ca<sup>2+</sup> reduz o desenvolvimento de força. O reverção com o novo composto aumenta a força contrátil, melhorando a hemodinâmica em corações de ratos com disfunção diastólica do VE. Na ativação de cardiomiócitos por distúrbios metabólicos causa disfunção mitocondrial, que leva a: 1 estresse oxidativo resultando em sinalização de insulina prejudicada e 2 estresse do retículo endoplasmático que leva à manipulação anormal de Ca<sup>2+</sup> e morte e rigidez de cardiomiócitos culminando em cardiomiopatia diabética <sup>17</sup>. A atividade aumentada de GLP-1 devido a sitagliptina, ativaria a via de sinalização eNOS / cGMP / PKG e inibição das vias Ca<sup>2+</sup> / calmodulina-dependente quinase II (CaMKII) <sup>85</sup>, indicando um dos possíveis mecanismos de ação da cardioproteção.

Inflamação é um fator fisiopatológico chave na cardiomiopatia diabética <sup>69</sup> e um efeito anti-inflamatório é esperado do novo composto por parte da molécula contendo LASSBio-1772. O TNF- $\alpha$  está envolvido na disfunção endotelial, corrompendo a homeostase vascular <sup>86</sup> já que aumentam a apoptose e o estresse oxidativo em cardiomiócitos <sup>83</sup>. O tratamento com o novo composto foi capaz de reverter o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em comparação com animais diabéticos. E um dos reflexos pode ser a reversão do remodelamento cardíaco adverso e melhora na resposta vascular.

De acordo com o resultado anterior, onde foi observada uma diminuição na expressão de TNF- $\alpha$ , o novo composto mostrou reversão na caspase-3 ativa, uma proteína que desempenha um papel central na fase de execução da

apoptose celular <sup>87</sup>. Em estudo prévio, Ravassa et al.<sup>88</sup> demonstraram uma cardioproteção através dos efeitos da incretina GLP-1 através da ativação da sinalização da via de cinases de injúria / reperfusão (RISK), que possui ação anti-apoptótica e anti-necrótica, culminando em sobrevida e melhora da função cardíaca.

A fibrose cardíaca é presumivelmente semelhante ao mecanismo observado na nefropatia diabética <sup>67</sup>, então, um dos fatores é o eixo AGE-RAGE. Em animais diabéticos, a expressão de RAGE aumentou e ambos os tratamentos reverteram. A expressão de receptores para a via do AGE (*Advanced end of glycation end product*) ativa a remodelação da matriz extracelular e a fibrose miocárdica pelo aumento dos níveis de estresse oxidativo. A sinalização AGE / RAGE causa a ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular envolvendo NADPH oxidase, proteína C quinase e MAPKs, resultando em aumento da atividade de NF-kappa B. E finalmente a expressão de receptores para o AGE ligado ao estresse oxidativo <sup>5,28,77,89</sup>. Em última análise, o acúmulo de fibrose miocárdica inevitavelmente leva à disfunção cardíaca <sup>77</sup>. Esta informação sugere que o novo protótipo também pode estar atuando através de um mecanismo anti-oxidante direto ou devido à sua ação anti-hiperglicêmica inibindo a cascata de danos e melhorando o remodelamento adverso no miocárdio de ratos diabéticos. Mais estudos são necessários para elucidar essas questões. Porém diante dos resultados obtidos e do conhecimento atual da fisiopatologia das disfunções do DM2 propõe-se que o possível mecanismo de ação do novo composto LASSBio-2124 está em aumentar a atividade da via PI3K/Akt mediante ação direta sobre a enzima ou indiretamente ativando fatores que aumentam a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de açúcares e ácidos graxos. Os efeitos observados também são semelhantes aos ativadores da AMPK como a metformina, que também ativam a via PI3K/Akt. Além de um efeito adicional anti-inflamatório por parte do LASSBio-1772 por possível modulação do TNF- $\alpha$ .

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, etc. Estas condições

de alguma forma criam um micro ambiente vascular com caráter inflamatório ocasionado pela exposição crônica a hiperglicemia e aumento de ROS. Estudos apontam que a melhora do prognóstico e da qualidade de vida está em um manejo racional associado a terapia intensiva com hipoglicemiantes enterais e parenterais acompanhado de terapia anti-inflamatória, antidislipidêmica, anti-hipertensiva, inibição do SRAA, refletido na diminuição da incidência das complicações associadas e melhoras do prognóstico e qualidade de vida. Diante do atual panorama do DM é imprescindível e indispensável o desenvolvimento de novas moléculas antidiabéticas com efeitos duais que possam atuar benéficamente não pelo seu efeito anti-hiperglicêmico apenas, mas também com um efeito secundário, diminuindo, por exemplo, a atividade das vias pró-inflamatórias que se encontram superativadas no DM, resultando em uma diminuição das vias de sinalização tróficas dos componentes celulares como TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, MAPK/ERK, protegendo principalmente os tecidos mais afetados como coração, rins e componentes do SNC.

## 6 CONCLUSÕES

Em relação ao novo protótipo sintetizado, conforme resultados obtidos in vivo, podemos concluir que LASSBio-2124, apresentou:

- redução de distúrbios metabólicos e efeito anti-hiperglicêmico;
- melhora:
  - função e estrutura glomerular
  - disfunção ventricular
  - disfunção vascular e
- atuação através de uma possível ação protetora cardiorenal por evitar as comorbidades relacionadas ao diabetes tipo 2.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Roglic G., Unwin N., Bennett P.H., Mathers C., Tuomilehto J., Nag S., Connolly V. KH. The Burden of Mortality Attributable to diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(9).
2. Zimmet P, Alberti K, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414(December 2001). <http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/abs/414782a.html>. Accessed October 27, 2014.
3. Resnick H, Howard B. Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*. 2002;53:245-267. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.53.082901.103904>. Accessed October 28, 2014.
4. Bunner AE, Chandrasekera PC, Barnard ND. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World J Diabetes*. 2014;5(2):146-159. doi:10.4239/wjd.v5.i2.146.
5. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21525-21550. doi:10.3390/ijms141121525.
6. Palsson R, Patel UD. Cardiovascular Complications of Diabetic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2015;21(3):273-280. doi:10.1053/j.ackd.2014.03.003.Cardiovascular.
7. Green JB, Bethel MA, Paul SK, 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. *Am Heart J*. 2013;166(6):983-989.e7. doi:10.1016/j.ahj.2013.09.003.
8. Koo BK, Lee C-H, Yang BR, Hwang S-S, Choi N-K. The incidence and prevalence of diabetes mellitus and related atherosclerotic complications in Korea: a national health insurance database study. *PLoS One*. 2014;9(10):e110650. doi:10.1371/journal.pone.0110650.

9. Saely CH, Drexel H. Is type 2 diabetes really a coronary heart disease risk equivalent? *Vascul Pharmacol.* 2013;59(1-2):11-18. doi:10.1016/j.vph.2013.05.003.
10. Nag S, Bilous R, Kelly W, Jones S, Roper N, Connolly V. 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. *Diabet Med.* 2007;24(1):10-17. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02023.x.
11. Coll-De-Tuero G, Mata-Cases M, Rodriguez-Poncelas A, 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 Nephrol.* 2012;13(1). doi:10.1186/1471-2369-13-87.
12. Saltiel A, Kahn C. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(December):799-806. <http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/abs/414799a.html>. Accessed October 28, 2014.
13. Anhê GF, Hirabara SM, Turrer TC, et al. Postpartum glycemic homeostasis in early lactating rats is accompanied by transient and specific increase of soleus insulin response through IRS2/AKT pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(6):R2225-33. doi:10.1152/ajpregu.00902.2006.
14. Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Häring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(12):721-737. doi:10.1038/nrneph.2016.145.
15. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852-871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.
16. Lim AK. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014;7:361-381. doi:10.2147/IJNRD.S40172.
17. Jia G, Demarco VG, Sowers JR, Drive OH. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. 2016;12(3):144-153.

doi:10.1038/nrendo.2015.216.Insulin.

18. Cruz NG, Sousa LP, Sousa MO, Pietrani NT, Fernandes AP, Gomes KB. The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013;99(2):85-92. doi:10.1016/j.diabres.2012.09.003.
19. Teixeira BC, Lopes AL, Macedo ROC, et al. Marcadores inflamatórios , função endotelial e riscos cardiovasculares. *J Vasc Bras.* 2013;13(2):108-115.
20. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107. doi:10.1038/nri2925.
21. Wang X, Bao W, Liu J, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* 2013;36(1):166-175. doi:10.2337/dc12-0702.
22. Bahia L, Aguiar LGK De, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):291-303. doi:10.1590/S0004-27302006000200015.
23. Xu J, Zou M. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation.* 2009;120(13):1266-1286. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.835223.Molecular.
24. Arora MK, Singh UK. Oxidative Stress : Meeting Multiple Targets in Pathogenesis of Diabetic Nephropathy Polyol Pathway Glucose. *Curr Drug Targets.* 2014;15:531-538.
25. Matsuda M, Shimomura I. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(1):1-10. doi:10.1007/s11154-013-9271-7.
26. Wautier J, Schmidt A. Protein glycation a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res.* 2004;95(1524-4571):233-238. <http://circres.ahajournals.org/content/95/3/233.short>. Accessed October 29, 2014.
27. Yan L. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res.* 2014;2014. <http://downloads.hindawi.com/journals/jdr/aip/137919.pdf>. Accessed

November 18, 2014.

28. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-1070. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
29. Eisma JH, Dulle JE, Fort PE. Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues. *World J Diabetes.* 2015;6(2):312-320. doi:10.4239/wjd.v6.i2.312.
30. Maddahi A, Chen Q, Edvinsson L. 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 Neurosci.* 2009;10:56. doi:10.1186/1471-2202-10-56.
31. Cheung CY, Ikram MK. The clinical implications of recent studies on the structure and function of the retinal microvasculature in diabetes. 2015. doi:10.1007/s00125-015-3511-1.
32. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci.* 2013;124(3):139-152. doi:10.1042/CS20120198.
33. Nishida K, Otsu K. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2017;113(4):389-398. doi:10.1093/cvr/cvx012.
34. Reis F, Nunes S, Soares, Pereira F. The role of inflammation in diabetic cardiomyopathy. *Int J Interf Cytokine Mediat Res.* 2012;Volume 4:59. doi:10.2147/IJICMR.S21679.
35. Sun M, Dawood F, Wen WH, et al. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2004;110(20):3221-3228. doi:10.1161/01.CIR.0000147233.10318.23.
36. Singh AK. Deciding oral drugs after metformin in type 2 diabetes: An evidence-based approach. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014;18(5):617-623. doi:10.4103/2230-8210.139214.
37. Tomkin GH. Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors. *World J Diabetes.* 2014;5(5):636-650. doi:10.4239/wjd.v5.i5.636.

38. Triggler CR, Ding H. Cardiovascular impact of drugs used in the treatment of diabetes. *Ther Adv Chronic Dis.* 2014;5(6):245-268. doi:10.1177/2040622314546125.
39. Holman RR, Sourij H, Califf RM. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering drugs or strategies in type 2 diabetes. *Lancet.* 2014;383(9933):2008-2017. doi:10.1016/S0140-6736(14)60794-7.
40. Hinnen D, Nielsen L. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes. *J ....* 2006;19(6):12-14. <http://www.jabfm.org/content/19/6/612.short>. Accessed October 30, 2014.
41. Sato Y, Koshioka S, Kirino Y, et al. Role of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) in the development of dyslipidemia: DPP4 contributes to the steroid metabolism pathway. *Life Sci.* 2011;88(1-2):43-49. doi:10.1016/j.lfs.2010.10.019.
42. Avogaro A, Kreutzenberg S, Fadini G. Dipeptidyl-peptidase 4 Inhibition: Linking Metabolic Control to Cardiovascular Protection. *Curr Pharm Des.* 2014;20(14):2387-2394. doi:10.2174/13816128113199990474.
43. Holst J, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol ....* 2004. <http://ajpendo.physiology.org/content/287/2/E199.short>. Accessed November 18, 2014.
44. Pala L, Rotella CM. The role of DPP4 activity in cardiovascular districts: in vivo and in vitro evidence. *J Diabetes Res.* January 2013:590456. doi:10.1155/2013/590456.
45. 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. *J Endocrinol.* 2009;200(1):53-61. doi:10.1677/JOE-08-0424.
46. Inzucchi SE, McGuire DK. New drugs for the treatment of diabetes: part II: Incretin-based therapy and beyond. *Circulation.* 2008;117(4):574-584. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.735795.

47. Ussher JR, Drucker DJ. Cardiovascular actions of incretin-based therapies. *Circ Res.* 2014;114(11):1788-1803. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301958.
48. Santos L, Salles T a, Arruda-Junior DF, et al. Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure. *Circ Heart Fail.* 2013;6(5):1029-1038. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000057.
49. Costa FP. Novos candidatos a protótipos de fármacos hipoglicemiantes com atividade anti-inflamatória : LASSBio-1773 e LASSBio-1774 Novos candidatos a protótipos de fármacos hipoglicemiantes com atividade anti-inflamatória : LA. 2013.
50. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 2017;18(1):529. doi:10.1186/s12859-017-1934-z.
51. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.
52. Portella VG, Silva-Filho JL, Landgraf SS, et al. Sepsis-surviving mice are more susceptible to a secondary kidney insult. *Crit Care Med.* 2013;41(4):1056-1068. doi:10.1097/CCM.0b013e3182746696.
53. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2012;82(2):172-183. doi:10.1038/ki.2012.20.
54. Landgraf SS, Silva LS, Peruchetti DB, et al. 5-Lipoxygenase products are involved in renal tubulointerstitial injury induced by albumin overload in proximal tubules in mice. *PLoS One.* 2014;9(10):e107549. doi:10.1371/journal.pone.0107549.
55. Frazier KS, Seely JC, Hard GC, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. *Toxicol Pathol.* 2012;40(4 Suppl):14S-86S. doi:10.1177/0192623312438736.
56. Gomes CLR, Leão CL, Venturotti C, 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(9):e106929. doi:10.1371/journal.pone.0106929.
57. Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(3):283-307. doi:10.1517/13543784.2015.974804.
  58. Navab M, Gharavi N, Watson AD. Inflammation and metabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008. doi:10.1097/MCO.0b013e32830460c2.
  59. 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.
  60. Hwang J, Wu T, Chou SC, et al. Development of Multiple Complications in Type 2 Diabetes Is Associated With the Increase of Multiple Markers of Chronic Inflammation. 2008;13(August 2007):6-13. doi:10.1002/jcla.
  61. Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr Rev*. 2014;35(6):992-1019. doi:10.1210/er.2014-1035.
  62. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, 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 atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
  63. Saad MI, Kamel MA, Hanafi MY. Modulation of adipocytokines production and serum NEFA level by metformin, glimepiride, and sitagliptin in HFD/STZ diabetic rats. *Biochem Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/138134.

64. Mansor LS, Gonzalez ER, Cole M a, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):136. doi:10.1186/1475-2840-12-136.
65. Cobble M. Differentiating among incretin-based therapies in the management of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):8. doi:10.1186/1758-5996-4-8.
66. Lopes-Virella MF, Virella G. The role of immunity and inflammation in the development of diabetic complications. *Diabetol Int*. 2013;4(1):1-8. doi:10.1007/s13340-013-0105-3.
67. Yasuko K. Bando; Toyoaki Murohara. Diabetes-Related Heart Failure –. *Circ J*. 2014.
68. 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. *Int J Cardiol*. 2013;168(6):5390-5395. doi:10.1016/j.ijcard.2013.08.051.
69. Liu YS, Huang ZW, Wang L, et al. Sitagliptin alleviated myocardial remodeling of the left ventricle and improved cardiac diastolic dysfunction in diabetic rats. *J Pharmacol Sci*. 2015;127(3):260-274. doi:10.1016/j.jphs.2014.12.007.
70. Patil HR, Al Badarin FJ, Al Shami HA, et al. Meta-analysis of effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2012;110(6):826-833. doi:10.1016/j.amjcard.2012.04.061.
71. Ravassa S, Barba J, Coma-Canella I, et al. The activity of circulating dipeptidyl peptidase-4 is associated with subclinical left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):1-11. doi:10.1186/1475-2840-12-143.
72. Monami M, Ahrén B, Dicembrini I, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, Obes Metab*. 2013;15(2):112-120.

doi:10.1111/dom.12000.

73. Guo CA, Guo S. Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure. 2017. doi:10.1530/JOE-16-0679.
74. Qi Y, Xu Z, Zhu Q, et al. Myocardial Loss of IRS1 and IRS2 Causes Heart Failure and Is Controlled by p38 a MAPK During Insulin Resistance. 2013;62(November):3887-3900. doi:10.2337/db13-0095.
75. Connelly KA, Zhang Y, Advani A, et al. DPP-4 inhibition attenuates cardiac dysfunction and adverse remodeling following myocardial infarction in rats with experimental diabetes. *Cardiovasc Ther.* 2013;31(5):259-267. doi:10.1111/1755-5922.12005.
76. van den Oever I a M, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:792393. doi:10.1155/2010/792393.
77. Tate M, Grieve DJ, Ritchie RH. Are targeted therapies for diabetic cardiomyopathy on the horizon? 2017;(February):897-915. doi:10.1042/CS20160491.
78. Fujiwara T, Yoshida M, Nakamura T, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors are associated with improved left ventricular diastolic function after acute myocardial infarction in diabetic patients. *Heart Vessels.* 2015;30(5):696-701. doi:10.1007/s00380-014-0509-4.
79. Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, et al. Nuclear Targetin of Akt Enhances Kinase Activity and Survival of Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2004;94(7):884-891. doi:10.1161/01.RES.0000124394.01180.BE.
80. Guo S, Dunn SL, White MF. The Reciprocal Stability of FOXO1 and IRS2 Creates a Regulatory Circuit that Controls Insulin Signaling. *Mol Endocrinol.* 2006;20(12):3389-3399. doi:10.1210/me.2006-0092.
81. PPARs as therapeutic targets in cardiovascular disease.
82. Picatoste B, Ramirez E, Caro-Vadillo A, 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.

83. Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK. IL-10 attenuates TNF- $\alpha$ -induced NF $\kappa$ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2009;82(1):59-66. doi:10.1093/cvr/cvp040.
84. Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: Beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol.* 2011;55(1-3):10-16. doi:10.1016/j.vph.2011.05.001.
85. Chen J, Wang D, Wang F, et al. Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca<sup>2+</sup>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.
86. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(5):398-406. doi:10.1007/s00395-008-0733-0.
87. Woo M, Hakem R, Soengas MS, et al. Essential contribution of caspase 3/CPPp32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 1998;12(6):806-819. doi:10.1101/gad.12.6.806.
88. Ravassa S, Zudaire A, Díez J. GLP-1 and cardioprotection: From bench to bedside. *Cardiovasc Res.* 2012;94(2):316-323. doi:10.1093/cvr/cvs123.
89. Goldin A, Beckman J a., Schmidt AM, Creager M a. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114(6):597-605. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.