



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**MARINA SOFIA RODRIGUES DOS REIS**

***INIBIDORES DA DPP-4: UMA ESPERANÇA NA NEFROPATIA DIABÉTICA?***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DA  
PROFESSORA DOUTORA MARIA LEONOR VIEGAS GOMES**

**MARÇO/2015**

# **Inibidores da DPP-4: Uma esperança na Nefropatia Diabética?**

**Artigo de revisão**

Marina Sofia Rodrigues dos Reis

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Autor correspondente:

Marina Sofia Rodrigues dos Reis

Rua Dr. Clemente de Carvalho, 296

3220-232 Miranda do Corvo

Número de aluno: 2009017003

Endereço de correio eletrónico: [marina.reis9@gmail.com](mailto:marina.reis9@gmail.com)

## ❖ ÍNDICE

Resumo.....	5
Abstract .....	7
Introdução.....	9
Materiais e métodos .....	11
Desenvolvimento.....	12
<b>1. Nefropatia diabética: aspetos fisiopatológicos e classificação.....</b>	<b>12</b>
1.1. Fisiopatologia.....	12
1.2. Histologia.....	17
1.3. Classificação .....	17
<b>2. Tratamento atual e novas perspetivas.....</b>	<b>18</b>
<b>3. As incretinas.....</b>	<b>20</b>
3.1. GLP-1 .....	21
3.2. GIP .....	22
3.3. DPP-4.....	22
3.4. Recetor GLP-1 .....	23
<b>4. Papel das incretinas na Diabetes Mellitus.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Eixo entero-renal .....</b>	<b>24</b>
5.1. Recetor GLP-1 .....	25
5.2. GLP-1 e SRAA .....	26
5.3. DPP-4.....	26
<b>6. Inibidores DPP-4 .....</b>	<b>27</b>

<b>7. Efeitos pleiotrópicos dos inibidores DPP-4 .....</b>	<b>28</b>
7.1. Efeitos dependentes das incretinas.....	29
7.1.1. Pâncreas .....	29
7.1.2. Sistema Cardiovascular.....	29
7.1.3. Pressão arterial .....	29
7.1.4. Fígado .....	30
7.1.5. Sistema Nervoso Central.....	30
7.1.6. Osso.....	30
7.2. Efeitos independentes das incretinas.....	31
<b>8. Inibidores DPP-4: Proteção renal na Nefropatia Diabética? .....</b>	<b>32</b>
8.1. Efeitos dependentes de GLP-1 .....	32
8.2. Efeitos independentes de GLP-1 .....	33
8.2.1. SDF-1 $\alpha$ .....	33
8.2.2. HMGB1.....	33
8.2.3. Meprina $\beta$ .....	34
8.2.4. NPY e PYY .....	34
<b>9. Inibidores DPP-4 e Nefropatia diabética: Estudos Pré-clínicos e Clínicos .....</b>	<b>35</b>
9.1. Sitagliptina .....	35
9.2. Vildagliptina.....	37
9.3. Linagliptina .....	38
9.4. Saxagliptina.....	39
<b>10. Inibidores DPP-4 e outras complicações microvasculares .....</b>	<b>40</b>
10.1. Retinopatia Diabética.....	40
10.2. Neuropatia Diabética.....	41

Discussão e Conclusão .....	43
Agradecimentos.....	46
Referências .....	47
Anexos.....	57

## ❖ ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1:** Classificação da Nefropatia Diabética ..... 18

**Tabela 2:** Inibidores DPP-4 ..... 28

**Tabela 3:** Inibidores DPP-4 nas complicações da DM: estudos pré-clínicos e clínicos 42

## ❖ ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Patogénese da Nefropatia Diabética ..... 16

## ❖ RESUMO

Em Portugal, a nefropatia diabética é a principal causa de doença renal em estágio terminal. A terapêutica atual para esta complicação da diabetes mellitus tem-se revelado insatisfatória, pois apenas atrasa a progressão da doença, não impedindo que os doentes percam a função renal a longo prazo. Por este motivo, é necessário procurar novas terapêuticas que interfiram na patogenia da nefropatia de forma a minorar o dano renal, ou até a preveni-lo.

Neste sentido, efetuou-se uma revisão da literatura de forma a compreender em que medida é que os inibidores da DPP-4 podem contribuir para a terapêutica da nefropatia diabética. Com este trabalho, procurou compreender-se o mecanismo fisiopatológico pelo qual estes fármacos podem ter um efeito renoprotetor, tentando perceber quais são os efeitos dependentes do aumento da concentração de GLP-1 e quais os efeitos dependentes da ação de outros peptídeos.

A evidência atual indica que um estado de microinflamação está envolvido na patogénese da nefropatia diabética. Várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento têm sido associadas ao desenvolvimento das principais características histológicas desta patologia: hipertrofia glomerular, espessamento da membrana basal glomerular e expansão da matriz extracelular que é posteriormente substituída por tecido fibrótico. Esta descoberta, conduziu à procura de novos alvos terapêuticos que possam interferir diretamente na patogénese da nefropatia diabética, impedindo de uma forma direta a progressão da patologia renal, independentemente do controlo glicémico e da pressão arterial. Uma das classes de fármacos que pode ter interesse nesta nova abordagem, são os inibidores DPP-4. Sabe-se que a enzima DPP-4 para além de aumentar os níveis de incretinas, também é importante na clivagem de vários peptídeos vasoativos. Entre as moléculas investigadas, o SDF-1 $\alpha$ , a

meprina  $\beta$ , e o HMGB1 parecem ser os peptídeos com maior potencial para serem alvos terapêuticos no futuro.

Vários estudos pré-clínicos têm sido realizados para avaliar o efeito dos inibidores da DPP-4 na nefropatia diabética, avaliando o impacto da terapêutica nos marcadores de doença renal. No entanto, o resultado destes estudos deve ser interpretado com alguma cautela, pois em alguns casos, os parâmetros metabólicos, como a glicemia e a pressão arterial também melhoraram. Os estudos clínicos realizados ainda são escassos e muitas vezes não foram planejados para compreender especificamente qual é o efeito dos inibidores DPP-4 a nível renal.

Por este motivo, os inibidores da DPP-4 como uma alternativa que ofereça proteção renal em doentes diabéticos, surge apenas como uma possibilidade. Apesar da evidência atual indicar um potencial renoprotetor que pode ter muito interesse e revolucionar a terapêutica da diabetes, há necessidade de realizar mais estudos.

**Palavras-chave:** nefropatia diabética; inibidores da DPP-4, renoproteção; incretinas; stress oxidativo; complicações microvasculares; diabetes mellitus.



## ❖ ABSTRACT

In Portugal, diabetic nephropathy is the main cause of end-stage renal disease. The current treatment for this complication of diabetes mellitus has proved unsatisfactory because it only delays disease progression and do not prevent the long-term loss of renal function. Therefore, it is necessary to look for new therapies that interfere in the pathogenesis of diabetic nephropathy, in order to lessen the kidney damage or even prevent it.

With this in mind, was carried out a literature review in order to understand to which extent DPP-4 inhibitors may contribute for the therapy of diabetic nephropathy. This study sought to understand the pathophysiological mechanism by which these drugs may have a renoprotective effect, trying to understand which effects are dependent of increased GLP-1 concentration and which effects are dependent upon the action of other peptides.

Current evidence indicates that a state of microinflammation is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Several cytokines and growth factors have been associated with major histological features of this pathology: glomerular hypertrophy, glomerular basement membrane thickening and extracellular matrix expansion which is subsequently replaced by fibrotic tissue. This finding has led to the search for new therapeutic targets that may interfere directly in the pathogenesis of diabetic nephropathy in a straightforward manner, preventing the progression of renal pathology regardless of glycemic and blood pressure control. One class of drugs that may be interesting for this new approach are DPP-4 inhibitors. It is known that the enzyme DPP-4 in addition to increasing incretin levels is also important in the cleavage of various vasoactive peptides. Among the investigated molecules, SDF-1 $\alpha$ , the  $\beta$  meprin and HMGB1 seems to be the ones with the most potential to be drug targets in the future.

Several pre-clinical studies have been conducted to evaluate the effect of DPP-4 inhibitors on diabetic nephropathy by assessing the impact of therapy in the markers of renal disease. However, the results of these studies should be interpreted with caution since, in some cases, metabolic parameters such as blood sugar and blood pressure also improved. Clinical studies are scarce and often were not planned to specifically understand what is the effect of DPP-4 inhibitors in the kidney.

For this reason, DPP-4 inhibitors as an alternative to providing renal protection in diabetic patients, arises only as a possibility. Although the current evidence point to a renoprotector potential, there is need for further studies.

**Key words:** diabetic nephropathy; DPP-4 inhibitors; renoprotection; incretins; oxidative stress; microvascular complications; diabetes mellitus.

## ❖ INTRODUÇÃO

A prevalência da diabetes mellitus tem vindo a aumentar a nível mundial, sendo considerada uma das epidemias do século XXI.<sup>1</sup> Dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que atualmente 387 milhões de pessoas vivem com a doença.<sup>[1]</sup> Em Portugal, o Observatório Nacional da Diabetes admite uma prevalência de 13%, verificando-se uma diferença estatisticamente significativa entre o género masculino (15,6%) e feminino (10,7%).<sup>2</sup>

A evolução da diabetes está associada ao desenvolvimento de complicações vasculares que, para além de serem uma causa importante de morbilidade, são responsáveis pela diminuição da esperança de vida das pessoas com diabetes.<sup>2, 3</sup> As complicações macrovasculares, como a doença arterial coronária, doença arterial periférica e acidentes vasculares, afetam vasos de maior calibre e estão relacionadas com a aterosclerose.<sup>3</sup> As principais complicações microvasculares são a nefropatia diabética, a retinopatia diabética e a neuropatia diabética e resultam do efeito lesivo da hiperglicémia nos capilares.<sup>3,4</sup>

A nefropatia diabética é a principal causa de doença renal crónica em estágio terminal, em Portugal.<sup>5</sup> Atualmente sabe-se que a disfunção dos vários tipos de células renais origina falência renal progressiva e é induzida pela hiperglicémia crónica.<sup>6</sup> O desenvolvimento de nefropatia diabética está associado a um mau prognóstico<sup>7</sup> e a custos económicos elevados para os sistemas de saúde.<sup>1</sup> O tratamento baseia-se no controlo intensivo dos fatores de risco, nomeadamente da glicémia e pressão arterial. Os fármacos de primeira linha utilizados são os inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que apesar de contribuírem para um atraso na progressão da doença, não impedem o seu desenvolvimento.<sup>8</sup> Por este motivo, torna-se importante procurar novas terapêuticas que permitam não só minorar o dano renal, como preveni-lo.

Nos últimos anos, as terapias baseadas em incretinas têm mostrado possuir efeitos protetores em múltiplos órgãos, que vão para além do controlo glicémico.<sup>3, 4, 9, 10</sup> Os inibidores da enzima *Dipeptidyl Peptidase* (DPP-4) aumentam a semivida das incretinas *Glucagon-like peptide 1* (GLP-1) e *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP), permitindo um controlo glicémico eficaz associado a uma boa tolerabilidade.<sup>[10, 11]</sup> A evidência atual sugere que esta enzima também interage com outros peptídeos que possuem propriedades vasoativas e anti-inflamatórias.<sup>10, 12, 13</sup> Com esta descoberta, surgiu a hipótese da utilização destes fármacos diretamente no tratamento das complicações vasculares da diabetes, independentemente do seu efeito no controlo glicémico.

Com a realização deste artigo de revisão, pretende-se compreender em que medida é que os inibidores da DPP-4 podem constituir também uma terapêutica para a nefropatia diabética. Pretende-se ainda compreender o mecanismo fisiopatológico pelo qual estes fármacos podem ter um efeito renoprotetor, tentando compreender quais são os efeitos dependentes do aumento da concentração de GLP-1 e quais os efeitos dependentes da ação de outros peptídeos.

## ❖ MATERIAIS E MÉTODOS

Na elaboração deste trabalho de revisão, foram consultados artigos científicos e artigos científicos de revisão, obtidos através de pesquisa na base de dados PubMed. Os termos utilizados foram “diabetic nephropathy”, “GLP-1”, “incretins”, “DPP-4 inhibitors”, “renoprotection”, em separado e em várias combinações. Limitou-se a pesquisa às referências mais recentes que foram publicadas entre 2007 e 2014, em língua inglesa.

Foram analisadas 93 referências, na sua grande maioria artigos científicos que descrevem os estudos mais relevantes no âmbito da investigação da capacidade renoprotetora dos fármacos inibidores da DPP-4.

Para a recolha de dados epidemiológicos, consultou-se o Atlas da Federação Internacional da Diabetes (atualização de 2014) e o Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes de 2014.

# 1. NEFROPATIA DIABÉTICA: ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO

O rim é um dos órgãos mais afetados pela hiperglicémia crónica tanto na diabetes mellitus tipo 1 (DM1), como na diabetes mellitus tipo 2 (DM2).<sup>1, 5</sup> Apesar da patogénese destes dois tipos de diabetes ser diferente, as lesões induzidas a nível renal são semelhantes.<sup>14</sup> A nefropatia diabética é caracterizada por modificações morfológicas e estruturais a nível renal, incluindo hipertrofia glomerular, espessamento da membrana basal glomerular e expansão da matriz extracelular que é posteriormente substituída por tecido fibrótico.<sup>15</sup> No que diz respeito à DM1, a história natural da nefropatia diabética é bem conhecida, já que, a hiperglicémia é o único fator etiológico que contribui para o seu desenvolvimento e progressão. Como o diagnóstico da DM1 coincide geralmente com um evento agudo, é possível conhecer a evolução temporal da doença e os seus vários estádios estão bem documentados. Por sua vez, o diagnóstico da DM2 é precedido por um longo período durante o qual um conjunto de alterações metabólicas (obesidade, hiperinsulinémia, hipertensão arterial e dislipidémia) afetam a estrutura e função renal, antes do desenvolvimento de hiperglicémia.<sup>6, 13</sup> Assim, a etiopatogenia da nefropatia diabética na DM2 é multifatorial, resultando da interação de fatores hemodinâmicos e metabólicos com fatores genéticos e ambientais.

## 1.1 Fisiopatologia

Numa fase em que a nefropatia ainda é assintomática, já estão presentes alterações importantes na estrutura e função renal que levam a um aumento do fluxo plasmático renal e a um aumento da pressão hidrostática nos capilares glomerulares.<sup>6, 16</sup> No momento do diagnóstico, cerca de 70% dos doentes com DM1 e 50% dos doentes com DM2 apresentam

um aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) de 25-50%.<sup>16</sup> Este aumento da TFG é proporcional aos valores de glicémia apresentados.

Para explicar o desenvolvimento de hiperfiltração glomerular existem duas teorias principais: a teoria tubular e a teoria vascular.<sup>13, 17</sup>

De acordo com a teoria tubular, a elevação da TFG deve-se ao aumento da absorção de glucose e de sódio no túbulo contornado proximal, o que resulta do aumento da atividade do transportador sódio/hidrogénio 3 (NHE3) e do aumento da expressão do co-transportador de sódio-glucose tipo 2 (SGLT2) nos rins sujeitos a hiperglicémia. Consequentemente, o fluido tubular apresenta uma concentração mais baixa de glucose e sódio que, ao ser detetada pelas células da mácula densa, ativa o mecanismo de retro controlo tubuloglomerular. Este mecanismo vai atuar diminuindo a resistência vascular da arteríola aferente, o que aumenta a pressão hidrostática nos capilares glomerulares e a TFG.<sup>13, 17</sup>

De acordo com a teoria vascular, na nefropatia diabética existe um defeito na regulação da função vascular renal que leva a uma diminuição da resistência na arteríola aferente, comparativamente à arteríola eferente. Esta desregulação resulta da hiperativação do sistema nervoso simpático à qual se junta a formação desequilibrada de fatores vasoativos locais, culminado na ativação do SRAA e no aumento dos níveis de angiotensina II. O aumento da produção de angiotensina II tem sido apresentado como sendo um evento central no desenvolvimento da nefropatia diabética, já que, para além dos seus efeitos hemodinâmicos é responsável pela hiperplasia e hipertrofia das células renais através do aumento da expressão de várias citocinas e fatores de crescimento pró-fibróticos.<sup>13, 17, 18</sup>

Atualmente, sabe-se que, para além destes mecanismos clássicos, a produção de moléculas como a endotelina-1 (ET-1), o óxido nítrico (NO) e os metabolitos derivados da ciclo-oxigenase do ácido araquidónico estão envolvidos no desenvolvimento de inflamação a

nível renal.<sup>18-22</sup> Vários estudos têm clarificado o papel do aumento do stress oxidativo e de citocinas inflamatórias nos mecanismos implicados na patogénese das várias complicações microvasculares da diabetes.<sup>4</sup> As características inflamatórias da nefropatia diabética são semelhantes às encontradas na aterosclerose, sendo no entanto menos pronunciadas do que as que figuram em doenças inflamatórias sistémicas, como a artrite reumatoide. Por esse motivo, propôs-se o termo microinflamação para caracterizar este estado inflamatório de baixo grau.<sup>23</sup>

A hiperglicémia origina um aumento da atividade de 4 vias metabólicas: via do polioliol, via da proteína cinase C, via dos produtos finais de glicosilação avançada (AGE) e via das hexosaminas.<sup>24</sup> Na via do polioliol, o excesso de glicose é reduzido a sorbitol pela aldolase reductase, uma enzima dependente de NADPH. O sorbitol por sua vez é oxidado a frutose, pela enzima sorbitol desidrogenase, que tem como cofator o NAD<sup>+</sup>. Em condições normais, a glicose não é canalizada para esta via, mas durante a hiperglicémia cerca de 30% da glicose pode ser metabolizada, levando a uma depleção de NADPH e de glutathiona e a um aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup>, que contribui para um ambiente oxidativo.<sup>25</sup>

Os AGE são produzidos em condições fisiológicas como o envelhecimento, mas os seus níveis aumentam consideravelmente em resposta à hiperglicémia crónica, tanto no compartimento intracelular, como no compartimento extracelular. Os AGE podem modelar várias vias intracelulares, como a ativação da proteína cinase C e o aumento da expressão de fatores de transcrição, como o *Nuclear Factor kB* (NF-kB). Estas moléculas, por sua vez, regulam a expressão de citocinas e fatores de crescimento como o TGFβ, que influencia a produção de várias moléculas da matriz extracelular. Os AGE formados no compartimento extracelular são formados pela ligação irreversível entre glicose e moléculas da matriz extracelular, como colagénio tipo IV, a laminina, a fibronectina ou os proteoglicanos.<sup>26</sup> Estas proteínas modificadas têm menos suscetibilidade enzimática à hidrólise pelas metaloproteinases da matriz, acumulando-se no espaço extracelular.<sup>27</sup> A glicosilação do



sulfato de proteoglicano presente na barreira de filtração glomerular diminui a sua eletronegatividade e está na base do desenvolvimento da albuminúria.<sup>18</sup> As elevadas concentrações de AGE levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como um amplificador das várias vias de sinalização celular induzidas pela hiperglicemia.<sup>26</sup>

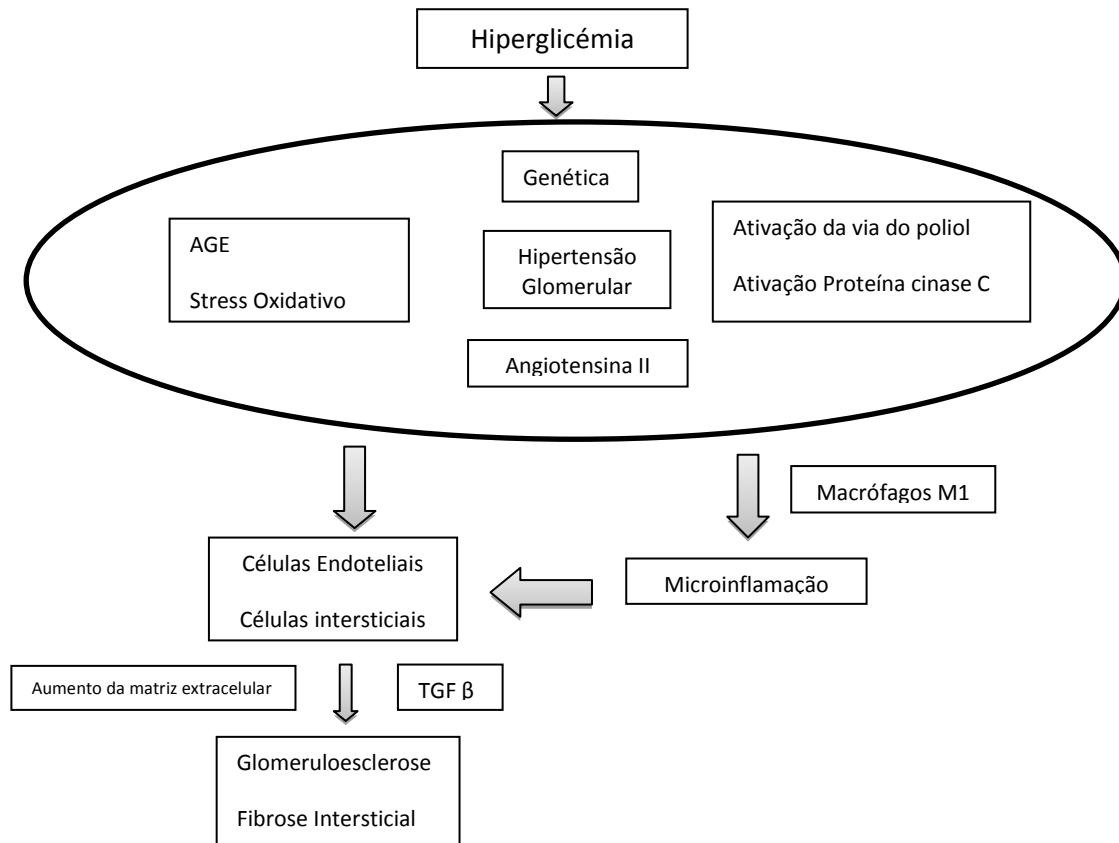
Em geral, as vias induzidas pela hiperglicemia descritas anteriormente, levam ao aumento da produção de TGF $\beta$ 1, uma das citocinas mais importantes na patogênese da nefropatia diabética.<sup>18</sup> A evidência atual aponta o TGF $\beta$ 1 como o principal responsável pela indução da transformação epitélio-mesquimatosa<sup>28</sup> (transformação das células tubulares em células intersticiais) e perda de adesão celular, que culmina em fibrose e perda de função renal.<sup>18, 19</sup>

O TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória com várias ações na resposta inflamatória de vários tecidos e efeitos pleiotrópicos.<sup>19</sup> Sabe-se que, o TNF- $\alpha$  altera a hemodinâmica renal e promove um aumento da permeabilidade do endotélio vascular<sup>19</sup>, tendo sido demonstrada uma correlação entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a excreção de albumina no rato diabético.<sup>29</sup>

Os níveis das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 também estão aumentados na nefropatia diabética. Vários estudos mostraram que os níveis de VCAM-1 se correlacionam com a severidade da albuminúria em doentes diabéticos hipertensos.<sup>30</sup> Vários modelos animais diabéticos, mostraram que ratos com deficiência de ICAM-1, são resistentes ao desenvolvimento da nefropatia diabética.<sup>19</sup>

As principais células inflamatórias envolvidas na patogênese da nefropatia diabética são, os macrófagos e os linfócitos T.<sup>19</sup> Os macrófagos M1 exacerbam o dano renal aumentando a resposta inflamatória pela produção de ROS, enquanto os macrófagos M2 promovem a reparação vascular e endotelial.<sup>19, 31</sup> Atualmente decorrem estudos onde se procura saber se as estatinas são capazes de bloquear a ação dos macrófagos M1, ao mesmo tempo que aumentam a função dos macrófagos M2.<sup>19</sup>

Assim, a patogenia da nefropatia diabética é muito complexa, resultando da interação de fatores metabólicos, hemodinâmicos e imunitários. (**Figura 1**)



**Figura 1. Patogênese da Nefropatia Diabética.** Adaptado da referência [23]

AGE-Produtos de glicação avançada; TGFβ-Transforming growth factor β

Apesar de muitas vezes ser dada mais importância ao papel da lesão glomerular na fisiopatologia da nefropatia diabética, sabe-se, que a extensão da lesão no compartimento tubulointersticial correlaciona-se melhor com o grau de disfunção renal. O componente tubulointersticial representa aproximadamente 90% da massa parenquimatosa renal, o que reforça a sua importância. Os mecanismos responsáveis pela lesão tubular são semelhantes aos que afetam o glomérulo, incluindo a produção de AGE, proteína cinase C, TGFβ1 e ROS.

A lesão tubulointersticial também ocorre de forma secundária às alterações glomerulares, como a proteinúria que é observada nos estádios tardios da nefropatia diabética.<sup>18</sup>

## 1.2 Histologia

Ainda durante a fase assintomática da nefropatia diabética ocorrem alterações morfológicas no rim, incluindo espessamento da membrana basal glomerular e tubular e expansão do mesângio. A expansão mesangial difusa pode estar associada à presença de nódulos de Kimmelstiel-Wilson, característicos da nefropatia diabética. As alterações do compartimento tubulointersticial incluem hipertrofia tubular, seguida por espessamento da membrana basal e fibrose intersticial. As alterações vasculares observadas são o espessamento e hialinização das arteríolas aferentes e interlobulares e podem apresentar-se poucos anos após o diagnóstico de diabetes.<sup>15, 32</sup>

## 1.3 Classificação

A nefropatia diabética é classificada em 5 estádios pela presença de albuminúria e diminuição da TFG. (**Tabela 1**)<sup>33, 34</sup> A albuminúria está associada a um declínio linear na TFG, um aumento da mortalidade cardiovascular e progressão para doença renal terminal.<sup>35</sup> Contudo, a história natural da albuminúria pode ser altamente variável, com a regressão espontânea para normoalbuminúria a ocorrer em até 40% dos doentes com DM1 e em 31% dos doentes com DM2.<sup>8</sup> Também pode existir nefropatia diabética avançada na ausência de excreção urinária de albumina significativa.<sup>36</sup> A taxa de declínio da TFG também é altamente variável e em grande parte influenciada pelo controle da glicémia e pressão arterial.<sup>37</sup>

Classificação	Características	TFG	Excreção de albumina urinaria	Pressão arterial	Apresentação
1.Hiperfiltração e hipertrofia	Hiperfiltração	>90	Ligeiramente aumentada	Normal no tipo 2	Presente no diagnóstico
2.Estadio silencioso	Espessamento da membrana basal glomerular e expansão do mesângio Normoalbuminuria	60-89	<30 mg/dia	Normal no tipo 2	0-5 anos após o diagnóstico
3.Estadio incipiente	Microalbuminuria	30-59	30-300 mg/dia	Normal no tipo 2	6-15 anos após diagnóstico
4.Nefropatia diabética	Macroalbuminuria	15-29	>380 mg/dia	Hipertensão	15-25 anos após diagnóstico
5.Urémico	Doença renal em estágio terminal	<15	A diminuir	Hipertensão	25-30 anos após diagnóstico

**Tabela 1 Classificação da nefropatia diabética.** Adaptado de [33, 34]

## 2. TRATAMENTO ACTUAL E NOVAS PERSPECTIVAS

O tratamento atual da nefropatia diabética que se baseia no controlo da glicémia e pressão arterial assim como na farmacoterapia com fármacos inibidores do SRAA , desacelera a progressão da lesão renal, mas não impede que a maioria dos doentes desenvolva doença renal crónica. As recomendações atuais aconselham um valor de hemoglobina glicada (HbA1c ou A1C) alvo de aproximadamente 7%, para prevenir ou atrasar a progressão das complicações microvasculares da diabetes.<sup>8</sup> No entanto, o controlo glicémico rigoroso não se tem revelado uma estratégia eficaz, já que é difícil de atingir devido à falta de adesão à terapêutica e ao facto de não poder ser aplicado a todos os doentes, já que envolve um risco considerável de hipoglicémia.<sup>8</sup> Por outro lado, o controlo glicémico rigoroso, quando iniciado numa fase tardia, pode não ser suficiente para prevenir a progressão da doença renal, devido à presença de um fenómeno designado por “memória metabólica”.<sup>13</sup> O *Diabetes Control and*

*Complications Trial* (DCCT) revelou que a redução do risco de desenvolvimento de nefropatia e retinopatia em doentes com DM1 sujeitos a um controlo intensivo da glicémia, persistiu durante vários anos após o DCCT, apesar de ter sido registado um aumento dos valores de glicémia.<sup>38</sup> A presença de memória metabólica também é responsável pelo aparecimento de lesões vasculares, mesmo após se ter atingido um controlo glicémico satisfatório.<sup>39</sup> A evidência atual sugere que os AGE, sejam as moléculas responsáveis pela existência deste fenómeno.<sup>40</sup>

De forma a contornar as limitações da terapêutica atual, assiste-se a um crescente interesse em procurar alternativas terapêuticas assentes nos mecanismos de toxicidade da glucose, nomeadamente na ativação de vias inflamatórias.

Um estudo reportou que o tratamento com micofenolato de mofetil, um agente imunossupressor, não teve nenhum efeito na pressão sanguínea, na hemodinâmica glomerular ou nos níveis de glucose plasmática, mas preveniu o desenvolvimento de albuminúria, infiltração glomerular por macrófagos e glomeruloesclerose em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina.<sup>41</sup>

Uma outra investigação, demonstrou que terapêutica com pentoxifilina, um vasodilatador periférico utilizado no tratamento da claudicação intermitente e que é muitas vezes administrado a doentes diabéticos, diminui a albuminúria e tem efeitos benéficos na TFG.<sup>22</sup>  
<sup>42</sup> Estudos subsequentes utilizando células mesangiais em cultura, demonstraram que a pentoxifilina diminui a produção de fibronectina e TGF $\beta$ .<sup>43</sup> Estudos *in vivo*, constataram que as alterações na histologia renal induzidas pela hiperglicémia podem ser reduzidas com a administração deste fármaco.<sup>22</sup> No futuro, a utilização da combinação de um fármaco inibidor do SRRA com pentoxifilina, poderá ser utilizado com o objetivo de diminuir a albuminúria em doentes com nefropatia diabética.<sup>42</sup>

Uma das classes de fármacos que tem suscitado maior curiosidade quanto à possibilidade de induzir renoproteção na nefropatia diabética, são os fármacos que se baseiam no aumento das hormonas incretinas: os análogos do GLP-1 e os inibidores da DPP IV. Os análogos GLP-1, como a exenatida e o liraglutido consistem em agonistas do recetor GLP-1 resistentes à atividade da enzima DPP-4.<sup>44</sup> Vários estudos demonstraram que a administração de exenatida diminui a excreção urinária de albumina, a TFG, a hipertrofia glomerular e a expansão de matriz mesangial em ratos com DM1, mesmo sem alterar os valores de pressão arterial ou do peso.<sup>45, 46</sup> O liraglutido demonstrou proteger contra o stress oxidativo e albuminúria em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina.<sup>47</sup>

Os inibidores da DPP-4 também têm demonstrado ter um possível efeito anti-inflamatório direto prevenindo a progressão da nefropatia diabética, independentemente do controlo da glicémia. Estes fármacos têm efeitos pleiotrópicos, pois além de clivarem a enzima DPP-4, são responsáveis pela inibição da ativação de muitos outros peptídeos, alguns deles com propriedades inflamatórias.<sup>10, 12, 13</sup> Embora tendo sido menos investigados relativamente ao seu papel renoprotetor do que os análogos GLP-1, esta classe de fármacos fornece uma interessante alternativa para a nefropatia diabética, já que, os seus efeitos podem ser independentes dos níveis de GLP-1.

### **3. AS INCRETINAS**

As incretinas são hormonas produzidas pelas células enteroendócrinas intestinais após a ingestão de glicose e estimulam a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, sendo responsáveis por 70% da secreção de insulina pós-prandial.<sup>48</sup> Verificou-se que a administração oral de glucose provoca um aumento de 50 a 70% dos níveis de insulina, comparativamente à administração intravenosa, apesar de resultar em concentrações

plasmáticas finais de glicose semelhantes. Este diferencial de resposta, pensa-se que seja causado pela ação das incretinas e é designado por “efeito incretina”.<sup>13</sup>

A descoberta das incretinas remonta a 1904 quando Moore demonstrou que a administração de extratos de intestino reduziam a glicosúria em doentes diabéticos, presumivelmente através da estimulação do pâncreas endócrino. Em 1929, La Barre purificou o elemento hipoglicemiante presente em extratos do intestino, designando-o incretina.<sup>3</sup>

A primeira hormona incretina foi inicialmente designada *Gastric Inhibitory Polypeptide* (GIP), pois inibia a secreção de ácido em cães. Mais tarde, o nome deste peptídeo foi alterado para *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*, já que, aumentava a secreção de insulina. A clonagem e sequenciação do gene que codifica o proglucagon em mamíferos, resultou na descoberta de uma segunda hormona incretina, o *Glucagon-Like Peptide* (GLP-1).<sup>48</sup>

### 3.1 GLP-1

O GLP-1 é um peptídeo sintetizado principalmente pelas células enteroendócrinas L presentes no jejuno, íleo e cólon.<sup>13, 48, 49</sup> A produção de GLP-1 aumenta rapidamente em resposta à presença de glicose e de outros nutrientes no lúmen intestinal.<sup>40, 49</sup> No entanto, outras hormonas e sinais nervosos parecem ter efeito no controlo da produção de GLP-1, já que logo após a deglutição, mas antes da passagem dos nutrientes digeridos pelo intestino delgado, há libertação de GLP-1 pelas células L. O GLP-1 também reduz a glicose plasmática através da inibição da secreção de glucagon pelas células alfa pancreáticas. Como a supressão de glucagon pelo GLP1 é dependente da glicose plasmática, à medida que os níveis de glicose retornam aos valores normais, o GLP-1 deixa de exercer um efeito inibitório sob as células alfa, prevenindo o desenvolvimento posterior de hipoglicémia.<sup>48</sup>

O GLP-1 inicialmente é sintetizado como um polipeptídeo inativo de 37 aminoácidos, o proglucagon ou GLP-1<sub>(1-37)</sub>.<sup>48, 49</sup> O processamento pela prohormona convertase 1/3 (PC 1/3), torna-o num peptídeo ativo GLP-1<sub>(7-36)</sub> e ou GLP-1<sub>(7-37)</sub>.<sup>49</sup>

### 3.2 GIP

É um peptídeo constituído por 42 aminoácidos sintetizado e produzido pelas células enteroendócrinas K localizadas, principalmente no duodeno e no jejuno proximal.<sup>13, 48, 49</sup>

À semelhança do GLP-1, o GIP é produzido sob a forma de uma prohormona que é processada pela prohormona convertase 2 numa proteína de 30 aminoácidos (GIP<sub>1-30</sub>).<sup>49</sup> Sabe-se que o GIP<sub>(1-30)</sub> aumenta a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon de forma semelhante ao GLP-1.<sup>49</sup> No entanto, o GIP tem a particularidade de estimular a secreção de glucagon durante a hipoglicémia.<sup>50</sup> Esta característica pode ser uma das razões pela qual, o tratamento com inibidores DPP-4, apresenta um baixo risco de desenvolvimento de hipoglicémia.<sup>51</sup>

### 3.3 DPP-4

O GLP-1 é inativo pela enzima DPP-4 produzindo GLP-1<sub>(9-36)</sub> e ou GLP-1<sub>(9-37)</sub>.<sup>48</sup> A semivida do GLP-1 é de cerca de 2 a 3 minutos, sendo rapidamente processado pela DPP-4, razão pela qual, o GLP-1 plasmático se encontra principalmente na forma inativa.<sup>48, 49, 52</sup> Sabe-se que a DPP-4 também é capaz de clivar outros peptídeos que possuam um resíduo de prolina ou alanina na penúltima posição da extremidade N-terminal e que por esse motivo é capaz de exercer efeitos independentes de GLP-1.<sup>52</sup> A enzima existe em duas formas, solúvel e ligada à membrana celular, ambas com atividade proteolítica.<sup>9, 12, 52</sup> Pensa-se que a forma em circulação resulte da libertação das formas de membrana e que seja responsável pelos efeitos hipoglicémicos dos inibidores de DPP IV usados na clínica. Em contraste, a forma ligada à membrana, expressa na superfície de muitos tipos de células, incluindo células



tubulares renais, células endoteliais, células T, mucosa intestinal e hepatócitos, é a responsável pelo efeito pleiotrópico da DPP-4.<sup>48,52</sup>

### **3.4 Recetor GLP-1**

O recetor GLP-1 (GLP1-R) humano pertence à família dos recetores acoplados à proteína G e é sintetizado nos ilhéus pancreáticos, no rim, no pulmão, no coração, no sistema nervoso central, no endotélio vascular, fígado, músculo e tecido adiposo.<sup>12, 40, 48, 49, 52</sup>

Nas células  $\beta$  pancreáticas, a ligação do GLP-1 ao seu recetor aumenta a concentração de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) intracelular que, em seguida, ativa a proteína cinase A (PKA), estimulando a secreção de insulina.<sup>12</sup> O mecanismo responsável pelo facto de as incretinas só aumentarem a secreção de insulina quando se atingem níveis elevados de glicose plasmática, é desconhecido.<sup>48,52</sup>

## **4. PAPEL DAS INCRETINAS NA DIABETES MELLITUS**

O “efeito incretina” está reduzido em doentes com DM2, já que há uma diminuição em cerca de 50% da resposta das incretinas ao aumento da glicose plasmática, em comparação com indivíduos saudáveis.<sup>13,48</sup> As concentrações plasmáticas de GLP-1 e GIP biologicamente ativos foram medidas após uma refeição, em 12 doentes com DM2 (índice de massa corporal de 31 Kg / m<sup>2</sup> e de HbA1c de 9,2%) e 12 indivíduos saudáveis e demonstrou-se que a secreção de GLP-1 estava reduzida em doentes com DM2. Este facto, sugeriu que pudesse haver um defeito na secreção de GLP-1 ou GIP ou um defeito na ativação de vias de sinalização destas hormonas, nos doentes com DM2.<sup>54</sup> Para investigar se a redução das incretinas observada foi um evento primário ou secundário na patogénese da DM2, 8 doentes com pancreatite crónica e diabetes secundária, 8 doentes com pancreatite crónica e tolerância

normal à glicose, 8 doentes com DM2 e 8 indivíduos saudáveis foram estudados. O “efeito incretina” era significativamente menor em doentes com pancreatite crónica e diabetes secundária, do que em doentes com pancreatite crónica e tolerância normal à glicose. Desse facto concluiu-se que, a diminuição da resposta das incretinas não foi um evento principal no desenvolvimento do DM2, mas foi uma consequência do estado diabético.<sup>48</sup>

A expressão de DPP-4 está aumentada e os níveis de atividade da enzima são superiores em ratos com DM1 induzida por estreptozotocina e alimentados com dieta rica em gordura.<sup>55</sup> Em humanos com DM2 foi demonstrado que o aumento da atividade da DPP-4 correlacionava-se com os níveis de HbA1c.<sup>56</sup>

## **5. EIXO ENTERO-RENAL**

A regulação da função renal pelo trato gastrointestinal após uma refeição é um mecanismo de homeostasia essencial. A infusão de GLP-1 aumenta a diurese e a excreção de sódio tanto em indivíduos saudáveis, como em indivíduos obesos resistentes à insulina.<sup>13</sup> O papel das incretinas na diurese também foi sugerido quando se verificou que a ingestão de sódio provoca uma diurese mais marcada do que a administração parental e este efeito parece ser independente de alterações nas concentrações de aldosterona e de peptídeo natriurético auricular (ANP).<sup>13, 53, 57</sup>

O mecanismo pelo qual o GLP-1 promove a excreção de sódio parece envolver o transportador NHE-3, presente no túbulo contornado proximal.<sup>13</sup> Foi demonstrado que GLP-1R está presente no rim em estreita ligação com NHE-3. O NHE-3 também interage fisicamente com a enzima DPP-4 presente na bordadura em escova do epitélio do túbulo proximal, o que pode refletir na relação funcional.<sup>59</sup> Sabe-se que a diminuição da atividade

do transportador NHE-3 aumenta a excreção de sódio e diminui a excreção de íões de hidrogénio.<sup>58</sup> O facto de a administração de GLP-1 em humanos tornar o pH da urina alcalino, corrobora a hipótese da presença de uma interação com este transportador.<sup>13</sup>

O análogo do GLP-1, a exenatide e numa menor extensão os inibidores de DPP-4, também diminuem acentuadamente a reabsorção de sódio pelo túbulo contornado proximal, em ratos.<sup>13</sup>

A evidência atual sugere que a ação das incretinas no rim pode estar diminuída na nefropatia diabética. Nesta patologia, há um aumento da expressão de DPP-4 e uma diminuição da concentração de GLP-1 e de GLP-1 R no rim.<sup>12, 13</sup> O aumento da expressão da enzima DPP-4 foi observado em culturas de células epiteliais glomerulares sujeitas a inflamação, como é frequentemente observado na patogenia da nefropatia diabética<sup>12</sup>.

Para além da incretinas, outras hormonas intestinais como a guanilina, uroguanilina, secretina, péptido intestinal vasoativo, ghrelina, gastrina e colecistoquinina parecem estar implicados na regulação da função renal.<sup>13, 57</sup>

### **5.1 Recetor GLP-1**

O GLP-1R está presente no endotélio renal, mas o mecanismo exato pelo qual influencia a resistência pré-glomerular e pós-glomerular ainda é desconhecido.<sup>13, 51, 52, 59, 60</sup> O fluxo plasmático renal, estimado pela depuração de ácido p-amino-hipúrico, aumentou aproximadamente 28% em ratos anestesiados infundido com GLP-1. Para explicar este efeito do GLP-1 no fluxo sanguíneo renal, parece seguro assumir que esta incretina é responsável pela diminuição da resistência pré-glomerular e aumento da TFG.<sup>59</sup> No entanto, a diminuição da TFG em resposta à administração de GLP-1 ou análogos GLP-1 que se verifica em muitos estudos, parece dever-se ao facto de a inibição da absorção proximal de sódio e inibição do

retrocontrole tubuloglomerular ter uma maior influência na hemodinâmica renal, do que a vasodilatação induzida pelo GLP-1R.<sup>57, 59</sup>

## **5.2 GLP-1 e SRAA**

A angiotensina II, a principal hormona do SRAA aumenta a atividade do transportador NHE3.<sup>59</sup> Este efeito da angiotensina II é oposto ao do GLP-1 e alguns autores sugerem que esta não é uma coincidência: estudos em ratos mostraram que a estimulação do GLP-1R melhora a hipertensão induzida por angiotensina II.<sup>61</sup> Em humanos saudáveis infundidos com GLP-1, também se observou uma rápida diminuição da concentração plasmática de angiotensina II. Estes resultados suportam a tese de que o GLP-1R afeta principalmente a fisiologia renal, através da inibição da atividade SRAA.<sup>59</sup>

## **5.3 DPP-4**

A enzima DPP-4 é expressa na bordadura em escova das células do túbulo contornado proximal, assim como nas células endoteliais da arteríola aferente e células mesangiais.<sup>13</sup> A DPP-4 localizada no túbulo contornado proximal, parece ter um papel importante na clivagem de proteínas presentes no filtrado glomerular.<sup>12, 13, 52</sup> O aumento da concentração de DPP-4, nos glomérulos renais ou na urina, é considerado um marcador de doença glomerular, sugerindo um papel da enzima na inflamação e doença glomerular.<sup>13, 53</sup> A deficiência de DPP-4 em ratos com DM1 induzida por estreptozotocina, tornou-os mais resistentes ao desenvolvimento de DM1, mas predisps os animais para o desenvolvimento de hiperglicemia e nefropatia diabética.<sup>62</sup> Num estudo com indivíduos com DM 2, a enzima DPP-4 foi encontrada ligada a microvesículas eliminadas na urina e estava correlacionada com o grau de albuminúria, sugerindo que a concentração de DPP-4 na urina pode servir como biomarcador desta população.<sup>63</sup>

## 6. INIBIDORES DA DPP-4

A principal ação dos inibidores da enzima DPP-4 é aumentar os níveis das incretinas endógenas.<sup>10</sup> O aumento do GLP-1 plasmático estimula a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon pelas células pancreáticas, o que provoca um aumento da utilização de glicose pelos tecidos e uma diminuição da produção hepática de glicose. Como será discutido mais à frente neste trabalho, hoje sabe-se que o GLP-1 tem um efeito pleiotrópico e o seu espectro de ação vai para além do tecido pancreático.<sup>3, 9, 10</sup>

Em geral, os inibidores da DPP-4 são bem tolerados, não alteram o peso corporal e têm um risco baixo de desenvolvimento de hipoglicémia.<sup>10</sup> Estes fármacos têm a vantagem de estarem disponíveis para administração por via oral, em contraste com os análogos GLP-1.<sup>44</sup>

A sitagliptina foi o primeiro inibidor da DPP-4 a ser comercializado, sendo seguida pela vildagliptina que surgiu em 2008.<sup>48</sup> Tanto a vildagliptina como a sitagliptina, aumentam os níveis de GLP-1 não só após as refeições, como também ao longo de todo o dia, inclusive nos períodos de jejum.<sup>9, 10</sup> Os dois fármacos estão disponíveis na forma de comprimidos e são responsáveis pela inibição de 70-90 % da atividade da DPP-4, durante 24 horas, razão pela qual são administrados em dose única diária.<sup>10, 48</sup> A vildagliptina é o único inibidor DPP-4 que necessita de ser administrado duas vezes por dia. O objetivo desta medida é impedir o aumento das enzimas transaminases hepáticas, observado com a toma de uma dose única de 100 mg do fármaco.<sup>10, 48</sup>

Os outros inibidores da DPP-4 em uso clínico, são a saxagliptina, a alogliptina e a linagliptina. Os vários fármacos diferem entre si essencialmente pelo seu perfil farmacocinético e modo de excreção. (**Tabela 2**) A sitagliptina e a alogliptina inibem a DPP-4 através de competição enzimática, enquanto a saxagliptina e a vildagliptina são bloqueadores enzimáticos. A linagliptina é predominantemente eliminada por via hepática, enquanto a

saxagliptina é predominantemente eliminada por via renal. Este aspeto é importante, já que a capacidade dos inibidores da DPP-4 induzirem renoproteção pode diferir, de acordo com a via de eliminação.<sup>10, 33</sup> A linagliptina é o único fármaco que não necessita de ajuste em doentes com insuficiência renal, independentemente do estágio em que se encontrem.<sup>65</sup>

<b>Características</b>	<b>Alogliptina</b>	<b>Linagliptina</b>	<b>Saxagliptina</b>	<b>Sitagliptina</b>	<b>Vildagliptina</b>
<b>Dose terapêutica (mg/dia)</b>	25	5	5	100	2x50
<b>Administração</b>	1x/dia	1x/dia	1x/dia	1x/dia	2x/dia
<b>Principal via de excreção</b>	Renal	Hepático	Renal	Renal	Renal
<b>Redução da dose em IR</b>	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
<b>CYP3A4</b>	Não	Não	Sim	Não	Não

**Tabela 2. Inibidores DPP-4.** Adaptado [33]

Apesar de a sitagliptina e a vildagliptina exibirem propriedades antidiabéticas significativas em monoterapia, estes fármacos foram mais eficazes na redução do nível de glicemia, quando usados em combinação com outros agentes antidiabéticos tais como a metformina, sulfonilureias e as tiazolidinedionas. Os inibidores de DPP-4 também podem ser utilizados associados à terapia com insulina.<sup>48</sup>

## **7. EFEITOS PLEIOTRÓPICOS DOS INIBIDORES DA DPP-4**

Vários estudos têm provado que as hormonas incretinas exercem efeitos em vários tecidos, para além do pâncreas. Com base neste conhecimento, foram realizados estudos para tentar encontrar novos alvos terapêuticos dos inibidores da DPP-4, principalmente no que diz respeito às várias complicações da diabetes. Estes efeitos são em grande parte mediados pelo aumento da concentração de GLP-1, mas cada vez mais novos estudos apontam novos efeitos independentes do efeito na concentração de peptídeos, mas resultantes da interação com outros peptídeos vasoativos.

## **7.1 Efeitos dependentes das incretinas**

### **7.1.1 Pâncreas**

Tanto o GLP-1 como o GIP têm um efeito proliferativo e anti-apoptótico nas células  $\beta$  pancreáticas.<sup>48</sup> Em ratos submetidos a uma dieta rica em lípidos, o tratamento crônico com vildagliptina preveniu a inflamação pancreática.<sup>66</sup>

### **7.1.2 Sistema Cardiovascular**

O GLP-1 inibiu de forma significativa a infiltração da parede endotelial por macrófagos e preveniu o desenvolvimento de aterosclerose em ratos.<sup>3, 52</sup> A sitagliptina mostrou inibir a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , assim como as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, aumentando ainda a produção de óxido nítrico endotelial.<sup>[3]</sup> Demonstrou-se também que a infusão de GLP-1 melhora a função endotelial em doentes com DM2. Adicionalmente, o GLP-1 melhorou a função do miocárdio, em doentes com enfarte agudo do miocárdio e disfunção do ventrículo esquerdo. Também foi descrito que a infusão de GLP-1 em doentes com doença coronária, impede o desenvolvimento de disfunção do ventrículo esquerdo secundária a isquemia induzida por dobutamina. Outro estudo demonstrou que a administração de GLP-1 diminuiu a área de enfarte num modelo de isquemia, através da prevenção da degradação da SDF-1 $\alpha$ .<sup>3, 52, 67</sup>

### **7.1.3 Pressão arterial**

A hipertensão tem um papel crítico no desenvolvimento das complicações vasculares da DM2. A infusão de GLP-1 reduziu a incidência de hipertensão arterial e preveniu a hipertrofia cardíaca e a fibrose em ratos Dahl sensíveis a sal. Neste modelo de hipertensão, o GLP-1 também reduziu a excreção urinária de albumina e aumentou a excreção urinária de sódio.<sup>61</sup>

A sitagliptina atenuou a elevação da pressão sanguínea, em ratos espontaneamente hipertensos.<sup>3</sup>

#### **7.1.4 Fígado**

A DM2 está intimamente associada ao aparecimento de *Non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). Aproximadamente 10 a 25% dos indivíduos com NAFLD progride para *non alcoholic steatohepatitis* (NASH), uma doença silenciosa, que pode culminar no desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.<sup>3</sup> O tratamento com sitagliptina durante 4 meses, melhorou as provas analíticas hepáticas de indivíduos diabéticos com NAFLD.<sup>68</sup> Em diabéticos com NASH, o tratamento com sitagliptina melhorou as provas analíticas hepáticas e a vacuolização dos hepatócitos na biópsia.<sup>69</sup>

#### **7.1.5 Sistema Nervoso Central**

Demonstrou-se que recetores para GIP e GLP-1 são expressos no hipocampo, que é a região do cérebro mais intimamente envolvida na formação da memória. Ratinhos com défice de recetor GIP têm dificuldades de aprendizagem, defeitos na plasticidade sináptica e na neurogênese do hipocampo.<sup>3</sup> O GLP-1 tem a capacidade de reduzir os níveis de proteína  $\beta$  amiloide no cérebro *in vivo*<sup>70</sup>, para além de reduzir os níveis de proteína precursora amiloide em neurónios cultivados.<sup>3</sup> Por sua vez, a linagliptina mostrou reduzir o dano cerebral secundário a isquemia em ratos diabéticos.<sup>71</sup>

#### **7.1.6 Osso**

Tem sido relatado que os doentes diabéticos têm um maior risco de desenvolvimento de fraturas ósseas. O GIP promove a formação óssea, enquanto que o GLP-1 inibe a reabsorção óssea. Assim, tanto o GIP como o GLP-1 podem desempenhar um papel importante na redução do risco de fratura óssea em doentes diabéticos.<sup>3</sup> O recetor GIP demonstrou estar presente em osteoclastos<sup>72</sup> e a sua administração *in vitro* suprimiu a apoptose de



osteoblastos.<sup>73</sup> O GLP-1 não mostrou ter qualquer efeito direto sobre células do metabolismo ósseo, embora pareça ativar uma via relacionada com a calcitonina, a qual, por sua vez, desempenha um importante papel na formação óssea.<sup>3, 49</sup> A sitagliptina melhorou significativamente a densidade mineral óssea trabecular e a arquitetura volumétrica vertebral em ratos.<sup>74</sup> Numa meta-análise de 28 ensaios clínicos, foi observada uma redução do risco de fraturas ósseas em doentes tratados com inibidor de DPP-4, durante pelo menos 8 semanas.<sup>75</sup> Embora estas linhas de evidência, sugiram que as incretinas tenham um papel no metabolismo ósseo em seres humanos, os seus efeitos ainda são em grande parte desconhecidos.

## 7.2 Efeitos independentes das incretinas

Como foi referido anteriormente, a enzima DPP-4 cliva outras moléculas para além das incretinas, entre as quais o peptídeo natriurético cerebral (BNP), o peptídeo natriurético auricular (ANP), a substância P, o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo YY, o fator derivado de células do estroma 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ), a meprina  $\beta$  e a proteína do grupo de alta mobilidade B1 (HMGB1).<sup>10, 12, 13</sup> Muitos destes peptídeos são vasoativos, pelo que vários estudos têm procurado demonstrar a sua importância fisiológica. Por exemplo, pensa-se que os efeitos adversos dos inibidores de DPP-4, como rinite e inflamação dos seios nasais, ocorram devido à inflamação neurogénica provocada pelo aumento da substância P, que deixa de ser degradada na mucosa nasal.<sup>48</sup>

Recentemente tem existido um grande interesse na identificação de outros substratos endógenos da DPP-4 e no estabelecimento da sua relevância fisiológica *in vivo*. No rim, as funções proteolíticas da DPP-4 também têm sido descritas em estudos *in vivo*, revelando a sua importância na degradação de cerca de dez peptídeos.<sup>52</sup>

## 8. PROTECÇÃO RENAL NA NEFROPATIA DIABÉTICA

Os efeitos dos análogos do GLP1 e dos inibidores DPP-4 na doença renal têm sido estudados em modelos de nefropatia diabética, tendo sido demonstrado um possível papel protetor, pela redução da proteinúria e da fibrose renal através da diminuição do stress oxidativo e da inflamação envolvidas na patogénese da nefropatia diabética.<sup>12, 33, 52, 59</sup>

Uma fração da ação renal dos inibidores da DPP-4 deve-se ao aumento da concentração das incretinas, que por sua vez se ligam aos recetores GLP-1 presentes no rim. Por esse motivo, muitos dos efeitos renais dos inibidores DPP-4 são semelhantes, embora menos intensos que os efeitos dos análogos GLP-1.<sup>59</sup> Contudo, sabe-se os inibidores DPP-4 têm ações independentes do aumento da concentração plasmática de GLP-1. Este efeito adicional dos inibidores DPP-4 foi comprovado num estudo que demonstrou que a alogliptina aumentou a excreção de sódio em ratinhos desprovidos de recetor para GLP-1, enquanto a exenatida não produziu esse efeito.<sup>76</sup> Pensa-se que ação da DPP-4 independente de GLP-1 ocorra através do contacto da enzima com vários peptídeos presentes no filtrado glomerular, a nível do túbulo contornado.<sup>52</sup> Até à data, nenhum estudo examinou os efeitos relativos dos diferentes substratos clivados pela DPP-4 no rim, *in vivo*, mas estudos pré-clínicos demonstram efeitos renais dos vários peptídeos acima mencionados.

### 8.1 Efeitos dependentes de GLP-1

À semelhança dos análogos GLP-1, os inibidores DPP-4 aumentam a concentração de sódio no filtrado que chega à mácula densa, restaurando o retrocontrolo tubuloglomerular que está disfuncional na nefropatia diabética e consequentemente diminuindo a pressão hidrostática no capilar glomerular.<sup>13</sup>

## **8.2 Efeitos independentes de GLP-1**

Em diversos estudos, peptídeos que são substratos da DPP-4 aumentaram excreção de sódio, diminuíram a atividade SRAA, demonstraram ter efeitos anti-inflamatórios e reduziram a atividade do sistema nervoso simpático.<sup>12, 13, 52</sup> Os substratos da DPP-4 que se pensa que tenham um papel mais importante na nefropatia diabética são HMGB1, Meprina  $\beta$ , neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo YY (PYY) e SDF 1 alfa.<sup>13</sup> No entanto, a sua função exata e a sua importância relativa nos efeitos renoprotetores dos inibidores DPP-4, ainda não foram testados.

### **8.2.1 SDF 1 $\alpha$**

SDF-1 $\alpha$  é uma quimiocina que está aumentada no tecido isquémico e que tem um papel importante na atração de células estaminais, permitindo a reparação de tecidos.<sup>67</sup> Um estudo em rato, demonstrou que o SDF-1 $\alpha$  parece estar envolvido na proteção do tecido renal sujeito a lesão isquémica.<sup>77</sup> No entanto, ainda está por apurar se o SDF-1 $\alpha$  também pode influenciar favoravelmente o rim humano.

### **8.2.2 HMGB1**

O HMGB1 é um peptídeo libertado quando existe lesão celular. A presença de HMGB1 extracelular aumenta na inflamação e tem sido descrito que esta proteína tem um papel patogénico no desenvolvimento da nefropatia diabética.<sup>52</sup> Em ratos com diabetes induzida por esteptozotocina, foi demonstrado que a HMGB1 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a lesão renal.<sup>13</sup> Adicionalmente, o HMGB1 é um ligante do RAGE (Recetor dos produtos finais de glicação avançada), que é fundamental para o desenvolvimento da nefropatia diabética. Foi colocada a hipótese de que durante a lesão renal o HMGB1 é libertado pelas células do túbulo contornado proximal, sendo acessível a modificação pela DPP-4 presente na membrana celular destas células.<sup>52</sup>

### 8.2.3 Meprina $\beta$

O papel dos inibidores da DPP IV na atividade da meprina  $\beta$  na nefropatia diabética não é conhecido e não foi investigado anteriormente. As meprinas são metaloendopeptidases capazes de degradar a matriz extracelular que estão localizados na bordadura em escova das células do túbulo contornado proximal. O polimorfismo de gene da meprina  $\beta$  foi associado a um aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de nefropatia em índios Pima (um grupo com uma alta incidência de DM2 e um ritmo acelerado progressão da nefropatia).<sup>52</sup> Vários estudos demonstraram que a inibição da meprina  $\beta$ , tanto por a nível genético, como a nível proteico, confere renoproteção. Por exemplo, ratinhos selvagens eram marcadamente mais suscetíveis a insuficiência renal após isquemia/reperfusão, quando comparados com ratinhos desprovidos do gene da meprina  $\beta$ . Adicionalmente, os ratinhos selvagens apresentavam níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  e TGF  $\beta$ .<sup>78</sup> Este resultado foi corroborado por um estudo utilizando actinonina (um inibidor da meprina), que demonstrou que a inibição da meprina era protetora em modelos de lesão isquêmica renal *in vitro* e *in vivo*.<sup>79</sup> Baseado na evidência acima apresentada, a meprina pode ser um alvo terapêutico útil dos inibidores DPP-4.

### 8.2.4 NPY e PYY

O NPY e o PYY pertencem a uma família de polipeptídeos pancreáticos envolvidos no controlo neuroendócrino de processos associados ao apetite.<sup>4</sup> O peptídeo YY é libertado em resposta a estímulos nervosos e hormonais e tem propriedades vasoconstritoras.<sup>13</sup> O NPY quando administrado de forma exógena exerce uma atividade vasomotora e estimula a angiogénese e a remodelação vascular.<sup>80</sup> Estudos indicam que estes dois peptídeos, são mediadores importantes de uma variedade de funções no rim, incluindo aumento da excreção de sódio.<sup>13</sup>

## 9. INIBIDORES DPP-4 E NEFROPATIA DIABÉTICA: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS

Vários estudos pré-clínicos sugerem que os inibidores DPP-4 podem ter um efeito nefroprotetor, porém ainda estão disponíveis poucos estudos clínicos que avaliem a ação destes fármacos na nefropatia, em indivíduos com DM2. (**Tabela 3**)

### 9.1 Sitagliptina

Vários estudos investigaram os efeitos da administração de sitagliptina em modelos de ratos com DM2 e nefropatia diabética. Uma das investigações tinha como objetivo compreender qual é o papel da DPP-4 no desenvolvimento de Diabetes Mellitus, dislipidemia e disfunção renal induzida por estreptozotocina (STZ). Ratos DuCr1Cr1j, que são desprovidos de atividade da DPP-4, foram comparados com ratos selvagens 42 dias após a indução de diabetes, por STZ. Os ratos com déficit de atividade da DPP-4 foram resistentes ao desenvolvimento de diabetes, mas foram mais suscetíveis ao aparecimento de dislipidemia e diminuição da taxa de filtração glomerular.<sup>62</sup> Um estudo realizado por investigadores da Faculdade de Medicina da Universidade Coimbra, utilizando o modelo animal de DM2 Zucker, demonstrou que o tratamento crónico com sitagliptina, em baixa dose, é capaz de melhorar o dano renal a nível glomerular, tubulointersticial e vascular. Nos ratos tratados também se verificou uma melhoria do perfil metabólico, nomeadamente dos níveis de colesterol total, triglicéridos e glicémia. Registou-se ainda, uma redução dos níveis de HbA1c, que passou de 10,38% para 9,18%.<sup>81</sup> Investigadores da mesma instituição, também procuraram perceber se a sitagliptina era eficaz na prevenção dos efeitos da DM no rim. Em ratos Zucker obesos e diabéticos, tratados durante 6 semanas com sitagliptina, foram monitorizados os níveis de glicémia e HbA1c e avaliou-se a distribuição de DPP-IV, GLP-1, GLP-1R, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , BAX, Bcl-2 no rim. Demonstrou-se que o tratamento com

sitagliptina melhorou o controlo glicémico, o que se refletiu numa redução significativa dos níveis de HbA1c e melhoria das lesões renais glomerulares e tubulointersticiais. A sitagliptina impediu ainda o aumento de atividade da DPP-4 e a diminuição dos níveis de GLP-1 no rim diabético. Também diminuiu os níveis de  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$  entre outras citocinas inflamatórias e moléculas envolvidas na indução de apoptose celular.<sup>82</sup> Em ambos os estudos, foi observada uma diminuição nos níveis de HbA1c no grupo tratado com sitagliptina, pelo que se torna difícil avaliar se os efeitos da inibição da DPP-4 foram independentes dos efeitos de redução da glucose.

O efeito da sitagliptina no dano renal induzido por isquemia/reperfusão em ratos com diabetes induzida por STZ, também foi estudado. Os ratos tratados com sitagliptina apresentaram uma redução da fragmentação do DNA e apoptose. A histologia renal também estava preservada comparativamente com o grupo controlo. Observou-se ainda uma diminuição dos marcadores de stress oxidativo, diminuição da creatinina plasmática e dos produtos azotados.<sup>83</sup> Como a estreptozotocina destrói as células beta pancreáticas e é perdida a estimulação da produção de insulina pelo GLP-1, este estudo demonstra que o aumento das concentrações de GLP-1 protege o rim, para além dos seus efeitos metabólicos.<sup>59</sup>

Trinta e seis indivíduos com DM2 e níveis de HbA1c superiores a 6,5%, apesar de alterações no estilo de vida e tratamento antidiabético, foram tratados com sitagliptina durante 6 meses. A sitagliptina reduziu significativamente os valores de HbA1c, pressão arterial sistólica e diastólica e os níveis plasmáticos de proteína C reativa. A albuminúria medida pela razão albumina/creatinina também baixou significativamente nos indivíduos tratados, independentemente da gravidade da albuminúria inicial. Aos 6 meses, nos doentes que apresentavam macroalbuminúria observou-se uma diminuição dos valores de  $1263 \pm 492$  mg para  $561 \pm 89$  mg. Histologicamente, a inibição de DPP-4 reduziu significativamente a presença de glomerulosclerose, o que foi associado à diminuição dos níveis de  $TNF-\alpha$ . Estes

resultados sugerem que a sitagliptina reduz a albuminúria sem reduzir diretamente a taxa de filtração de glomerular, mas através de outros fatores como redução da glicémia, pressão arterial e inflamação mediados por aumento de GLP-1.<sup>84</sup>

Um estudo não randomizado investigou o efeito de 4 semanas de administração de sitagliptina e alogliptina em 12 doentes com DM2 e microalbuminúria também tratados com um antagonista dos recetores da angiotensina (ARA). Esta investigação tinha como objetivo compreender se o tratamento com um inibidor DPP-4 com ação mais potente (alogliptina), era superior ao tratamento com sitagliptina. Os autores observaram que o inibidor DPP-4 mais potente diminuiu de forma mais significativa os níveis de albuminúria, marcadores de stress oxidativo, AMPc urinário e elevou os níveis plasmáticos de SDF-1 $\alpha$ . No entanto, não se observaram alterações significativas do índice de massa corporal, pressão arterial, dislipidémia, creatinina plasmática, taxa de filtração glomerular ou dos níveis de HbA1c. Este resultado sugere que, quanto mais potente for a inibição da enzima DPP-4, maior a proteção contra nefropatia diabética, mesmo nos estádios iniciais. Este efeito parece ir para além da diminuição dos valores de glicémia, sugerindo um papel de outras moléculas, nomeadamente o SDF-1 $\alpha$ .<sup>85</sup>

## **9.2 Vildagliptina**

Em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, o tratamento com vildagliptina durante 24 semanas diminuiu a albuminúria e a razão albumina urinária/creatinina em comparação com placebo. A nível histológico, observou-se uma diminuição dependente da dose da expansão da matriz extracelular, assim como uma redução da glomeruloesclerose e do espessamento da membrana basal glomerular. Estes efeitos renoprotetores da vildagliptina foram atribuídos a uma redução da produção de TGF- $\beta$ 1. Contudo, como os níveis de HbA1c no grupo tratado com vildagliptina foram significativamente menores (10.4%) do que no

grupo controlo (12,1%), não é possível garantir que estes efeitos tenham sido independentes do controlo glicémico .<sup>86</sup>

Colocou-se a hipótese de que o tratamento com vildagliptina pudesse melhorar a função miogénica das artérias renais. Para tal, foram isoladas artérias renais de ratos diabéticos Zucker magros tratados com vildagliptina e com placebo. A vildagliptina não afetou a glicémia nem a albuminúria, mas diminuiu de forma efetiva a glomeruloesclerose e restaurou a função contráctil das artérias renais. Este estudo sugere que a vildagliptina possa ter um efeito protetor prevenindo a perda de reatividade vascular, possivelmente pela redução dos níveis de stress oxidativo.<sup>87</sup>

### **9.3 Linagliptina**

Um estudo procurou avaliar os efeitos do tratamento com linagliptina na lesão renal presente em ratos com diabetes induzida por estrptozotocina. Apesar do tratamento com linagliptina durante 2 semanas não ter melhorado o controlo glicémico dos ratos, foi registada uma redução significativa dos níveis de AGE e da expressão do seu recetor, assim como dos marcadores de stress oxidativo. O tratamento com linagliptina também reduziu o grau de albuminúria, assim como os níveis de ICAM-1 e a infiltração glomerular por linfócitos.<sup>88</sup>

A necessidade de encontrar novas terapêuticas para melhorar o tratamento da nefropatia diabética é maior em doentes que não respondem adequadamente ao tratamento com ARA. Por este motivo, investigou-se o efeito da administração de linagliptina em monoterapia e em combinação com telmisartam (ARA) em ratinhos diabéticos desprovidos de sintetase do óxido nítrico endotelial. Após 12 semanas, verificou-se que a glicémia era semelhante em todos os grupos. O grupo tratado apenas com telmisartan apresentou uma redução significativa da pressão arterial, relativamente ao grupo controlo. O tratamento combinado reduziu a albuminúria de forma significativa em comparação com o grupo



controle, enquanto a redução conseguida pelo tratamento em monoterapia com telmisartan ou com linagliptina, não foi estatisticamente significativa. A análise histológica, revelou que o tratamento com linagliptina em monoterapia ou em combinação com telmisartam reduziu a presença de glomerulosclerose, em comparação aos grupos não tratados com inibidor DPP-4. Os marcadores de stress oxidativo também estavam diminuídos nos animais tratados com linagliptina, o que mais uma vez veio demonstrar o potencial dos inibidores DPP-4 no tratamento da nefropatia diabética.<sup>85</sup>

Uma investigação que abrangeu 217 indivíduos com DM2 e albuminúria tratados com um inibidor do SRAA procurou compreender se a adição de linagliptina se traduzia numa melhoria da função renal, nomeadamente ao nível da excreção de albumina. Após 24 semanas, verificou-se que independentemente dos níveis de glicémia ou de pressão arterial o grupo tratado com linagliptina apresentou uma redução da excreção de albuminúria de 32%, em comparação com a redução de 6% verificada no grupo placebo.<sup>89</sup>

Apesar de nenhum dos estudos ter sido concebido para testar o efeito da linagliptina na função e histologia renal, coletivamente todos sugerem a presença de um efeito renoprotetor.

#### **9.4 Saxagliptina**

No estudo SAVOR-TIMI 53 investigou-se o efeito da saxagliptina na função renal. A administração de saxagliptina durante 2 anos diminuiu a excreção de albumina em 27 doentes com DM2 e complicações cardiovasculares, independentemente da função renal inicial. Nos doentes tratados com o fármaco também se observou uma diminuição da glicémia e por esse motivo, não ficou claro se o efeito observado se deveu a uma melhoria significativa no controlo da glicémia, ou à ação renoprotetora do fármaco.<sup>90</sup>

## 10. INIBIDORES DPP-4 E OUTRAS COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES DA DM2

As complicações vasculares relacionadas com a diabetes são uma causa *major* de morbidade e mortalidade em doentes com diabetes.<sup>1,2</sup> A evidência atual sugere que todas as complicações microvasculares partilham o mesmo mecanismo patogénico induzido pela glicémia e que envolve a via do polioliol, a via da proteína cinase C, AGE, a via das hexosaminas e o stress oxidativo.<sup>24</sup>

Sabe-se que o controlo glicémico rigoroso pode prevenir o aparecimento e a progressão das complicações vasculares da diabetes. No entanto, como já foi referido, um controlo rigoroso é difícil de obter e não está indicado em todos os indivíduos diabéticos, devido ao risco de desenvolvimento de hipoglicémia.<sup>8</sup> Por este motivo e à semelhança do que foi dito para a nefropatia diabética, é importante encontrar alternativas terapêuticas que possam prevenir o aparecimento e melhorar a progressão destas complicações, sem interferir com a glicémia. (**Tabela 3**)

### 10.1 Retinopatia diabética

A retinopatia diabética é uma das principais complicações microvasculares da DM2. Demonstrou-se que a administração de sitagliptina preveniu o aumento da permeabilidade da barreira hemato-retiniana e da produção de IL 1 $\beta$ , em retinas de animais com diabetes induzida por STZ.<sup>91</sup> Com base nesse pressuposto, procurou-se avaliar o efeito da sitagliptina na modulação da resposta pro-inflamatória induzida por LPS, em culturas primárias de células da retina de ratos Wistar. (**Anexo**)

Em ratos Zucker diabéticos e obesos, a administração de sitagliptina preveniu as alterações nas proteínas da junção de oclusão, induzidas pela diabetes. A administração deste fármaco também diminuiu o stress oxidativo, o estado inflamatório, a morte celular por

apoptose nas retinas dos animais diabéticos e aumentou a capacidade de adesão das células estaminais endoteliais aos vasos da retina.<sup>91</sup> O mesmo grupo de investigadores procurou descobrir se o efeito protetor exercido pela sitagliptina nas retinas de animais diabéticos era independente do aumento da secreção de insulina e da normalização da glicémia. A administração de sitagliptina em ratos com DM induzida por STZ, impediu o aumento da permeabilidade da barreira hematorretiniana, o desenvolvimento de alterações nas proteínas da junção de oclusão, diminuiu os marcadores de inflamação e a apoptose celular. Ao contrário do estudo anterior, neste caso o tratamento com sitagliptina não alterou o peso corporal, nem os níveis de insulina ou de HbA1c.<sup>92</sup>

Num estudo recente duplamente cego realizado em 50 doentes com DM2, o tratamento com saxagliptina durante 6 semanas reduziu de forma significativa o fluxo sanguíneo capilar na retina e melhorou a capacidade de vasodilatação arterial. No entanto, mais uma vez, verificou-se uma redução significativa dos níveis de HbA1c entre os dois grupos comparados.<sup>93</sup>

## **10.2 Neuropatia diabética**

O envolvimento do sistema nervoso periférico é uma importante complicação da DM2.<sup>3</sup> Vários estudos demonstraram que os efeitos benéficos do GLP-1 e GIP no sistema nervoso periférico podem ter implicações terapêuticas no tratamento da neuropatia diabética. A administração de PKF275-055, um análogo da vildagliptina, aumentou em 50% a velocidade condução nervosa e a recuperação da sensibilidade mecânica, em ratos diabéticos.<sup>94</sup> A vildagliptina também demonstraram ter um efeito protetor contra a perda de fibras nervosas em animais diabéticos.<sup>95</sup> Com base nestes resultados, é legítimo colocar a hipótese de que os inibidores DPP-4 podem prevenir a degeneração nervosa periférica em animais diabéticos e que no futuro podem ser úteis no tratamento da neuropatia diabética.

	Experimental		Clínico		
	Modelo	Resultado	Fármaco/doentes	Resultado	
Nefropatia	Ratos diabéticos por STZ desprovidos de DPP-4	↓ TFG	Sitagliptina 36 doentes DM2	↓ Albuminúria	
	Sitagliptina Ratos diabéticos Zucker	↓ Lesões glomerulares, tubulointersticiais e vasculares	Alogliptina vs sitagliptina 12 doentes DM2	↓ Albuminúria	
	Sitagliptina Ratos diabéticos Zucker obesos	↓ Lesões glomerulares e tubulointersticiais ↓ Apoptose	Vildagliptina 47 doentes DM2	↓ Albuminúria	
	Sitagliptina Lesão isquémia/reperfusão Ratos com diabetes STZ	↓ TGF ↓ Stress Oxidativo ↓ Lesão do tecido	Linagliptina vs Placebo 217 doentes DM2 + micro/macroalbuminuria	↓ Albuminúria	
	Linagliptina+Telmisartan Ratinho com diabetes STZ eNOS-/-	↓ Albuminúria ↓ Glomeruloesclerose	Saxagliptina vs Placebo >16,000 doentes DM2	↓ Microalbuminúria	
	Linagliptina Ratos diabéticos STZ	↓ AGE e RAGE ↓ Stress oxidativo ↓ Albuminúria ↓ Glomeruloesclerose			
	Vildagliptina Ratos diabéticos STZ	↓ TFG ↓ Albuminúria ↓ Glomeruloesclerose ↓ Fibrose Intersticial			
	Vildagliptina Ratos diabéticos Zucker obesos	↓ Glomeruloesclerose ↑ Função arteriolar ↓ Stress oxidativo			
	Retinopatia	Sitagliptina Ratos diabéticos Zucker obesos	↓ Stress oxidativo ↓ Inflamação ↓ Apoptose ↓ Alterações da BHR ↑ EPC	Saxagliptina vs Placebo 50 doentes DM2 sem retinopatia	↓ Fluxo sanguíneo ↑ Vasodilatação
		Sitagliptina Ratos diabéticos STZ	↑ Permeabilidade ↓ Mudanças BHR ↓ Inflamação ↓ Apoptose		
Vildagliptina em OLETF ratos com DM2		↓ VEGF, ICAM-1, ↓ PAI-1 e PEGF			
Neuropatia	Vildagliptina em ratos STZ diabéticos	↓ Perda de fibras nervosas			
	PKF275-055 Ratos com diabetes STZ	↓ Velocidade de condução nervosa ↑ Sensibilidade mecânica e térmica	Sem dados		

**Tabela 3 – Inibidores DPP-4 nas complicações microvasculares da DM2: Estudos pré-clínicos e clínicos. Adaptado de [4]**

## ❖ DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A nefropatia diabética continua a ser uma das principais complicações da diabetes e é a principal causa de doença renal crónica em estágio terminal, em Portugal. Esta patologia é responsável por um aumento da morbilidade e mortalidade nos doentes diabéticos e por custos económicos elevados para os sistemas de saúde.

O tratamento atual da nefropatia diabética desacelera a progressão da lesão renal, mas não impede que a maioria dos doentes desenvolva doença renal crónica. Os fármacos utilizados atuam no controlo dos fatores de risco hemodinâmicos e metabólicos e são claramente insuficientes. O controlo glicémico rigoroso, por exemplo, não se tem revelado uma estratégia eficaz, já que é difícil de atingir devido à falta de adesão à terapêutica e ao facto de não poder ser aplicado a todos os doentes, já que envolve um risco considerável de hipoglicémia. Esta conjuntura leva a que se devam procurar novas estratégias terapêuticas que procurem minorar o dano renal da diabetes. O facto da nefropatia ser considerada atualmente uma doença em que a inflamação também tem um papel importante, abriu portas a vários estudos com fármacos que exercem um efeito imunomodulador. No entanto, nenhum fármaco provou ser realmente eficaz em humanos, sendo necessários mais estudos. Uma das classes de fármacos que suscita mais curiosidade, são os inibidores da DPP-4 que já são usados habitualmente na terapêutica da DM, são considerados seguros e bem tolerados. Como vários estudos indicam que estes fármacos exercerem efeitos pleiotrópicos, alguns dos quais independentes das incretinas e relacionados com a interação com vários peptídeos vasoativos, colocou-se a hipótese do seu uso na prevenção e tratamento direto das complicações vasculares da DM.

No sentido de confirmar esta possibilidade, vários estudos têm sido realizados. Por um lado, tem se procurado compreender melhor quais são os efeitos dependentes e independentes

das incretinas. Para tal, é importante compreender quais são os outros peptídeos clivados pela DPP-4 e qual o seu efeito fisiológico. Têm sido identificados vários peptídeos, mas pouco se sabe sobre os seus efeitos, já que muitas vezes propriedades que se verificam *in vitro*, não se verificam *in vivo*. Esta também é uma das limitações dos vários estudos realizados em modelo animal: muitas vezes é difícil atingir concentrações renais em humanos semelhantes às que se obtém em modelos experimentais. Os peptídeos que parecem ter um maior efeito a nível renal são a Meprina $\beta$ , o HMGB1, o NPY e o PYY, mas ainda muito falta descobrir sobre a sua ação, pelo que, mais estudos são necessários.

Outra das limitações da evidência atual, é o facto de a maioria dos estudos realizados ainda serem pré-clínicos. Para além disso, muitas das investigações não permitem saber se os efeitos dos fármacos são dependentes ou independentes das incretinas, já que os níveis de HbA1c e de pressão arterial também sofreram alterações. É importante que se desenhem mais estudos que procurem eliminar esta variável, o que tem sido conseguido com a utilização de modelos com diabetes mellitus tipo 1, no qual o pâncreas não responde ao estímulo das incretinas. Relativamente aos estudos clínicos realizados, raros foram os que foram concebidos para avaliar especificamente o efeito dos inibidores DPP-4 no rim. Por este motivo, é importante que sejam construídos estudos com este fim específico.

Para além da nefropatia diabética, outras complicações da diabetes parecem ser melhoradas com o tratamento com estes fármacos. Este fato, vem reforçar a conceção de que o mecanismo que induz complicações vasculares é semelhante nos vários tecidos. O efeito dos inibidores DPP-4 na retinopatia diabética é investigado na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por um grupo de excelência, o qual tive oportunidade de acompanhar durante um ano, tendo a oportunidade de realizar um pequeno estudo que apresento em anexo.

Em conclusão, a evidência atual indica que os inibidores DPP-4 podem ter um efeito protetor nas complicações da DM, nomeadamente na nefropatia diabética. No entanto, ainda não é possível tirar conclusões seguras sobre se este efeito irá ter implicações na terapêutica futura da nefropatia diabética, já que resultados atuais são incipientes. Por este motivo, é muito importante que se continue a investigar esta área, investindo inclusive, em mais estudos clínicos.

## ❖ AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Professora Doutora Leonor Gomes, minha orientadora, pela disponibilidade sempre demonstrada para esclarecer todas as minhas dúvidas e para proceder à correção científica deste trabalho. Sem a sua sábia orientação teria sido impossível chegar a este resultado final.

Dedico este trabalho ao meu avô Mário Rodrigues, que foi diabético durante cerca de 30 anos e que foi motivo pelo qual escolhi este tema para este artigo de revisão. Fica para sempre o seu apoio incondicional e a forma orgulhosa como via o meu trabalho.

Agradeço também ao meu núcleo familiar mais próximo, os meus pais e a minha avó, que são o meu porto de abrigo em todos os momentos. Não tenho dúvidas de que, é a eles, que devo muito do que consegui alcançar até hoje.

Por último, mas não menos importante, deixo uma palavra especial aos meus amigos, por terem a palavra de incentivo certa, no momento certo e por compreenderem as minhas ausências. Agradeço ainda aos meus colegas que se tornaram também amigos e com os quais partilhei ao longo destes anos muitos momentos de estudo, bem como muitos momentos de diversão.



## ❖ REFERÊNCIAS

1. *International Diabetes Federation Atlas*, 2014.
2. *Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, Portugal. Diabetes: Factos e Números 2014*.
3. Seino, Y. and D. Yabe, *Glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas*. *J Diabetes Investig*, 2013. **4**(2): p. 108-30.
4. Avogaro, A. and G.P. Fadini, *The effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on microvascular diabetes complications*. *Diabetes Care*, 2014. **37**(10): p. 2884-94.
5. Nefrologia, S.P.d., *Relatório do Gabinete de Registo da Sociedade de Portuguesa de Nefrologia*. 2013.
6. Wolf, G., *New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology*. *Eur J Clin Invest*, 2004. **34**(12): p. 785-96.
7. Pugliese, G., *Updating the natural history of diabetic nephropathy*. *Acta Diabetol*, 2014. **51**(6): p. 905-15.
8. *KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update*. *Am J Kidney Dis*, 2012. **60**(5): p. 850-86.
9. Omar, B. and B. Ahren, *Pleiotropic mechanisms for the glucose-lowering action of DPP-4 inhibitors*. *Diabetes*, 2014. **63**(7): p. 2196-202.
10. Mulvihill, E.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors*. *Endocr Rev*, 2014. **35**(6): p. 992-1019.
11. Karagiannis, T., P. Boura, and A. Tsapas, *Safety of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: a perspective review*. *Ther Adv Drug Saf*, 2014. **5**(3): p. 138-46.
12. Tanaka, T., et al., *The potential for renoprotection with incretin-based drugs*. *Kidney Int*, 2014. **86**(4): p. 701-11.

13. Muskiet, M.H., et al., *The gut-renal axis: do incretin-based agents confer renoprotection in diabetes?* Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(2): p. 88-103.
14. White, K.E. and R.W. Bilous, *Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 1 disease.* J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1667-73.
15. Tervaert, T.W., et al., *Pathologic classification of diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 556-63.
16. Helal, I., et al., *Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications.* Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(5): p. 293-300.
17. Blantz, R.C. and P. Singh, *Glomerular and tubular function in the diabetic kidney.* Adv Chronic Kidney Dis, 2014. **21**(3): p. 297-303.
18. Kanwar, Y.S., et al., *A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy.* Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 395-423.
19. Duran-Salgado, M.B. and A.F. Rubio-Guerra, *Diabetic nephropathy and inflammation.* World J Diabetes, 2014. **5**(3): p. 393-8.
20. Fornoni, A., et al., *Role of inflammation in diabetic nephropathy.* Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(1): p. 10-7.
21. Mima, A., *Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: new insights on its inhibition as new therapeutic targets.* J Diabetes Res, 2013. **2013**: p. 248563.
22. Navarro-Gonzalez, J.F., et al., *Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy.* Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(6): p. 327-40.
23. Shikata, K. and H. Makino, *Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy.* J Diabetes Investig, 2013. **4**(2): p. 142-9.
24. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications.* Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1058-70.

25. Chung, S.S., et al., *Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S233-6.
26. Tan, A.L., J.M. Forbes, and M.E. Cooper, *AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy*. Semin Nephrol, 2007. **27**(2): p. 130-43.
27. Catania, J.M., G. Chen, and A.R. Parrish, *Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(3): p. F905-11.
28. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
29. Navarro, J.F., et al., *Tumor necrosis factor-alpha gene expression in diabetic nephropathy: relationship with urinary albumin excretion and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition*. Kidney Int Suppl, 2005(99): p. S98-102.
30. Lozano-Nuevo, J.J., et al., *Correlation between circulating adhesion molecules and resistin levels in hypertensive type-2 diabetic patients*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2011. **10**(1): p. 27-31.
31. You, H., et al., *Macrophages directly mediate diabetic renal injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(12): p. F1719-27.
32. Fioretto, P. and M. Mauer, *Histopathology of diabetic nephropathy*. Semin Nephrol, 2007. **27**(2): p. 195-207.
33. Schernthaner, G. and G.H. Schernthaner, *Diabetic nephropathy: new approaches for improving glycemic control and reducing risk*. J Nephrol, 2013. **26**(6): p. 975-85.
34. Jerums, G., et al., *Integrating albuminuria and GFR in the assessment of diabetic nephropathy*. Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(7): p. 397-406.
35. Basi, S., et al., *Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander?* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S194-201.

36. Kramer, H.J., et al., *Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus*. *Jama*, 2003. **289**(24): p. 3273-7.
37. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
38. *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*. Update. DCCT Research Group. *Diabetes Care*, 1990. **13**(4): p. 427-33.
39. Holman, R.R., et al., *10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(15): p. 1577-89.
40. Yamagishi, S. and T. Matsui, *Pleiotropic effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-based therapies on vascular complications in diabetes*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(38): p. 4379-85.
41. Utimura, R., et al., *Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes*. *Kidney Int*, 2003. **63**(1): p. 209-16.
42. Roozbeh, J., et al., *Captopril and combination therapy of captopril and pentoxifylline in reducing proteinuria in diabetic nephropathy*. *Ren Fail*, 2010. **32**(2): p. 172-8.
43. Davila-Esqueda, M.E., A.A. Vertiz-Hernandez, and F. Martinez-Morales, *Comparative analysis of the renoprotective effects of pentoxifylline and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus*. *Ren Fail*, 2005. **27**(1): p. 115-22.
44. Neumiller, J.J., *Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors*. *J Am Pharm Assoc* (2003), 2009. **49 Suppl 1**: p. S16-29.

45. Park, C.W., et al., *Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1227-38.
46. Kodera, R., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes*. Diabetologia, 2011. **54**(4): p. 965-78.
47. Hendarto, H., et al., *GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases*. Metabolism, 2012. **61**(10): p. 1422-34.
48. Tasyurek, H.M., et al., *Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus*. Diabetes Metab Res Rev, 2014. **30**(5): p. 354-71.
49. Campbell, J.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 819-37.
50. Christensen, M., et al., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: a bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans*. Diabetes, 2011. **60**(12): p. 3103-9.
51. Ahren, B., et al., *Vildagliptin enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1236-43.
52. Panchapakesan, U., A. Mather, and C. Pollock, *Role of GLP-1 and DPP-4 in diabetic nephropathy and cardiovascular disease*. Clin Sci (Lond), 2013. **124**(1): p. 17-26.
53. von Websky, K., C. Reichetzedder, and B. Hocher, *Physiology and pathophysiology of incretins in the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(1): p. 54-60.
54. Vilsboll, T., et al., *Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients*. Diabetes, 2001. **50**(3): p. 609-13.

55. Yang, J., et al., *Increase in DPP-IV in the intestine, liver and kidney of the rat treated with high fat diet and streptozotocin*. Life Sci, 2007. **81**(4): p. 272-9.
56. Ryskjaer, J., et al., *Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(3): p. 485-93.
57. Vallon, V. and N.G. Docherty, *Intestinal regulation of urinary sodium excretion and the pathophysiology of diabetic kidney disease: a focus on glucagon-like peptide 1 and dipeptidyl peptidase 4*. Exp Physiol, 2014. **99**(9): p. 1140-5.
58. Girardi, A.C., et al., *Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(2): p. F414-22.
59. Skov, J., *Effects of GLP-1 in the kidney*. Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(3): p. 197-207.
60. Fujita, H., et al., *The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential*. Kidney Int, 2014. **85**(3): p. 579-89.
61. Hirata, K., et al., *Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(1): p. 44-9.
62. Kirino, Y., et al., *Interrelationship of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) with the development of diabetes, dyslipidaemia and nephropathy: a streptozotocin-induced model using wild-type and DPP4-deficient rats*. J Endocrinol, 2009. **200**(1): p. 53-61.
63. Sun, A.L., et al., *Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease*. Diab Vasc Dis Res, 2012. **9**(4): p. 301-8.
64. Mima, A., *Diabetic nephropathy: protective factors and a new therapeutic paradigm*. J Diabetes Complications, 2013. **27**(5): p. 526-30.

65. Barnett, A.H., *Linagliptin: a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with a unique place in therapy*. Adv Ther, 2011. **28**(6): p. 447-59.
66. Omar, B.A., et al., *Enhanced beta cell function and anti-inflammatory effect after chronic treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in an advanced-aged diet-induced obesity mouse model*. Diabetologia, 2013. **56**(8): p. 1752-60.
67. Bromage, D.I., S.M. Davidson, and D.M. Yellon, *Stromal derived factor 1alpha: a chemokine that delivers a two-pronged defence of the myocardium*. Pharmacol Ther, 2014. **143**(3): p. 305-15.
68. Iwasaki, T., et al., *Sitagliptin as a novel treatment agent for non-alcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus*. Hepatogastroenterology, 2011. **58**(112): p. 2103-5.
69. Yilmaz, Y., et al., *Effects of sitagliptin in diabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Acta Gastroenterol Belg, 2012. **75**(2): p. 240-4.
70. Holscher, C., *The incretin hormones glucagonlike peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2014. **10**(1 Suppl): p. S47-54.
71. Darsalia, V., et al., *The DPP-4 inhibitor linagliptin counteracts stroke in the normal and diabetic mouse brain: a comparison with glimepiride*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1289-96.
72. Zhong, Q., et al., *Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(2): p. E543-8.
73. Tsukiyama, K., et al., *Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(7): p. 1644-51.

74. Glorie, L., et al., *DPP IV inhibitor treatment attenuates bone loss and improves mechanical bone strength in male diabetic rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **307**(5): p. E447-55.
75. Monami, M., et al., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials*. Diabetes Care, 2011. **34**(11): p. 2474-6.
76. Rieg, T., et al., *Natriuretic effect by exendin-4, but not the DPP-4 inhibitor alogliptin, is mediated via the GLP-1 receptor and preserved in obese type 2 diabetic mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(7): p. F963-71.
77. Stokman, G., et al., *SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(12): p. 3852-9.
78. Carmago, S., S.V. Shah, and P.D. Walker, *Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats*. Kidney Int, 2002. **61**(3): p. 959-66.
79. Takayama, J., et al., *Actinonin, a meprin inhibitor, protects ischemic acute kidney injury in male but not in female rats*. Eur J Pharmacol, 2008. **581**(1-2): p. 157-63.
80. Medeiros, P.J. and D.N. Jackson, *Neuropeptide Y Y5-receptor activation on breast cancer cells acts as a paracrine system that stimulates VEGF expression and secretion to promote angiogenesis*. Peptides, 2013. **48**: p. 106-13.
81. Mega, C., et al., *Diabetic nephropathy amelioration by a low-dose sitagliptin in an animal model of type 2 diabetes (Zucker diabetic fatty rat)*. Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 162092.
82. Marques, C., et al., *Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals*. 2014. **2014**: p. 538737.
83. Vaghasiya, J., et al., *Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes*. Regul Pept, 2011. **166**(1-3): p. 48-54.



84. Hattori, S., *Sitagliptin reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes*. *Endocr J*, 2011. **58**(1): p. 69-73.
85. Fujita, H., et al., *DPP-4 inhibition with alogliptin on top of angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates albuminuria via up-regulation of SDF-1alpha in type 2 diabetic patients with incipient nephropathy*. *Endocr J*, 2014. **61**(2): p. 159-66.
86. Liu, W.J., et al., *Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. **340**(2): p. 248-55.
87. Vavrinec, P., et al., *Vildagliptin restores renal myogenic function and attenuates renal sclerosis independently of effects on blood glucose or proteinuria in Zucker diabetic fatty rat*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014. **12**(6): p. 836-44.
88. Nakashima, S., et al., *Linagliptin blocks renal damage in type 1 diabetic rats by suppressing advanced glycation end products-receptor axis*. *Horm Metab Res*, 2014. **46**(10): p. 717-21.
89. Groop, P.H., et al., *Linagliptin lowers albuminuria on top of recommended standard treatment in patients with type 2 diabetes and renal dysfunction*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(11): p. 3460-8.
90. Udell, J.A., et al., *Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Moderate or Severe Renal Impairment: Observations From the SAVOR-TIMI 53 Trial*. *Diabetes Care*, 2014.
91. Goncalves, A., et al., *Protective effects of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin in the blood-retinal barrier in a type 2 diabetes animal model*. *Diabetes Obes Metab*, 2012. **14**(5): p. 454-63.
92. Goncalves, A., et al., *Dipeptidyl peptidase-IV inhibition prevents blood-retinal barrier breakdown, inflammation and neuronal cell death in the retina of type 1 diabetic rats*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(9): p. 1454-63.

93. Ott, C., et al., *Effects of saxagliptin on early microvascular changes in patients with type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 19.
94. Bianchi, R., et al., *Beneficial effects of PKF275-055, a novel, selective, orally bioavailable, long-acting dipeptidyl peptidase IV inhibitor in streptozotocin-induced diabetic peripheral neuropathy*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **340**(1): p. 64-72.
95. Jin, H.Y., et al., *Effect of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor (Vildagliptin) on peripheral nerves in streptozotocin-induced diabetic rats*. Arch Med Res, 2009. **40**(7): p. 536-44.

## ❖ ANEXO

Protocolo do trabalho “Papel da sitagliptina na modelação da resposta pro-inflamatória em culturas primárias mistas de células de retina”

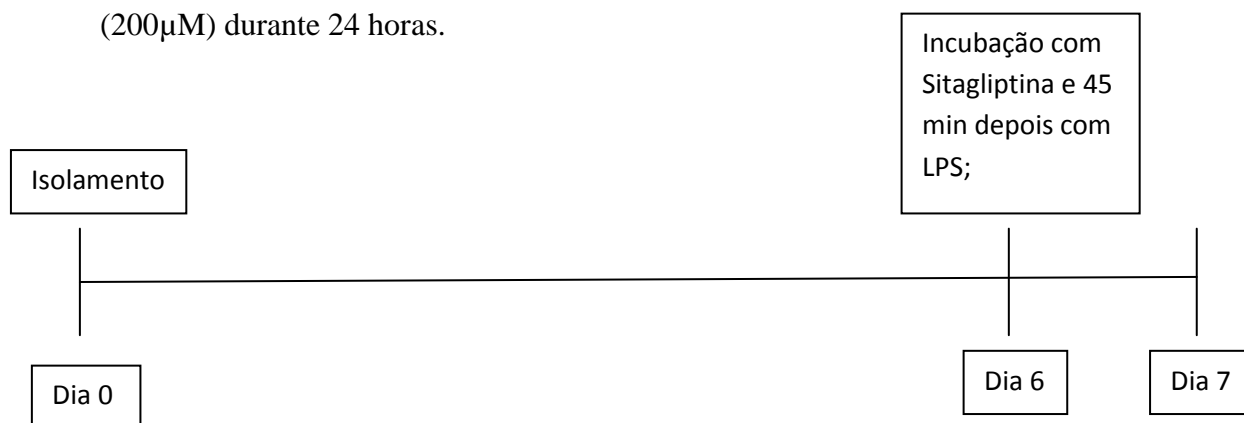
### Objectivos

O objectivo deste trabalho consiste em avaliar o efeito da sitagliptina sobre culturas primárias mistas de células de retina. Este estímulo pro-inflamatório, permite simular a inflamação provocada pela hiperglicémia prolongada nas células da retina, como acontece na fisiopatologia da retinopatia diabética. Com este trabalho, pretendemos aumentar o conhecimento sobre os efeitos farmacológicos da sitagliptina para além do seu efeito normoglicemiante, para o qual é comercializada actualmente, podendo no futuro abrir portas a novas investigações, com vista a terapêuticas inovadoras.

### Plano de investigação

**Tarefa 1** – Compreender qual é o papel da sitagliptina na modulação da resposta pro-inflamatória, em culturas primárias mistas de células de retina.

- ✓ As culturas primárias mistas de células da retina, obtidas a partir de ratos Wistar P3/P4. As células serão expostas a LPS (1µg/mL) durante 24 horas, para despoletar uma resposta inflamatória, tendo sido 45 minutos antes, incubadas com sitagliptina (200µM) durante 24 horas.



✓ Realização de protocolo de imunohistoquímica utilizando como anticorpos primários:

- Anti-CD11b
- Anti-iNOS

## **Materiais e Métodos**

- *Culturas primárias mistas de células de retina*

As culturas primárias mistas de células de retina foram preparadas a partir de retinas de ratos Wistar P3/P4. Os ratos foram mortos por decapitação e após enucleação, as retinas foram dissecadas em *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS in mM: 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.45 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.34 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose; pH 7.4).

As retinas foram digeridas com 0.1% tripsina, durante 12 minutos, a 37°C. Seguidamente, a suspensão celular foi centrifugada e as células foram ressuspensas em *Eagle's Minimum Essential Medium*, (MEM em mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 10%, FBS inativado pelo calor, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml)).

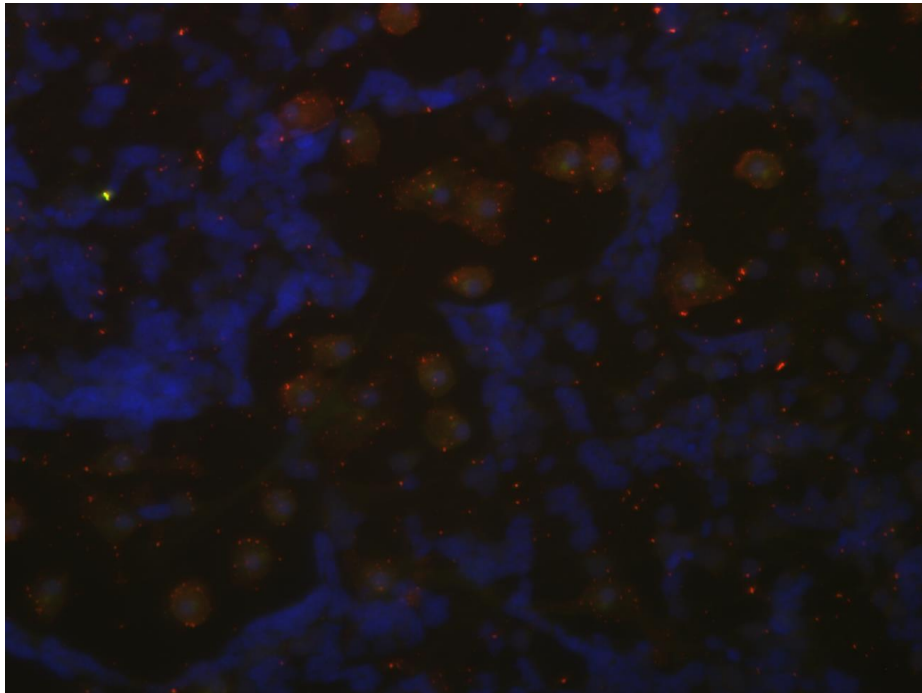
As células foram colocadas com uma densidade de 2x10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup>, em 12-placas para imunohistoquímica. As lamelas foram pré-cobertas com poly-D-lysine (0.1 mg/ml) e mantidas a 37°C em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>, durante 7 dias.

As culturas primárias mistas de células da retina contém células da microglia, astrócitos, células de Müller e neurónios da retina.

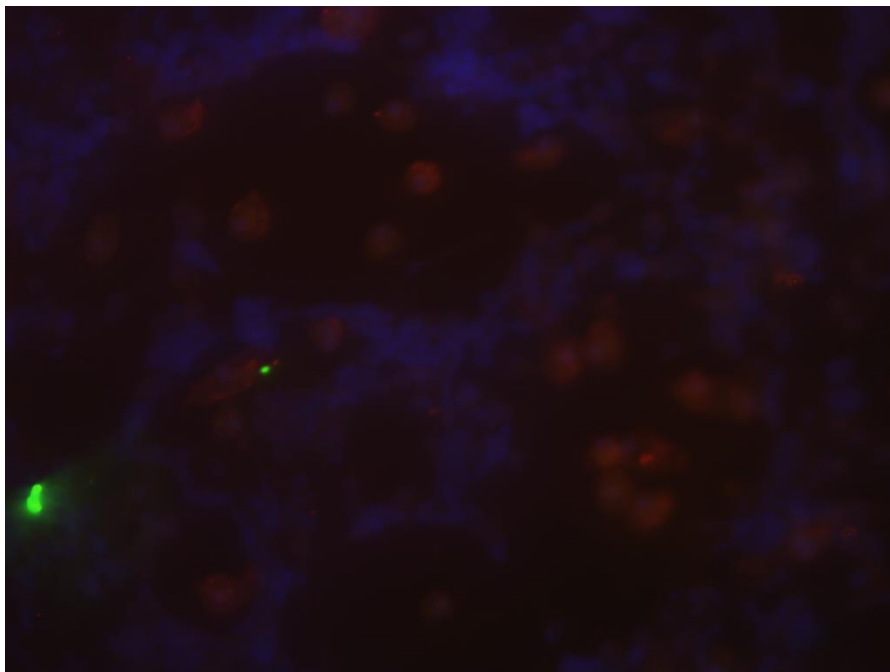
- *Protocolo de Imunohistoquímica*

- ✓ Removeu-se o meio de cultura e lavou-se duas vezes com PBS (em mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4)
- ✓ Fixou-se em Paraformaldeído com 4% sacarose, durante 10 minutos.
- ✓ Permeabilizaram-se as células com PBS adicionado de 1% Triton X-100, durante 5 minutos.
- ✓ Bloquearam-se as células com PBS + 3% albumina + 0.2% Tween 20, durante 1 hora, à temperatura ambiente.
- ✓ Incubaram-se as células com os anticorpos primários anti-Cd11b rato (diluição 1:100), anti-iNOS (diluição 1:100), durante 90 minutos, à temperatura ambiente no escuro.
- ✓ Após a lavagem com a solução de bloqueio, incubaram-se os anticorpos secundários, Alexa Fluor-568 goat anti-mouse IgG (diluição 1:200), Alexa-Fluor-488 goat anti-rabbit IgG (diluição de 1:200) durante 1 hora, no escuro.
- ✓ Lavou-se três vezes com PBS.
- ✓ Células foram incubadas com DAPI (diluição 1:2000) durante 10 minutos, à temperatura ambiente
- ✓ Montaram-se as lamelas nas lâminas utilizando *DAKO Glycergel Mounting Médium*.

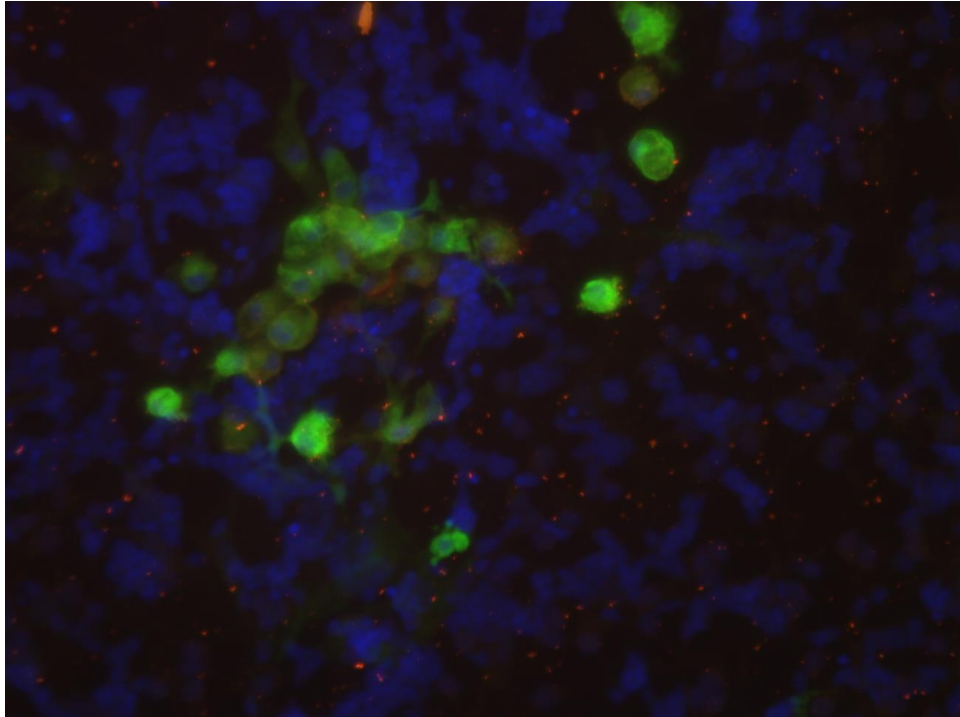
## Resultados obtidos



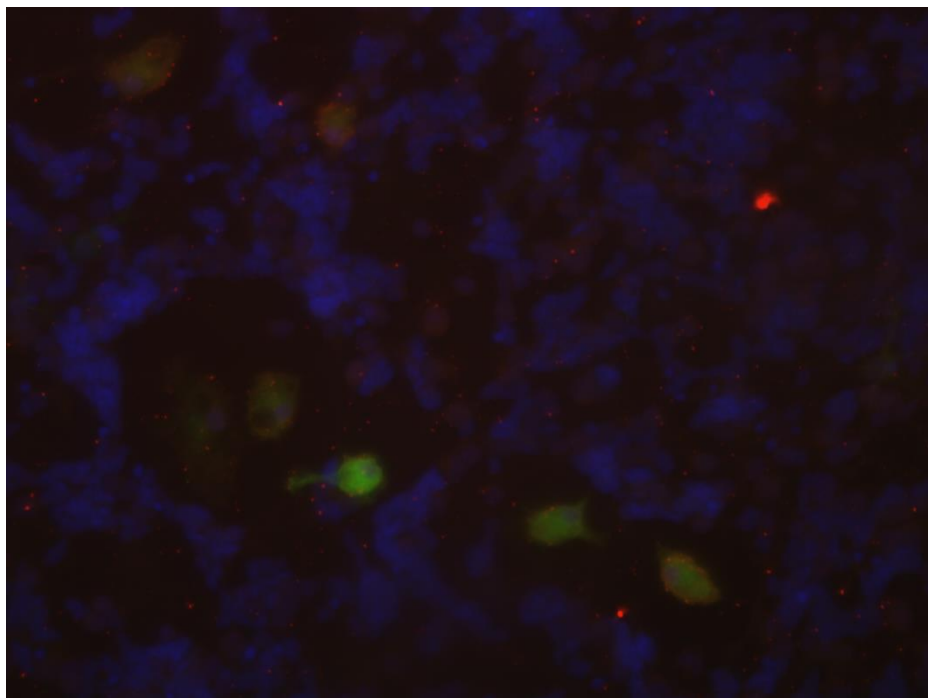
**Figura 1-** Cultura Controle (Não foi incubada nem com sitagliptina nem com LPS). Imagem de imunohistoquímica obtida utilizando um microscópio de fluorescência. Anti- CD11b (vermelho), Anti-iNOS (verde), DAPI (azul).



**Figura 2** - Cultura incubada Sitagliptina. Imagem de imunohistoquímica obtida utilizando um microscópio de fluorescência. Anti- CD11b (vermelho), Anti-iNOS (verde), DAPI (azul).



**Figura 3** - Cultura incubada com LPS. Imagem de imunohistoquímica obtida utilizando um microscópio de fluorescência. Anti- CD11b (vermelho), Anti-iNOS (verde), DAPI (azul).



**Figura 4** - Cultura incubada com Sitagliptina e LPS. Imagem de imunohistoquímica obtida utilizando um microscópio de fluorescência. Anti- CD11b (vermelho), Anti-iNOS (verde), DAPI (azul).

## **Discussão e Conclusão**

Com o presente trabalho, demonstrámos que a incubação com sitagliptina diminui a resposta pro-inflamatória por parte das células da microglia e mediada por óxido nítrico. No futuro seria importante estudar o efeito da incubação com sitagliptina na modulação da resposta pro-inflamatória, utilizando outros marcadores inflamatórios.

A confirmação desta evidência, pode abrir portas a estudos posteriores que poderão culminar numa nova utilização terapêutica da sitagliptina e num retardar da progressão da retinopatia diabética.