



2014

A influência da sitagliptina no vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de rato: comparação com um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 1

Maria Teresa Franco



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A influência da sitagliptina no vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de rato: comparação com um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 1

Maria Teresa Franco

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A influência da sitagliptina no vasorrelaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de rato: comparação com um modelo animal de Diabetes *Mellitus* tipo 1

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Silva Santos (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Ângelo Tomé (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Maria Teresa Franco

2014



Trabalho realizado no:

Serviço de Farmacologia e Terapêutica Experimental do Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

"There's a universal truth we all have to face...whether we want to or not. Everything eventually ends. As much as I've looked forward to this day, I've always disliked endings...the last day of summer...the final chapter of a great book...parting ways with a close friend. But endings are inevitable. Leaves fall. You close the book. You say good-bye. Today is one of those days for us. Today we say goodbye to everything that was familiar, everything that was comfortable. We're moving on. But just because we're leaving, and that hurts, there's some people who are so much a part of us, they'll be with us no matter what. They are our solid ground. Our North Star. And the small clear voices in our hearts that will be with us ... always."

Andrew W. Marlowe

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, ao longo do meu percurso académico me ajudaram, directa ou indirectamente, a alcançar os meus objectivos e a concretizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo aqui algumas palavras, com um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À Professora Doutora Sónia Santos, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientadora desta tese de mestrado, pela confiança que depositou em mim, por me ter recebido no seu laboratório no ano em que iniciei o projecto de licenciatura, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela orientação e total disponibilidade, a atenção, motivação e preocupação demonstradas, pelas críticas construtivas e por me ajudar na resolução dos problemas nos mais diversos momentos. Agradeço ainda pelos bons momentos que partilhámos em laboratório, pelas conversas de gabinete, pela sua paciência e compreensão, especialmente neste último ano e sobretudo pela amizade.

À professora Doutora Rosa Fernandes, docente do departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço profundamente por me ter permitido o acesso ao seu laboratório, por todo o material gentilmente cedido para este projecto científico, pelo tempo, confiança e preocupação demonstradas sempre que alguma dúvida surgia e ainda por todas as sugestões e os ensinamentos transmitidos.

Um agradecimento especial ao Doutor Francisco Ambrósio, pelo apoio prestado e materiais cedidos, cruciais para a realização deste projecto, e à Filipa Baptista por todo o apoio e ensinamentos que me transmitiu, por me ter ensinado e ajudado quando mais precisei e cujo apoio foi fundamental para que pudesse realizar este meu trabalho. Por me ter recebido no seu laboratório, pela paciência que teve comigo e por me ter ajudado a ganhar confiança e destreza na execução do trabalho experimental, um grande obrigada!

Ao Professor Doutor Carlos Fontes Ribeiro, Director do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço a oportunidade de participar neste projecto de investigação e por me terem sido facultadas todas as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Frederico Pereira, docente da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua atenção e disponibilidade e pelo material cedido para a realização deste projecto.

Ao Professor Doutor Ângelo Tomé, docente do departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e orientador interno desta dissertação de mestrado, agradeço o seu apoio, a orientação prestada, a disponibilidade e a ajuda demonstradas e principalmente a amizade e convívio durante todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Lina Carvalho, Directora do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e suas colaboradoras, Teresa Ferreira e Maria João D'Aguiar, pela disponibilidade demonstrada e cujo contributo técnico-científico foi fundamental quer na realização dos cortes histológicos constantes neste trabalho, quer na sua análise patológica.

À Professora Doutora Carla Marques pelo apoio e disponibilidade demonstrados e pelos ensinamentos que me transmitiu relativamente à técnica de O.C.T.

Ao Doutor Flávio Reis pela sua atenção e disponibilidade, e pelos conhecimentos transmitidos, particularmente na parte da experimentação animal.

Não posso deixar de mencionar os Professores que mais me acompanharam durante o meu percurso académico: Professora Doutora Margarida Castro e Professor Doutor Rui de Carvalho, docentes do departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, pela transmissão de saberes que me proporcionaram, pelas suas palavras e especialmente pelo seu apoio e compreensão.

À Catarina Marques e à Patrícia Pereira por me terem auxiliado em muitos dos procedimentos experimentais, pela total disponibilidade e paciência demonstradas em todos os momentos e também pelas conversas e transmissão de conhecimentos.

À Joana Francisco, por toda a ajuda que me deu no laboratório, desde o momento que iniciei este projecto, por me ter transmitido todos os seus conhecimentos, pelos bons momentos passados no laboratório, pela sua paciência a ensinar-me e ainda por toda a disponibilidade e auxílio dispensados ainda durante este ano, mesmo estando longe, o meu grande obrigada!

À Andreia Gonçalves pelo apoio e ensinamentos que me transmitiu, particularmente no que remete para a manutenção e experimentação dos animais.

Às minhas colegas de curso e de laboratório Mafalda, Ana Clara e Raquel, que me acompanharam no meu percurso académico, pelos bons momentos passados e pela colaboração na execução da actividade laboratorial. Agradeço especialmente à Inês Pita por me ter transmitido os

seus conhecimentos, pela sua paciência a ensinar-me e por toda a disponibilidade que sempre demonstrou.

A todos os restantes colegas do Serviço de Farmacologia e Terapêutica Experimental por numa ou noutra circunstância me terem ajudado e pela prestabilidade com que o fizeram.

À instituição onde este trabalho se realizou, o IBILI, e em especial ao Serviço de Farmacologia e Terapêutica Experimental.

Agradeço especialmente aos meus Pais, pelo seu amor, dedicação, carinho, apoio, cumplicidade, confiança e motivação incondicional, por terem confiado e acreditado em mim em todos os momentos, por me terem ensinado a lutar, por me apoiarem e impulsionarem na concretização dos meus sonhos, por poder sempre contar convosco para tudo, pela vossa força, por serem o meu suporte emocional e nunca me deixarem desistir mesmo quando tudo parecia desmoronar-se, por nunca terem desistido de mim e por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos. Tenho um enorme orgulho em ser vossa filha! O meu mais sincero obrigado por tudo o que fizeram por mim, pois sem vós nada disto teria sido possível! A Vós, dedico todo este trabalho!

Ao Silvério pela sua amizade, pelo carinho com que sempre me tratou e recebeu, pelas fantásticas reportagens fotográficas ao longo destes últimos anos, pelo seu companheirismo, boa disposição, por todo o apoio, disponibilidade, paciência, preocupação e incentivo ao longo do meu percurso pessoal e académico e por estar presente nos bons e nos maus momentos. Às minhas irmãs Matilde e Carlota, as meninas dos meus olhos, por terem transformado a minha vida, pelo vosso sorriso, por me fazerem rir á gargalhada como ninguém e por me deixarem voltar a ser criança vezes sem conta! Aos meus Avós Lena e Tozé por me terem recebido na sua casa, pela sua amizade, pelo amor, apoio e carinho com que sempre me trataram, pela preocupação e também pela sua paciência e por me terem encorajado e acompanhado durante todo o meu percurso académico, a minha enorme gratidão! À minha Bisavó Natália, pelo seu carinho e ternura, pela sua força e por todos os ensinamentos de vida. À Avó Sónia, aos meus Tios Sizinha e Luís e ao meu Primo Mekito pelo carinho e ternura com que sempre me acolheram na sua casa, pelo seu apoio e amizade, pelas noitadas a jogar canasta, pelas fantásticas tardes passadas na piscina, pelo companheirismo, a alegria, a boa disposição e as gargalhadas que partilhámos e por poder contar sempre convosco. Aos meus Tios Sofia e João e ao meu Primo Pedro pela sua amizade, apoio e motivação, a sua alegria e boa disposição e pelo carinho com que sempre me trataram.

À Alice pela sua amizade, compreensão, pelo carinho e enorme paciência, pela alegria, pelas gargalhadas e brincadeiras, pelo seu companheirismo, e por me ter acompanhado no meu percurso pessoal e académico ao longo destes últimos anos. Aos meus Tios Belinha e Luís e aos meus primos Branquinha e Joe pela sua amizade, pelo carinho e apoio que me deram, pela sua alegria e boa disposição e pelos bons momentos que passámos juntos. À D. Amélia e à D. Graça pelo carinho com quem sempre me acolheram nas suas casas, pelas palavras amigas e ensinamentos de vida. À Alicia pela boa disposição e pelos momentos divertidos que passámos.

Agradeço do fundo do coração aos meus Avós Mariazinha e Albano, os meus segundos Pais, pelo seu amor incondicional e por tudo o que fizeram sempre por mim. Todas as palavras são poucas para agradecer toda a devoção e carinho com que sempre me trataram. Foi um privilégio ter-vos como Avós, sei o quanto gostavam de mim e como era a menina dos vossos olhos...Recordo-vos com muita saudade e nunca esquecerei o vosso sorriso.

Um agradecimento especial à Ana, à Marta, à Ana Sofia e ao João Grandalhão por toda a amizade, por sempre me terem apoiado em todos os bons e maus momentos, por tudo o que partilhámos, pelas conversas intermináveis, por todos os momentos de profundo “esbardalhaço”, pelos jantares, as idas ao Galerias, pela enorme paciência e carinho que sempre demonstraram, por todas as gargalhadas, pelos conselhos, por me fazerem sorrir e nunca me deixarem desistir mesmo nas situações mais difíceis, a vós agradeço profundamente por me terem apoiado ao longo destes últimos anos, pois foram e serão sempre a minha segunda família e sem vós nada disto teria sido possível. O meu mais sincero obrigada!

À Isa e ao André por toda a vossa amizade, pelo apoio e incentivo que sempre me deram, pela alegria e boa disposição, por todos os conselhos e palavras amigas e por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos.

Ao Pedro, um agradecimento especial pelo amor e carinho, pelas palavras doces, pela sua alegria contagiante, pela pessoa que é, por me fazer sorrir e pela transmissão de confiança e de força em todos os momentos, o meu grande Obrigada!

À Marta Dias e à Magali, amigas especiais que embora seguindo percursos académicos diferentes nunca deixaram de estar presentes em todos os momentos importantes, nunca disseram que não a um jantar ou um café para “matar” saudades, por poder contar sempre convosco e pela vossa amizade.

À Sofia e à Daniela, por todos os bons momentos que passámos, pelas gargalhadas, pelos passeios de carro ao som de *pop Teresita*, pelo companheirismo e pela vossa boa disposição.

Não poderia deixar de agradecer à Filipa, que conheço desde sempre, pela sua enorme paciência e sobretudo pela sua amizade.

À Kikinha, à Mimi e à Marisa pelos bons momentos que partilhámos e sobretudo pela amizade.

Ao Nuno, à Guida e ao Miguel pela hospitalidade e carinho com que sempre me receberam na sua casa, pela alegria e boa disposição e pela sua amizade.

E a todas as outras pessoas que directa ou indirectamente colaboraram com o sucesso deste trabalho.

Um grande Muito Obrigada!

Apresentação de Poster

“Influence of sitagliptin on the acetylcholine-induced vasorelaxant effect on isolated rat aorta: comparison with type 1 diabetic Rats”

Teresa Franco, Joana Francisco, Andreia Gonçalves, Flávio Reis, Carlos Fontes Ribeiro, Rosa Fernandes, Sónia Silva

IV Annual Meeting of IBILI, Coimbra 6-7th December, 2012.

Índice

Índice de Figuras	V
Índice de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas	XV
Resumo	XXIII
Abstract	XXVII
Capítulo 1 - Introdução	1
1. Diabetes <i>Mellitus</i>	2
1.1. Definição Geral.....	2
1.2. Caracterização da Diabetes <i>Mellitus</i>	2
1.2.1. Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 1.....	3
1.2.2. Diabetes <i>Mellitus</i> do tipo 2.....	4
1.3. Factores de risco, Epidemiologia, Incidência e Prevalência da Diabetes <i>Mellitus</i>	5
1.4. Complicações diabéticas	7
1.5. A diabetes e a aorta	8
1.5.1. Anatomia e função da aorta.....	8
1.6. Diabetes e risco de doenças cardiovasculares	10
1.7. Células Progenitoras Endoteliais	12
1.7.1. Caracterização	12
1.8. Importância do Monóxido de Azoto na mobilização das EPCs	14
1.8.1. Importância das EPCs na diabetes	16
1.9. Mecanismos moleculares associados à DM	17
1.10. <i>Stress</i> Oxidativo na DM	20
1.11. Disfunção endotelial na DM	21
1.11.1. Mecanismo eNOS <i>uncoupling</i>	23
1.12. Terapêutica da DM	25
1.12.1. Insulinoterapia	26
1.12.2. Antidiabéticos Orais	27
1.12.3. Incretinas	28
1.12.3.1 Metabolismo fisiológico da glicose.....	28
1.12.3.2 Caracterização das hormonas GIP e GLP-1	29

1.12.4. Degradação das Incretinas: Papel da enzima DPP-IV	31
1.13. Receptor do GLP-1 (GLP-1R)	33
1.14. Mecanismo de acção do GLP-1 e GIP	33
1.15. Diferenciação e regeneração das células β na DMT1	35
1.16. Farmacoterapia baseada nos efeitos das Hormonas Incretinas	37
1.16.1. Características dos Miméticos do GLP-1	37
1.16.2. Inibidores da DPP-IV	38
1.17. Sitagliptina	40
1.18. Acções cardiovasculares e vasoactivas do GLP-1	42
1.18.1. Evidência para as acções directas do GLP-1 (9-36) no endotélio vascular	44
1.19. Efeitos cardiovasculares dos inibidores da DPP-IV	46
1.20. Acções do GLP-1 independentes do seu receptor	49
1.21. Possível mecanismo de acção do GLP-1 no fígado, coração e endotélio vascular	50
1.22. Efeito da Sitagliptina nas EPCs	51
1.23. Relaxamento endotelial do GLP-1 mediado pelo Monóxido de Azoto	51
1.24. Terapêuticas de Incretinas no tratamento da DMT1	52
Capítulo 2 - Objectivos	59
Capítulo 3 – Material e Métodos	61
3. Material e Métodos	62
3.1. Caracterização do Modelo Animal de diabetes tipo 1: indução da diabetes por STZ	62
3.2. Isolamento e Preparação do órgão	63
3.2.1. Parâmetros Bioquímicos	64
3.2.2. Ensaio da enzima DPP-IV no soro	64
3.3. Protocolo Experimental - Estudos Funcionais	65
3.4. Análise Estatística dos resultados dos estudos funcionais	67
3.5. Reagentes e fármacos utilizados nos estudos funcionais	68
3.6. Protocolo experimental – Detecção de proteínas por <i>Western blotting</i>	68
3.6.1. Extracção de proteínas a partir de aorta de rato	68
3.6.2. Quantificação da Proteína pelo método BCA	68
3.6.3. Electroforese em gel de Poliacrilamida e Imunodeteção	69
3.7. Detecção dos níveis de anião superóxido na aorta de rato	71
3.8. Análise estatística	71

3.9. Técnica de histologia - Micro-anatomia do vaso sanguíneo em estudo	71
Capítulo 4 - Resultados.....	73
4. Resultados	74
4.1. Modelo animal de diabetes do tipo 1	74
4.2. Influência da Sitagliptina na resposta vasorrelaxante da aorta isolada de rato à ACh	76
4.3. Efeito do L-NAME na resposta vasorrelaxante da aorta de rato à ACh	79
4.4. Estudo do efeito da sitagliptina no eixo das incretinas e respectivas vias de sinalização na aorta dos 4 grupos de animais	82
4.4.1. Análise da expressão do GLP-1R	82
4.4.2. Análise da expressão da Akt e p-Akt	82
4.4.3. Análise da expressão da eNOS e p-eNOS	84
4.5. Determinação da produção de anião superóxido na aorta nos 4 grupos de animais	86
4.6. Micro-anatomia da aorta nos 4 grupos de animais	88
Capítulo 5 - Discussão.....	89
Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas Futuras.....	101
Capítulo 7 - Bibliografia.....	105

Índice de Figuras

- Figura 1** **Proteínas transportadoras envolvidas na DMT1.** (Retirado de **3**
Diabetes Education Online)
- Figura 2** **Proteínas transportadoras envolvidas na DMT2.** (Retirado de **4**
Diabetes Education Online)
- Figura 3** **Prevalência global (%) de DM na população adulta (20-79 anos) 6**
em 2013, em função da região geográfica. (Retirado de IDF
Diabetes Atlas, 6th Edition, 2013)
- Figura 4** **Diagrama esquemático das complicações macro e 8**
microvasculares da DM. (Adaptado de IDF *Diabetes Atlas, 6th*
Edition, 2013)
- Figura 5** **Esquema anatómico da aorta e suas camadas constituintes 9**
(Retirado de *Toracic aortic disease program: The Aorta and Its*
Structure. Division of Cardiothoracic Surgery, Virginia
Commonwealth University).
- Figura 6** **Vias de sinalização da insulina.** O receptor de insulina é uma **20**
tirosina-cinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de
proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a
fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas de
sinalização através dos seus domínios SH2, resultando na activação
de vias de sinalização intracelular como a via da PI3K, a cascata da
MAPK e a activação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o
transporte de glicose, a síntese de glicogénio, lípidos e proteínas,
coordenando e integrando o metabolismo intermediário. (Retirado de
Saltiel & Kahn, 2001)

-
- Figura 7** **Diagrama que representa os possíveis mecanismos para explicar a atenuação das respostas dilatadoras endoteliais (disfunção endotelial) observadas com o desenvolvimento de DMT1.** 23
(Retirado de Joshua *et al.*, 2005)
- Figura 8** **Mecanismos de sinalização que conduzem à disfunção endotelial na diabetes: papel central do desacoplamento da eNOS na patogénese da disfunção endotelial.** 25
Nas células endoteliais, a eNOS está inactiva quando ligada à caveolina (*caveolin 1*, CAV-1). Para se tornar activa, a eNOS dissocia-se da cav-1 e liga-se à calmodulina (CAM) e à *heat shock protein 90* (Hsp90) e em conjunto com a fosforilação dos locais serínicos (por exemplo, Ser1177). A proteína eNOS funcional é um dímero (*coupled eNOS*). O BH4 é um cofactor essencial para a actividade óptima da eNOS. A eNOS é constituída por dois tipos de proteínas globulares (domínios reductase e oxidase). O BH4 facilita a transferência de electrões derivados do NADPH do domínio reductase da eNOS para o domínio oxigenase, de forma a converter a L-arginina em NO e L-citrulina. Quando os níveis de L-arginina ou BH4 são inadequados, a eNOS torna-se instável e desacoplada, o que se traduz numa menor produção de NO e numa maior produção de superóxido. Além disso, a interacção entre o NO e o superóxido leva à formação de peroxinitrito, um potente oxidante, que oxida o BH4, resultando no desacoplamento da eNOS, e subsequentemente na disfunção endotelial. (Adaptado de Kietadisorn *et al.*, 2012)
- Figura 9** **Degradação das incretinas pela DPP-IV.** (Retirado de Edelman, 2010) 33
- Figura 10** **Activação do receptor GLP-1R e principais vias de transdução de sinal pelas células β .** 35
A activação do GLP-1R conduz à libertação de insulina através da estimulação de vias excitóticas e recruta mecanismos de sinalização que promovem a proliferação e sobrevivência das células. (Retirado de Drucker, 2006)
-

Figura 11	Mecanismo de acção dos inibidores da DPP-IV. (Retirado de Edelman, 2010)	40
Figura 12	Estrutura química da sitagliptina. A sitagliptina é uma molécula de baixo peso molecular (523,32Da), e corresponde quimicamente a 7-[(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butyl]-5,6,7,8-tetrahydro-3-(trifluormethyl)-1,2,4-triazolo[4,3-a] pyrazine phosphate (1:1)monohydrate. (Adaptado de Thornberry & Gallwitz, 2009)	41
Figura 13	Mecanismo de acção da sitagliptin. (Adaptado de <i>Januvia, Merk</i>)	41
Figura 14	Mecanismos cardioprotectores do GLP-1. (Adaptado de Ban <i>et al.</i> , 2009)	43
Figura 15	Aorta de rato Wistar.	62
Figura 16	Banho de órgãos com solução fisiológica Krebs-Henseleit a 37°C.	63
Figura 17	Polígrafo de quatro canais da <i>Letica Scientific Instruments</i> ligado a transdutores isométricos de força.	65
Figura 18	Representação esquemática de uma curva cumulativa concentração-resposta à ACh em aorta isolada de rato.	66
Figura 19	Quantificação da actividade da DPP-IV de ratos Wistar machos de quatro grupos diferentes: ratos controlo e diabéticos, tratados e não tratados com 5 mg/kg/dia de sitagliptina durante 2 semanas. Os resultados estão apresentados como percentagem média do controlo \pm S.E.M. dos valores obtidos de 6-8 animais por grupo. As barras verticais representam S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de <i>Bonferroni</i> . *** $p < 0.001$ vs. ratos controlo. ### $p < 0.001$ vs. ratos controlo e ratos diabéticos.	73

-
- Figura 20** **Resposta contráctil da aorta de rato à NA nos animais controlo e diabéticos, tratados ou não com sitagliptina.** Os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M. de 16 experiências. As barras verticais representam S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.
- Figura 21** **Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos controlo à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA) na ausência (●, controlo) e na presença de tratamento com sitagliptina (■).** Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M. (n = 12 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs. controlo.
- Figura 22** **Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos diabéticos à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA) na ausência (●, diabéticos) e na presença de tratamento com sitagliptina (■).** Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M. (n = 12 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs. controlo.
- Figura 23** **Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos controlo à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 μ M de L-NAME (■).** Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M. (n = 6 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$ vs. controlo.

-
- Figura 24** Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos controlo tratados com sitagliptina à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 µM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 6 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo. 78
- Figura 25** Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos diabéticos à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 µM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 4 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo. 79
- Figura 26** Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos diabéticos tratados com sitagliptina à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 µM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 4 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo. 79
- Figura 27** Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos do GLP-1R em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo ± S.E.M. (n = 7-9 por grupo). A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. **p*<0,05 vs. controlo. 80
-

-
- Figura 28** **Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos totais de Akt em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos.** Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. (n = 7-8 por grupo). 81
- Figura 29** **Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos de p-Akt em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos.** Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SEM (n = 8-10 por grupo). 81
- Figura 30** **Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos de Akt activa em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos.** Os níveis de expressão da enzima Akt fosforilada/Akt total foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SEM (n = 5-6 por grupo). 82
- Figura 31** **Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos totais da eNOS em segmentos aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos.** Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. (n = 8-10 por grupo). 83

-
- Figura 32** Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos da p-eNOS em 83
segmentos aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. (n = 4-6 por grupo).
- Figura 33** Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos de eNOS activa em 84
anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis de expressão da enzima eNOSfosforilada/eNOS total foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. (n = 8-10 por grupo).
- Figura 34** Efeitos da diabetes e sitagliptina nos níveis de anião superóxido 85
nos anéis de aorta de ratos *Wistar*. Imagens representativas da marcação (a vermelho) de secções de anéis aórticos com a sonda fluorescente dihidroetídio (n = 5 por grupo). Amplificação: 40x.
- Figura 35** Efeitos da diabetes e sitagliptina nos níveis de anião superóxido 85
nos anéis de aorta de ratos *Wistar*. Os níveis de $O_2^{\cdot-}$ foram determinados por marcação de secções de anéis aórticos com a sonda fluorescente dihidroetídeo. Os resultados estão apresentados como percentagem média do controlo \pm S.E.M. dos valores obtidos de 5 secções representativas por grupo. As barras verticais representam S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. *** $p < 0.001$ vs. ratos controlo. ### $p < 0.001$ vs. ratos diabéticos.
-

Figura 36 Técnica de hematoxilina/eosina na aorta isolada de rato *Wistar* 86
controles e diabéticos, não tratados e tratados com sitagliptina.

Os quatro painéis (X400) referem-se a secções representativas da túnica íntima (1), média (2) e adventícia (3) da aorta de ratos *Wistar* controlo (painel A), ratos *Wistar* tratados com sitagliptina (painel B), ratos diabéticos (painel C) e ratos diabéticos tratados com sitagliptina (painel D).

Índice de Tabelas

Tabela I	Anticorpos primários e secundários usados para a análise por <i>Western Blotting</i> .	69
Tabela II	Peso corporal, glicose, HbA1c e níveis de insulina plasmáticos em ratos <i>Wistar</i> controlo e diabéticos, não tratados e tratados com 5 mg/kg/dia de sitagliptina durante 2 semanas.	73
Tabela III	Respostas vasorrelaxantes à ACh da aorta de ratos controlo, na ausência e na presença de sitagliptina.	75
Tabela IV	Respostas vasorrelaxantes à ACh da aorta de ratos diabéticos na ausência e na presença de sitagliptina.	76

Lista de Abreviaturas

AC	<i>Adenylyl cyclase</i>
ACh	Acetilcolina
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADOs	Antidiabéticos orais
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
Akt/PKB	<i>Protein Kinase B</i>
AMC	<i>Aminomethylcoumarin</i> fluorescente
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Apo B48	Apolipoproteína B48
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
Bad	<i>Bcl2 antagonist of cell death</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>

BH4	<i>Tetrahydrobiopterin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAM	Calmodulina
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CAP	<i>Cbl-associated protein</i>
CAV-1	<i>Caveolin-1</i>
CD36/FAT	<i>Cluster of Differentiation 36/ fatty acid translocase</i>
cGMP	<i>cyclic Guanosine Monophosphate</i>
CR	Concentração-resposta
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CXCL12	<i>CXC chemokine ligand 12</i>
CXCR4	<i>Chemokine Receptor type 4</i>
DCV	Doença cardiovascular
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DM	Diabetes Mellitus
DMT1/2	Diabetes Mellitus do tipo 1/2
DOC	<i>Sodium deoxycholate</i>

DPP-IV/CD26	<i>Dipeptidyl-peptidase IV or cluster of differentiation 26</i>
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric oxide synthase</i>
EPCs	<i>Endothelial progenitor cells</i>
EPO	Eritropoietina
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endotelina-1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Foxa2	<i>Hepatocyte nuclear factor 3-beta</i>
FoxO	<i>Forkhead box protein O</i>
GC	<i>Guanylyl cyclase C</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GIP	<i>Glicose dependent insulintropic peptide</i>
GIP-R	<i>Glicose-dependent insulintropic polypeptide receptor</i>
GLP-1/2	<i>Glucagon-like peptide 1/2</i>
GLP-1R	<i>Glucagon-like peptide 1 receptor</i>

GLUT	<i>Glucose transporters</i>
GS	Glicogénio sintase
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFG	<i>Impaired fasting glucose</i>
IGT	<i>Impaired Glucose Tolerance</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IR	<i>Insulin receptor</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
L-NAME	<i>L-N^G-Nitroarginine Methyl Ester</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MEK	<i>Member of the MAPK signaling cascade</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
n	Número de experiências
NA	Noradrenalina
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NEP	<i>Neutral endopeptidase</i>
nNOS	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic mice</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
O.C.T.	<i>Optimal Cutting Temperature compound</i>
OGTT	<i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salino de fosfato
PDK-1/2	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1/2</i>
PDX-1	<i>Insulin promoter factor 1</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3- cinase

PIP	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PIP2	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PPAR-β/δ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor beta or delta</i>
Rab-GAP AS160	<i>AS160 Rab GTPase activating protein</i>
Ras	<i>Related GTP-binding protein A</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S.E.M.	<i>Standard Error of the Mean</i>
SDF-1α/ PBSF	<i>Stromal cell-derived factor or pre-B Cell Growth Stimulation Factor</i>
SDS	Dodecilssulfato de sódio
SGLT-2	<i>Sodium glucose transporters 2</i>
SH2	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SOD	Superóxido dismutase
SOS	<i>Son of sevenless</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>

Tyr

Tyrosine

VEGF

Vascular endothelial growth factor

WHO

World Health Organization

Resumo

As Gliptinas são fármacos inibidores da dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV), que constituem uma nova classe de agentes orais para o tratamento da DMT2 e a sitagliptina é conhecida pelo seu interesse terapêutico através do aumento dos níveis de hormonas incretinas activas GLP-1 e GIP. A DPP-IV degrada rapidamente o GLP-1 (7-36), obtendo-se o GLP-1 (9-36), que inicialmente se pensava ser biologicamente inactivo. Posteriormente, o GLP-1 (9-36) mostrou efeitos independentes do receptor GLP-1R na melhoria da função cardíaca e vasodilatação. Os estudos também sugerem que os efeitos cardioprotectores de ambos o GLP-1 e o GLP-1 (9-36) são parcialmente atribuídos ao seu mecanismo vasodilatador que é dependente de óxido nítrico (NO)/cGMP e também ao aumento da estabilidade do SDF-1 α , na medida em que prolonga o seu tempo de vida e a sua acção fisiológica, envolvendo o recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) a partir da medula óssea. As EPCs contribuem para a endotelialização dos vasos lesados e a neovascularização induzida por eventos isquémicos.

Um dos objectivos do presente estudo consistiu em avaliar o efeito da sitagliptina na reversão/atenuação da disfunção endotelial, por um mecanismo independente do aumento de secreção de insulina, num modelo animal de diabetes do tipo 1, isto é, diabetes induzida por STZ em ratos *Wistar*.

A diabetes foi induzida com uma injeção intraperitoneal única de STZ (65 mg / kg em 10 mM de tampão citrato, pH 4,5) a ratos *Wistar* machos (8 semanas de idade). Após 2 semanas de indução do diabetes, os animais foram divididos em quatro grupos: controlos, diabéticos e controlos e diabéticos tratados com sitagliptina 5 mg/kg/dia durante as duas semanas seguintes. Os ratos foram em seguida anestesiados (cocktail intraperitoneal 2 mg/kg de uma solução 2:1 (v/v) de 50mg/mL de cloridrato de cetamina em 2,5% clorpromazina) e as amostras de sangue colhidas a partir da veia jugular para a medição de glicose, insulina e níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c) e medição da actividade da DPP-IV.

Os animais foram então sacrificados e três animais de cada grupo foram utilizados para o isolamento da aorta. Após uma pré-contracção com 10 μ M NA, procedeu-se ao registo do relaxamento isométrico de duas curvas cumulativas concentração-resposta (CR) de ACh (ACh, 0,01-90 μ M), na ausência e na presença do éster metílico de N^G-Nitro-L-arginina (N^G-Nitro-L-arginine methylester, L-NAME), um inibidor da eNOS, adicionado ao banho de órgãos 30 minutos antes da segunda curva CR, que permitiu confirmar a produção de NO induzida por ACh em todos os grupos. Cada anel funcionou como controlo de si próprio, já que as respostas à ACh da segunda curva foram expressas em percentagem do relaxamento máximo obtido na primeira

curva CR do respectivo anel. Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta obtida nos anéis controlo. A ACh foi mais potente em induzir o vasorrelaxamento em ratos de controlo tratados com sitagliptina (pEC_{50} : $6,77 \pm 0,09$, $n = 12$, $p = 0,039$ vs. ratos controlo não tratados pEC_{50} : $6,41 \pm 0,14$, $n = 12$, $p = 0,039$). Inesperadamente, em ratos diabéticos tratados, a sitagliptina parece comprometer o efeito vasorrelaxante mediado pela ACh com uma redução significativa da percentagem de inibição da contracção induzida pela NA ($E_{m\acute{a}x}$: $27,1 \pm 5,1\%$, $n = 12$ vs. ratos diabéticos não tratados $E_{m\acute{a}x}$ de $59,5 \pm 8,2\%$, $n = 12$, $p = 0,003$).

Para estudar os mecanismos subjacentes aos resultados obtidos anteriormente, recorreu-se à técnica de *Western blotting* para observar a expressão do GLP-1R e das formas totais e fosforiladas das enzimas eNOS e Akt, de forma a avaliar o estado da via de sinalização Akt/eNOS, na presença e na ausência de tratamento com sitagliptina, em ratos controlo e ratos diabéticos. Nos ratos diabéticos observou-se um aumento significativo na expressão do GLP-1R comparativamente com os animais controlo. No grupo de ratos diabéticos sujeitos a tratamento com sitagliptina, parece haver uma tendência para aproximação da situação controlo com uma redução da expressão do GLP-1R. No que diz respeito aos níveis de expressão de Akt activa, determinados através da razão p-Akt/Akt total, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. No entanto, a administração de sitagliptina tendencialmente aumentou a razão p-Akt/Akt total em ratos controlo e ratos diabéticos, embora nestes últimos o aumento tenha sido mais ténue. Por fim, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão de eNOS activa entre os quatro grupos em estudo, determinados através da razão p-eNOS/eNOS total.

Recorrendo a marcadores de *stress* oxidativo, avaliou-se a presença de aniões superóxido nos anéis de aorta dos 4 grupos de animais. Verificou-se um aumento no *stress* oxidativo nos anéis de aorta de ratos diabéticos, traduzido por um aumento da intensidade da fluorescência, comparativamente aos respectivos animais controlo. A administração de sitagliptina diminuiu significativamente a intensidade da fluorescência, quer nos animais controlo, quer nos diabéticos.

Por fim, no sentido de complementar os estudos funcionais, realizaram-se estudos histoquímicos de modo a caracterizar a micro-anatomia dos anéis de aorta dos 4 grupos de animais. As alterações histológicas observadas no presente estudo demonstraram que a organização estrutural do tecido aórtico foi perturbada em ratos com diabetes induzida por STZ, tendo a administração de sitagliptina nestes animais conduzido a um aumento da densidade da matriz numa tentativa de aproximação da situação controlo.

Em suma, os resultados obtidos permitem inferir que, na presença de diabetes, pode ocorrer um comprometimento da via de sinalização PI3K/Akt/eNOS, conduzindo ao desenvolvimento de disfunção endotelial diabética, caracterizada maioritariamente por anomalias na vasodilatação mediada pelo NO, associadas ao *stress* oxidativo. De facto, os efeitos benéficos da sitagliptina na função vascular, observados no grupo controlo deste estudo e que são independentes da secreção de insulina, não foram observados na presença da patologia, podendo estar subjacentes fenómenos que comprometem a via de sinalização comum e que não são revertidos pelo fármaco, pelo menos ao fim do curto período de tratamento a que os animais foram sujeitos.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus* Tipo 1, Sitagliptina, Dipeptidil-peptidase-IV, Disfunção endotelial, *Stress* oxidativo

Abstract

Gliptins are inhibitors of dipeptidyl peptidase (DPP-IV) that constitute a novel class of oral agents for type 2 diabetes treatment and sitagliptin is known to have therapeutic interest through increased levels of active incretin hormones GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and GIP (glucose-dependent insulintropic peptide). DPP-IV rapidly degrades GLP-1 (7-36) yielding GLP-1 (9-36), which was initially believed to be biologically inactive. Latter on GLP-1 (9-36) showed independent effects of GLP-1R receptor to improve cardiac function and vasodilation. Studies also suggest that the cardioprotective effects of both GLP-1 and GLP-1(9-36) are partially attributed to their vasodilatory mechanism which is nitric oxide(NO)/cGMP-dependent and partially to the enhanced stability of stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 α), prolonging its lifetime and its physiological action involving recruitment of Endothelial progenitor cells (EPCs) from the bone marrow. EPCs contribute to the endothelialization of injured vessels and the neovascularization induced by ischemic events.

One of the aims of the following Group study was to assess the effect of sitagliptin on reversing/attenuating the endothelial dysfunction by an insulin secretion independent mechanism in an animal model of type 1 diabetes, i.e., induced by STZ diabetes in *Wistar* rats.

Diabetes was induced with a single intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg in 10 mM citrate buffer, pH 4.5) to male *Wistar* rats (8 weeks old). After 2 weeks of diabetes induction the animals were divided into four groups: controls, diabetics and controls and diabetics treated with sitagliptin 5 mg/kg/day during the following 2 weeks. Rats were then anaesthetized (2 mg/kg intraperitoneal cocktail of a 2:1 (v/v) 50mg/mL ketamine solution in 2.5% chlorpromazine) and blood samples from the jugular vein were collected for the measurement of serum glucose, insulin and glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels and measurement of DPP-IV activity.

The animals were then sacrificed and three animals of each group were used for aorta isolation. Aorta rings were prepared for two cumulative concentration-response (CR) isometric relaxation curves to acetylcholine (ACh, 0.01 to 90 μ M) after precontraction with 10 μ M noradrenaline (NA). To confirm the NO production induced by ACh, 250 μ M N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), an inhibitor of endothelial NO synthase (eNOS) was added 30 min before the second CR curve, confirming the NO production induced by ACh in all four animal groups. ACh was more potent in inducing vasorelaxation in control rats treated with sitagliptin (pEC₅₀ of 6.77 \pm 0.09, n=12 vs. untreated control rats pEC₅₀ of 6.41 \pm 0.14, n=12, p=0.039). Unexpectedly, in diabetic treated rats, sitagliptin seemed to compromise the NO-mediated vasorelaxant effect of

ACh with a significant reduction in the percentage of inhibition of NA-induced contraction (E_{\max} of $27.1 \pm 5.1\%$, $n=12$ vs. untreated diabetic rats E_{\max} of $59.5 \pm 8.2\%$, $n=12$, $p=0.003$).

The technique of Western blotting was used to study the mechanisms underlying the results obtained previously. Thus, it was analysed the expression of GLP-1R and the total and phosphorylated Akt and eNOS proteins in order to assess the status of the signalling pathway Akt/eNOS in the presence and absence of sitagliptin in diabetic and control rats. In diabetic rats it was observed a significant increase in the expression of GLP-1R compared to control animals. In the group of diabetic rats, subjected to treatment with sitagliptin, there seems to be a tendency to approach the control situation with a reduced expression of GLP-1R. With regard to the expression levels of active Akt, determined by the ratio p-Akt/Akt, there was no statistically significant differences between groups. However, the administration of sitagliptin tend to increase the ratio of p-Akt/Akt in both control and diabetic rats, even though the latest showed a more tenuous increase. Finally, no statistically significant differences were observed in the active eNOS expression levels among all four study groups, determined by the ratio p-eNOS /eNOS.

Oxidative stress markers were used in order to assess the presence of superoxide anions in the aorta of 4 groups of animals rings. There was an increase in oxidative stress in the aorta of diabetic rats rings, translated by an increase in fluorescence intensity compared to the respective control animals. The administration of sitagliptin decreased significantly fluorescence intensity, both in control animals or in diabetics.

Finally, in order to complement these studies, histochemical studies were performed to characterize the micro-anatomy of the aortic rings 4 groups of animals. The histological changes observed in the present study demonstrated that the structural organization of the aortic tissue was disrupted in STZ induced diabetic rats, having the administration of sitagliptin in these animals resulted in an increase in the density of the matrix, in an attempt to approach the control the situation.

To sum-up, these results show us that in the presence of diabetes, an impairment of the signaling pathway PI3K/Akt/eNOS may occur, leading to the development of diabetic endothelial dysfunction, characterized mainly by abnormalities in NO mediated vasodilation associated with oxidative stress. In fact, the beneficial effects of sitagliptin in the vascular function observed in the control group in this study, which are independent of insulin secretion, were not observed in the presence of pathology. This might be related to underlying phenomena that compromise the

common signaling pathway and are not drug reversed at least in the short period of treatment the animals were subjected.

Keywords: Type 1 Diabetes *Mellitus*, Sitagliptin, Dipeptidyl peptidase-IV, Endothelial dysfunction, Oxidative stress

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Diabetes *Mellitus*

1.1. Definição geral

A Diabetes *Mellitus* (DM) é considerada um grave problema de saúde pública (Owu *et al.*, 2013) que afecta ambos os sexos e raças, sendo actualmente a terceira maior causa de morte no mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Apesar de ser mais frequente em indivíduos de idade avançada, nas últimas décadas a incidência da DM entre os jovens e pessoas na faixa dos 40 anos tem vindo a aumentar substancialmente. O envelhecimento da população e a adopção de estilos de vida pouco saudáveis, como o sedentarismo, dieta inadequada e obesidade, são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência desta doença em todo o mundo.

A DM integra um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicémia crónica, com anomalias ao nível do metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, resultante de distúrbios na secreção e/ou na acção da insulina (Alberti & Zimmet, 1998). Os efeitos desta doença incluem danos a longo prazo, disfunção e falência de vários tecidos e órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, conduzindo ao aparecimento progressivo de complicações específicas (Kolluru *et al.*, 2012).

1.2. Caracterização da Diabetes *Mellitus*

De acordo com a OMS e a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*, IDF), a diabetes divide-se em duas classes clínicas principais: Diabetes *Mellitus* do tipo 1 (DMT1) e Diabetes *Mellitus* do tipo 2 (DMT2) (*World Health Organization*, WHO, 1999). Outras categorias da diabetes incluem a diabetes gestacional, caracterizada por um estado de hiperglicémia que se desenvolve durante a gravidez, e ainda a diabetes provocada por causas mais raras, como síndromes genéticas, processos adquiridos, como pancreatite, doenças como a fibrose cística, exposição a certos fármacos, vírus e outras causas desconhecidas.

A DM está associada a uma diminuição das células β pancreáticas, devido à morte celular por apoptose e a um comprometimento da regeneração de células β , processos estes que são mediados pela activação das vias metabólicas em resposta à condição de hiperglicémia crónica estabelecida (Cnop *et al.*, 2005).

1.2.1. Diabetes *Mellitus* do tipo 1

A DMT1 ou diabetes insulino-dependente é considerada a mais grave dos tipos de diabetes e, é geralmente denominada diabetes juvenil, pois embora possa ocorrer em qualquer idade, surge mais comumente na infância ou na adolescência (Ding *et al.*, 2013), afectando anualmente milhares de crianças e adolescentes em todo o mundo. Embora os doentes que apresentam esta forma de diabetes não sejam, geralmente, obesos, a presença de obesidade não é incompatível com o diagnóstico. Caracteriza-se por uma destruição auto-imune selectiva e progressiva das células β dos ilhéus de Langerhans pancreáticos responsáveis pela produção de insulina, que em conjunto com múltiplas predisposições genéticas e factores ambientais parece estar associada à supressão da síntese de insulina (Cnop *et al.*, 2005; Ichinose *et al.*, 2007; Reimann *et al.*, 2009), como ilustra a figura 1. Na DMT1, as células β pancreáticas são alvo de um ataque auto-imune, com invasão de células mononucleares num processo inflamatório denominado *insulitis*, que leva à perda da maioria das células β (Cnop *et al.*, 2005; Zóka *et al.*, 2013). Não é conhecida a razão pela qual os ilhéus sofrem esta inflamação, nem por que apenas as células β são afectadas. Este tipo de diabetes é chamado DM tipo 1A.

A etiologia auto-imune da DMT1 é confirmada pela presença de anticorpos circulantes específicos contra antígenos das células β pancreáticas ou contra insulina, os quais são detectados em 85-90% dos indivíduos com DMT1 no momento do diagnóstico (Roep, 2003). Esta redução progressiva do número e função das células β pancreáticas conduz a um estado de deficiência total de insulina e conseqüentemente, hiperglicémia crónica. Na ausência de insulina, ocorre também um aumento da oxidação dos ácidos gordos, resultando numa produção excessiva de cetonas. Quando não tratados, estes distúrbios metabólicos conduzem progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. Assim, a terapêutica diária com injeções de insulina é o que garante a sobrevivência destes doentes (Krieg *et al.*, 2012).

No entanto, existem algumas formas de DMT1 cuja etiologia não é conhecida. Alguns indivíduos apresentam deficiência absoluta de insulina e tendência para cetoacidose, mas não apresentam qualquer evidência de destruição auto-imune e não possuem nenhuma outra causa conhecida para a destruição das células β . Deste modo, considera-se que possuem DM tipo 1B ou

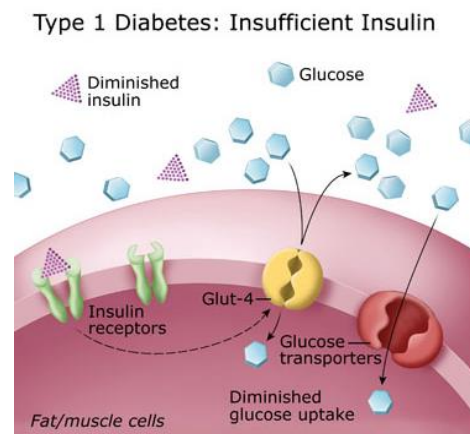


Figura 1 – Proteínas transportadoras envolvidas na DMT1. (Retirado de *Diabetes Education Online*)

idiopática (*American Diabetes Association*, 2011). A DMT1 constitui cerca de 5-10 % dos casos diagnosticados de DM (*American Diabetes Association*, 2011).

1.2.2. Diabetes *Mellitus* do tipo 2

A DMT2 constitui a forma mais comum de diabetes, contribuindo para aproximadamente 90% a 95% dos casos de diabetes em todo o mundo e ocorre predominantemente em adultos (> 30 anos de idade), sendo no entanto cada vez mais observada em crianças e adolescentes, estando associada ao aumento da obesidade infantil (Blaschke *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2007; Badyal & Kaur, 2008).

Ao contrário do tipo 1, a DMT2 não é uma doença auto-imune e ocorre como resultado da combinação de deficiências na secreção de insulina, pela disfunção progressiva das células β e inadequada produção de *glucagon*, com um estado de resistência à insulina (Chyan & Chuang, 2007; Badyal & Kaur, 2008). A resistência à insulina caracteriza-se pela redução da capacidade da insulina em estimular a captação de glicose pelos tecidos (Figura 2), o que resulta no aumento dos níveis de glicose sanguíneos (hiperglicemia) (Virally *et al.*, 2007). Em consequência disto, há um aumento compensatório da secreção de insulina pelas células β pancreáticas (hiperinsulinemia) de forma a manter a normoglicemia, um processo denominado compensação de células β . Este processo diminui a capacidade secretora das células β , conduzindo à falência e perda progressiva das mesmas (Virally *et al.*, 2007). Apesar da resistência à insulina parecer ser de natureza hereditária, verifica-se que a obesidade e, conseqüentemente, a inatividade física, contribuem frequentemente para o seu desenvolvimento.

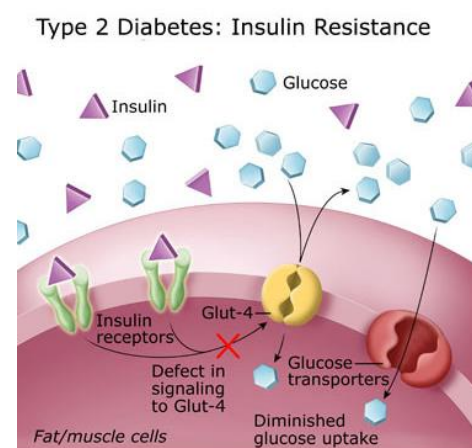


Figura 2 – Proteínas transportadoras envolvidas na DMT2. (Retirado de *Diabetes Education Online*)

1.3. Factores de risco, Epidemiologia, Incidência e Prevalência da Diabetes *Mellitus*

Actualmente, a diabetes é caracterizada como uma epidemia mundial que afecta quase 6% da população adulta do mundo, sendo quase 80% da totalidade em territórios subdesenvolvidos (Ding *et al.*, 2013). Esta patologia constitui um grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo devido à sua elevada taxa de morbimortalidade, associada à perda na qualidade de vida. Estima-se que a cada 6 segundos uma pessoa morre devido à diabetes (IDF Diabetes Atlas, 6th Edition, 2013).

A incidência e prevalência da diabetes têm aumentado significativamente nas últimas décadas, principalmente devido ao aumento da DMT2 (Monteiro *et al.*, 2005). De acordo com a IDF, só no ano 2013 a diabetes foi responsável pela morte de 5,1 milhões de pessoas, sendo que quase metade das mesmas tinha menos de 60 anos. Esta patologia constitui ainda uma das principais causas de morte na União Europeia (Eurostat, 2007). Actualmente, a diabetes atinge cerca de 382 milhões de pessoas (Figura 3) em todo o mundo, correspondendo a 8,3% da população mundial adulta, sendo que em 46% destas pessoas a diabetes não foi ainda diagnosticada, prosseguindo a sua evolução silenciosa. Estima-se que até o ano de 2035 este número atingirá os 592 milhões (IDF Diabetes Atlas, 6th Edition, 2013), isto é, por cada ano surgem aproximadamente 10 milhões de novos casos de diabetes. Portugal posiciona-se entre os países Europeus que registam uma maior taxa de prevalência da diabetes, estimando-se que, actualmente, existirão cerca de 1 milhão de diabéticos, o que significa que já foi atingido o número de casos de prevalência de diabetes esperado só para 2025. Os dados divulgados indicam que a diabetes quase triplicou nos últimos trinta anos, evidenciando a importância da prevenção e diagnóstico precoce para impedir o aumento do número de casos (IDF Diabetes Atlas, 5th Edition, 2012).

Evidências demonstram que o número de pessoas com DMT2 está a aumentar significativamente de forma global. Simultaneamente, a incidência de DMT1 está a aumentar rapidamente em muitos países, particularmente em crianças com idades inferiores a 15 anos. Estima-se que a taxa de incidência anual global da DMT1 é aproximadamente 3%. Só no ano de 2013 foram diagnosticados mais de 79000 novos casos de DMT1 em crianças. Em Portugal, no ano de 2013, estima-se a existência de entre 13,2 novos casos de DMT1 por cada 100 000 habitantes (IDF Diabetes Atlas, 6th Edition, 2013).

Um estudo realizado pelo Centro de Estudos de Medicina Baseada na Evidência da Faculdade de Medicina de Lisboa e Universidade Católica com base em dados estatísticos

demográficos e de saúde, disponíveis para Portugal em 2008, revelou que as estimativas para a mortalidade apontam para aproximadamente 9 mil mortes relacionadas com a diabetes todos os anos, o que representa 8,5% da mortalidade total. Os doentes mais velhos são mais afectados pela diabetes, pois a prevalência da doença aumenta com a idade (Monteiro *et al.*, 2005). Segundo a OMS e a *American Diabetes Association* (ADA) estão definidos quatro critérios para o diagnóstico de DM, sendo estes: 1) sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso sem causa aparente, acrescidos de glicémia casual acima de 200 mg/dl; 2) glicémia em jejum superior a 126 mg/dl; 3) níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c) superiores a 7 % e 4) anomalias no teste de tolerância à glicose oral (*Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT), que quantifica a concentração de glicose plasmática em jejum e/ou 2 horas após ingestão de 75 g de glicose (*American Diabetes Association*, 2011). Doentes que apresentem anomalias nos níveis de glicose em jejum (*Impaired fasting glucose*, IFG) e/ou tolerância diminuída à glicose (*Impaired Glucose Tolerance*, IGT) apresentam um risco mais elevado para o desenvolvimento de DM e de doenças cardiovasculares (DCVs) (*American Diabetes Association*, 2010).

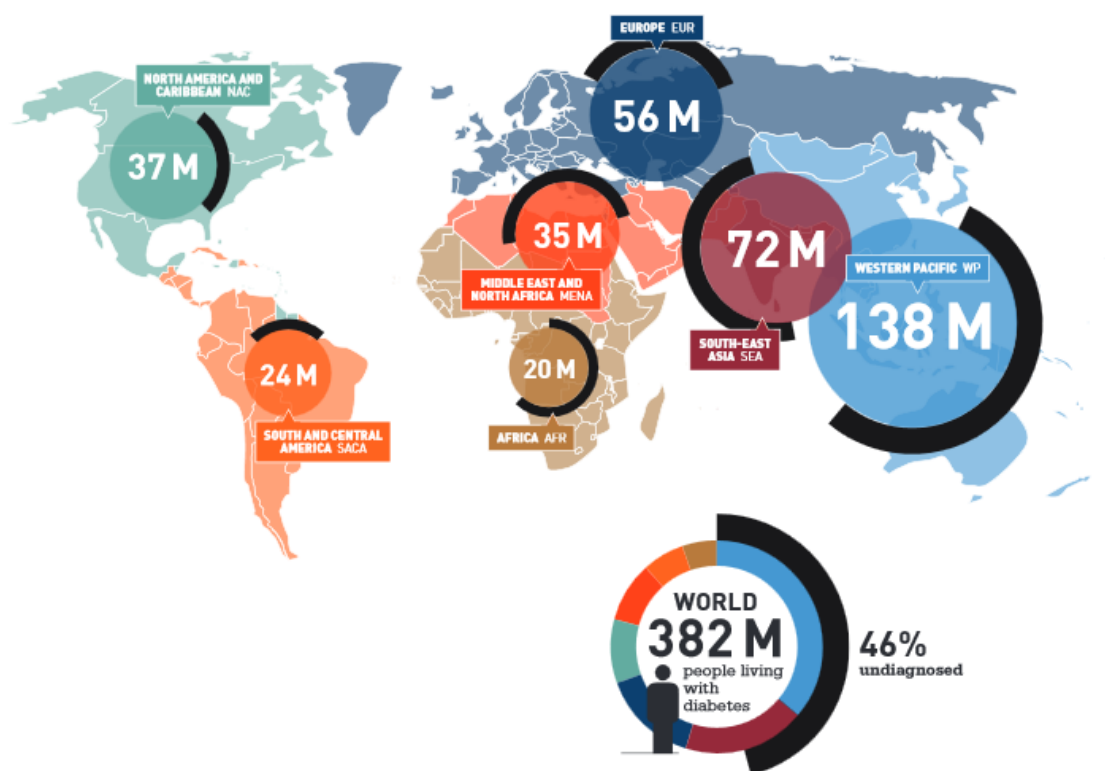


Figura 3 - Prevalência global (%) de DM na população adulta (20-79 anos) em 2013, em função da região geográfica. (Retirado de IDF Diabetes Atlas, 6th Edition, 2013)

1.4. Complicações Diabéticas

As complicações associadas à diabetes desenvolvem-se gradualmente ao longo dos anos e podem ser divididas em dois tipos: microvasculares e macrovasculares (Figura 4). As complicações macrovasculares decorrem da obstrução dos vasos sanguíneos por placas de gordura, também conhecidas como placas de ateroma. Neste caso, os vasos sanguíneos afectados são representados pelas artérias de médio e grande calibre. Assim sendo, a presença de diabetes induz e acelera o processo de aterosclerose e pode promover, conseqüentemente, a ocorrência de complicações como: hipertensão arterial, disfunção endotelial, enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e ainda insuficiência vascular periférica, à qual estão normalmente associadas situações de gangrena e conseqüentemente necessidade de amputação (Kar & Holt, 2008; Owu *et al.*, 2013). Por sua vez, as complicações microvasculares caracterizam-se pela deterioração de artérias de pequeno calibre. São representadas pela retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética (Badyal & Kaur, 2008; *American Diabetes Association*, 2010, 2011). Para a prevenção destas complicações, os doentes com DMT1 devem ser avaliados 5 anos após o diagnóstico e os pacientes com DMT2, no momento do diagnóstico.

Como vimos anteriormente, a insulina é a hormona mais importante que regula o metabolismo energético, pelo que uma deficiência relativa ou absoluta, como no caso da diabetes, leva a severas disfunções nos principais órgãos-alvo da insulina. Posto isto, em indivíduos diabéticos não há uma captação da glicose eficaz pelos tecidos, o que conduz a um aumento anormal dos níveis de glicose no sangue (hiperglicémia). Isto ocorre uma vez que o organismo não produz insulina suficiente para mediar uma resposta insulinémica normal e/ou as células não são capazes de responder à insulina produzida. Assim, a hiperglicémia é o factor determinante das complicações micro e macrovasculares, sendo a formação endógena dos produtos de glicação avançada (*Advanced Glycation End-products, AGEs*), o principal mecanismo responsável pelos danos celulares e tecidulares observados na diabetes (Jakus & Rietbrock, 2004). Para além da hiperglicémia, o aumento da produção de radicais livres de oxigénio constitui também grande parte das complicações que ocorrem na diabetes, mas este assunto será aprofundado posteriormente (Kaneto *et al.*, 2010; Owu *et al.*, 2013).

As complicações vasculares da diabetes são muitas vezes detectadas já tardiamente, pois evoluem de forma silenciosa. Estas constituem ainda a principal causa de morbidade e mortalidade em doentes diabéticos. Actualmente é possível reduzir os danos da doença através de um controlo rigoroso da glicémia, da tensão arterial e da presença de lípidos (gorduras) no sangue, bem como de uma vigilância periódica dos órgãos mais sensíveis (retina, rins, coração). Estima-se

que aproximadamente 40% das pessoas com diabetes vêm a ter complicações tardias da sua doença. A diabetes é considerada a principal causa de cegueira em adultos com idades compreendidas entre os 20-74 anos (Aiello et al., 1998), representa 40% do total de novos casos diagnosticados de insuficiência renal (Ritz & Orth, 1999), e cerca de 50% da mortalidade dos doentes, devido a DCVs.

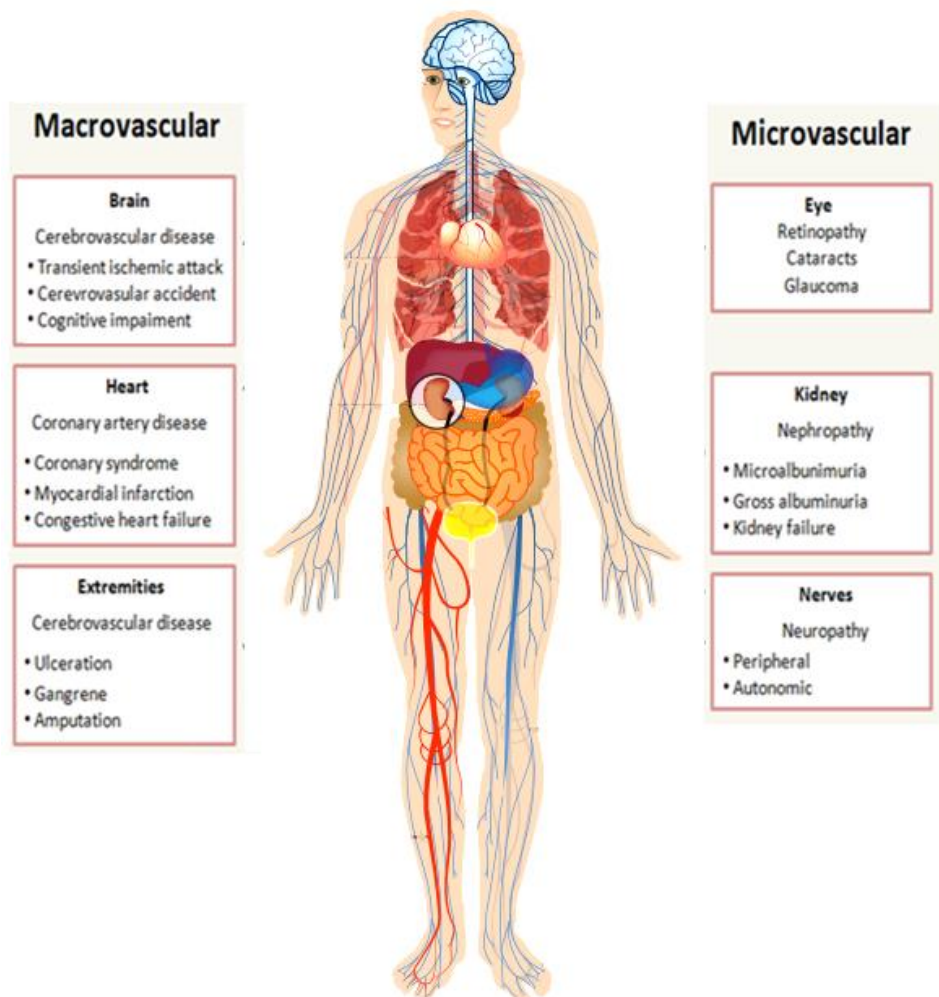


Figura 4 – Diagrama esquemático das complicações macro e microvasculares da DM. (Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 6th Edition, 2013)

1.5. A diabetes e a aorta

1.5.1. Anatomia e função da aorta

A aorta tem uma posição privilegiada no sistema cardiovascular, sendo considerada a artéria mais importante do organismo, devido ao facto de ser um vaso de grande calibre e essencialmente pela área que irriga. Assim sendo, a aorta é a principal responsável pelo transporte

do sangue oxigenado a partir do ventrículo esquerdo do coração para o resto do corpo. Esta artéria divide-se em artérias menores, que distribuem o sangue oxigenado e os nutrientes a todas as células. Todas as artérias do organismo, com excepção da artéria pulmonar derivam da artéria aorta. O sangue venoso, rico em dióxido de carbono (CO_2), retorna depois para o coração pelas veias cavas.

A aorta inicia-se na parte superior do ventrículo esquerdo, forma um arco e estende-se para o abdómen, onde se ramifica em duas artérias menores (artérias ilíacas comuns). Anatomicamente, a artéria aorta está dividida em cinco secções: aorta ascendente, arco da aorta, aorta descendente, aorta torácica e aorta abdominal (Figura 5).

A aorta é constituída por uma mistura heterogénea de músculo liso, nervos, as células da íntima, células endoteliais, células do tipo fibroblasto, e uma matriz extracelular complexa. As paredes da aorta são espessas e formadas por tecido conjuntivo e fibras elásticas que conferem elasticidade à aorta, permitindo-lhe esticar para evitar a expansão excessiva devido à pressão que é exercida nas paredes pelo fluxo sanguíneo.

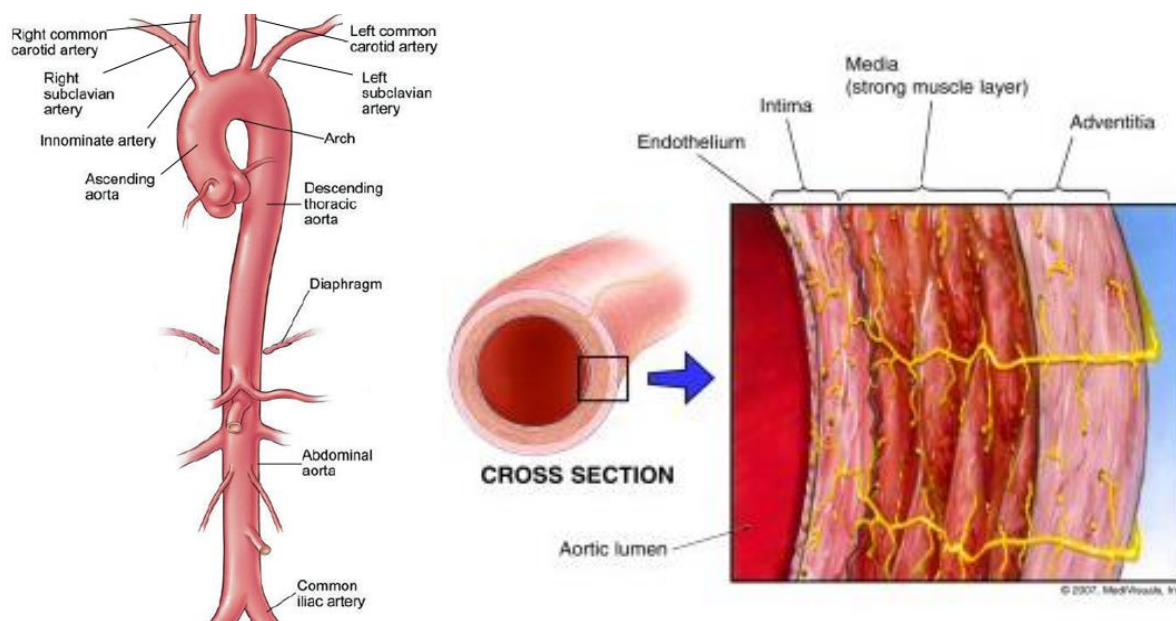


Figura 5 – Esquema anatómico da aorta e suas camadas constituintes. (Retirado de Toracic aortic disease program: The Aorta and Its Structure. *Division of Cardiothoracic Surgery, Virginia Commonwealth University*)

À semelhança de todas as restantes artérias, a parede da aorta pode dividir-se em três camadas distintas, que se iniciam do lado luminal para o exterior, respectivamente (Berillis, 2013):

- **Túnica íntima:** é a camada interna, composta por células endoteliais, e que possui contacto directo com o fluxo sanguíneo;
- **Túnica média:** é a camada intermédia, composta por células musculares lisas e tecido elástico, permitindo à aorta contrair e expandir a cada batimento;
- **Túnica adventícia:** é a camada mais externa, formada por tecido conjuntivo, que fornece suporte e estrutura adicional à aorta.

1.6. Diabetes e risco de doenças cardiovasculares

As DCVs afectam o coração e os vasos sanguíneos e podem manifestar-se de formas diferentes, tais como: hipertensão arterial, doenças cardíacas e acidentes vasculares. Segundo a OMS, são a principal causa de mortalidade adulta e morbidade em todo o mundo. Todos os anos, cerca de 17 milhões de pessoas no mundo morrem de DCVs, particularmente devido a ataques cardíacos e AVCs. Em 2008, cerca de 17,3 milhões de pessoas morreram de DCV, representando 30% de todas as mortes no mundo; dentro deste valor, cerca de 7,3 milhões morreram devido a doença cardíaca coronária e 6,2 milhões devido a AVC. Estima-se que o número de pessoas que morrem com estas doenças, principalmente devido a doenças cardíacas e AVC, vai aumentar para 23,3 milhões em 2030, projectando-se assim que as DCVs manter-se-ão a principal causa de morte em todo o mundo.

Mesmo na presença de um controlo glicémico rigoroso, a diabetes é uma das principais, senão a principal causa de DCV, sendo também a principal responsável pelo excesso de morbidade e mortalidade cardiovascular nas populações ocidentais (Laing *et al.*, 2003; Reimann *et al.*, 2009). Por esta razão, diz-se que "A diabetes é uma doença cardiovascular" (Grundy *et al.*, 1999). Doentes diabéticos tipo 1 possuem um risco de morte 10 vezes maior que a população em geral (Retnakaran & Zinman, 2008), ao passo que os do tipo 2 têm um risco 3 vezes superior (Stolar & Chilton, 2003). Por sua vez, as DCVs constituem também a principal causa de morte e incapacidade nos doentes diabéticos. Indivíduos diabéticos têm geralmente uma incidência de morte por doença cardíaca 3 a 5 vezes superior aos indivíduos não diabéticos. Evidências sugerem que a elevada prevalência de doenças cardíacas entre os indivíduos diabéticos é devido aos efeitos prejudiciais da hiperglicémia na fisiopatologia cardiovascular, havendo uma associação linear

entre as DCVs e os níveis de glicose no sangue (Ban *et al.*, 2009). Isto pode dever-se ao papel da hiperglicémia crónica no desenvolvimento de patologias macrovasculares (aterosclerose) através de anomalias celulares e moleculares em diversos tipos de células (Stolar & Chilton, 2003). Os mecanismos associados a este fenómeno e que, no seu conjunto, contribuem para aumentar a ocorrência e gravidade dos eventos de trombose, estreitamento dos vasos e bloqueios cardíacos, são: disfunção celular endotelial, aumento da produção de produtos glicosilados, *stress* oxidativo e vasodilatação deficiente (Stolar & Chilton, 2003; Ban *et al.*, 2009). Para além da disfunção microvascular causada pela diabetes (retinopatia, nefropatia e neuropatia), a hiperglicémia contribui ainda para o aparecimento de sequelas como o enfarte do miocárdio, AVC, doença vascular periférica e insuficiência cardíaca (Stolar & Chilton, 2003; Retnakaran & Zinman, 2008; Ban *et al.*, 2009). A diabetes está também muitas vezes associada a outros factores de risco como hipertensão e dislipidémia, ambos passíveis de serem alterados de forma a melhorar a *performance* cardíaca.

Estudos clínicos indicam que a diabetes está associada a um aumento da incidência de complicações cardiovasculares, particularmente em modelos animais com DMT1 induzida por estreptozotocina (*streptozotocin*, STZ). Diversos estudos, *in vivo* e *in vitro*, com estes e outros modelos de DMT1, têm demonstrado uma diminuição da contractilidade cardíaca. Ao mesmo tempo, um grande número de estudos tem também analisado o efeito da diabetes na morfologia e função vasculares em humanos e animais (Poston & Taylor, 1995).

Muitos estudos demonstraram efeitos contrácteis e relaxantes comprometidos em animais diabéticos, em resposta a agentes vasoactivos. Entre estes, também se detectaram alterações nas respostas à noradrenalina (NA) em artérias isoladas de diabéticos (MacLeod, 1985). Muitos estudos *in vivo* com ratos com diabetes induzida por STZ (ratos diabéticos STZ) demonstraram uma atenuação ou aumento da resposta aos agentes vasoconstrictores, como a NA. Para além disto, as respostas à acetilcolina (ACh) também diminuíram em ratos diabéticos STZ. Estes resultados sugerem anomalias na função endotelial nas artérias de ratos diabéticos. Estudos em humanos e modelos com DM demonstraram deficiências na vasodilatação mediada por NO em resposta a agonistas dos receptores muscarínicos, como a ACh (Johnstone *et al.*, 1993). Todas estas evidências sugerem que o relaxamento e contracção vasculares estão diminuídos em modelos animais e humanos com DMT1.

Frequentemente, a diabetes surge associada à síndrome metabólica, também conhecida como síndrome de resistência à insulina. Este termo refere-se a um conjunto de factores de risco (hipertensão, dislipidémia, obesidade visceral, hiperinsulinémia, disfunção endotelial e estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios) que conduzem a um grande aumento do risco de

desenvolvimento de DCVs (Stolar & Chilton, 2003). Contudo, os efeitos cardiovasculares negativos exercidos pela hiperglicémia existem independentemente de outros factores associados ao risco metabólico. É fundamental ter em conta que estes factores são agravados pela inactividade física, idade avançada e factores endócrinos e genéticos. A síndrome metabólica é uma condição progressiva e, em muitos doentes, pode culminar no aparecimento de DMT2, o que aumenta ainda mais o risco de DCV e, conseqüentemente, o risco de morbidade e mortalidade está bastante incrementado (Bano & Batool, 2007). O tratamento com agentes terapêuticos, como as estatinas e os β -bloqueadores reduz significativamente a incidência destas doenças. Porém, é ainda detectada uma grande incidência destas patologias mesmo em doentes medicados, especialmente aqueles com patologias subjacentes, como a diabetes. Deste modo, é importante desenvolver alternativas terapêuticas eficazes que possam potenciar o controlo glicémico, com o menor número de efeitos adversos, e que sejam capazes de exercer efeitos benéficos a nível cardiovascular. De facto, considerando os efeitos dos níveis elevados de glicose no sangue sobre o sistema cardiovascular, terapêuticas que visam limitar a hiperglicémia devem ter um efeito positivo sobre os eventos cardiovasculares (Ban *et al.*, 2009). Actualmente, a segurança e eficácia de muitos fármacos antidiabéticos orais (ADOs) tem sido posta em causa. Isto porque é necessário assegurar que estes agentes terapêuticos não causam efeitos adversos, sendo necessário um controlo bastante rigoroso antes da sua comercialização. Recentemente foi proposto que a classe de agentes anti-hiperglicémicos baseados em incretinas pode ter potencial para reduzir os eventos cardiovasculares associados à diabetes, o que pode constituir uma vantagem significativa sobre os fármacos tradicionalmente usados no tratamento da diabetes.

1.7. Células Progenitoras Endoteliais

1.7.1. Caracterização

O termo endotélio refere-se à camada celular interna dos vasos sanguíneos, válvulas cardíacas e numerosas cavidades do nosso organismo e serve de interface entre o sangue e as células musculares lisas (Kolluru *et al.*, 2012). O endotélio é um considerado um factor determinante da saúde vascular. Em condições normais, o endotélio desempenha funções vitais como manutenção da permeabilidade selectiva e da homeostasia, regulação do tónus vascular e das reacções imunes, síntese de componentes da matriz extracelular e síntese, secreção e metabolismo de outros componentes biologicamente activos. As células endoteliais desempenham diversas funções biológicas de extrema importância, tais como, manutenção de um fluxo sanguíneo

apropriado, prevenção da adesão plaquetária, evitando a formação de trombos, formação de novos vasos, regulação da adesão e acumulação de leucócitos (Verma & Anderson, 2002). A localização estratégica do endotélio confere-lhe a capacidade de detectar mínimas alterações no seu funcionamento e de actuar em resposta à agressão, libertando substâncias vasoactivas. Um balanço crítico entre factores relaxantes e de contracção mantém a homeostasia vascular. Quando esse equilíbrio é rompido, isso irá conduzir a eventos como: vasoconstricção, adesão de leucócitos, activação plaquetária, mitogénese, trombose, coagulação deficiente, inflamação vascular, e aterosclerose (Verma & Anderson, 2002).

O fornecimento eficiente de oxigénio e nutrientes pelos vasos sanguíneos é essencial para a sobrevivência dos tecidos. No adulto, a formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização), ocorre principalmente por angiogénese e vasculogénese. A angiogénese é referida como o processo de crescimento de vasos sanguíneos a partir dos já existentes, através da migração e proliferação de células endoteliais (Carmeliet, 2000). Por sua vez, o termo vasculogénese descreve não só o processo de formação dos vasos sanguíneos na fase embrionária, formando uma rede vascular primitiva através da diferenciação de células precursoras (angioblastos) em células endoteliais, como também a formação de vasos sanguíneos em adultos.

Uma população de células recentemente descoberta, as células progenitoras endoteliais (*endothelial progenitor cells*, EPCs) parece desempenhar um papel importante na formação de novos vasos. As EPCs foram identificadas por Asahara e os seus colaboradores, em 1997 (Asahara *et al.*, 1997). Estas células derivam da medula óssea e podem ser mobilizadas para a circulação sanguínea em resposta a vários estímulos (António *et al.*, 2010a). Numerosos estudos têm sugerido que as EPCs desempenham um papel fundamental na protecção vascular, promovendo a reparação endotelial e a neoangiogénese (Fadini *et al.*, 2007). Contribuem para a re-endotelialização dos vasos lesados e para a neovascularização induzida pela isquémia, através da sua capacidade de proliferação, migração, diferenciação e podendo ainda funcionar como fonte de factores parácrinos para citocinas pró-angiogénicas (António *et al.*, 2010a,b). Actualmente, estão descritos dois grupos específicos de EPCs: i) EPCs directamente identificadas na circulação periférica e ii) culturas de EPCs no sangue, medula óssea e de outras fontes. As EPCs possuem marcadores de superfície comuns a linhagens hematopoiéticas (CD34, CD133 e VEGFR2) e endoteliais (KDR, CD31, e vWF) (Fadini *et al.*, 2005). A função do CD34 é predominantemente a adesão célula-a-célula (Sen *et al.*, 2011; António *et al.*, 2010 a,b). A caracterização funcional das EPCs baseia-se no processo pelo qual as células são activadas e deslocadas para os locais onde ocorreu a lesão, onde exercem a sua função. As EPCs residem num local do interior da medula óssea caracterizado por uma baixa pressão de oxigénio e elevados níveis de *Stromal cell-derived factor or pre-B Cell Growth*

Stimulation Factor (SDF-1 α)/ CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), sendo que este último se liga via *chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)*.

1.8. Importância do Monóxido de Azoto na mobilização das EPCs

O monóxido de azoto, geralmente chamado óxido nítrico (NO), é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor (Beckman & Koppenol, 1996). Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas um membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e potencialmente carcinogêneos (James, 1995). Actualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. É considerado o factor de relaxamento derivado do endotélio chave que desempenha um papel fundamental na manutenção do tónus vascular e reactividade (Moncada *et al.*, 1991). Este radical é produzido pela sintase de óxido nítrico (*Nitric oxide synthase*, NOS), que catalisa a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO. Até ao momento foram caracterizadas três isoformas principais da NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e indutível (iNOS). Estudos referem o papel essencial da eNOS ao nível da angiogénese e vasculogénese. A eNOS é expressa constitutivamente pelas células endoteliais vasculares, tem uma actividade dependente de cálcio e gera níveis relativamente baixos de NO (Editors *et al.*, 2002). Uma libertação contínua de pequenas quantidades de NO pela eNOS causa relaxamento do músculo liso vascular e mantém-no num estado de vasodilatação activa, o que torna o que torna esta enzima crucial na regulação da função endotelial (Kietadisorn *et al.*, 2012). O NO produzido medeia uma variedade de funções fisiológicas *in vivo*, nomeadamente neovascularização, regulação do tónus vascular, transmissão sináptica, e permeabilidade vascular (Duda *et al.*, 2004). Para além disto, o NO tem ainda um papel importante no relaxamento do músculo liso que rodeia as arteríolas e a manutenção da função vascular por inibição dos eventos de vasoconstrição, adesão de leucócitos, agregação plaquetária e proliferação celular (Kietadisorn *et al.*, 2012). A libertação de NO ocorre através da fosforilação da eNOS dependente da via *fosfatidilinositol 3- cinase (PI3K)/ Protein Kinase B (Akt)*. Por sua vez, a iNOS é regulada por citocinas inflamatórias e outros estímulos, é independente de cálcio e gera níveis mais elevados de NO. Finalmente, a nNOS medeia a transmissão de sinais neuronais (Duda *et al.*, 2004).

O NO produzido pela eNOS atravessa o espaço entre o endotélio e o músculo liso vascular e estimula directamente a enzima guanilato ciclase (*guanylyl cyclase*, GC) solúvel e a consequente formação de guanosina monofosfato cíclico (*cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) intracelular, resultando no relaxamento das células do músculo liso vascular (Duda *et al.*, 2004;

Joshua *et al.*, 2005). No entanto, o NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Para além de estar envolvido no relaxamento vascular e de ter um papel de grande importância na protecção do vaso sanguíneo, ele constitui ainda um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras activadas, capaz de destruir agentes patogénicos e células tumorais. Possui, também, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto, o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade ocorre particularmente em situações de *stress* oxidativo, geração de intermediários do oxigénio e deficiência do sistema antioxidante. Assim, a produção equilibrada de NO e ROS pelas células endoteliais é de fundamental importância na homeostasia vascular, ajudando na prevenção de DCVs. A disfunção endotelial é um estado patológico do endotélio e caracteriza-se por um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras produzidas pelo endotélio ou que nele actuam, isto é, existe um desequilíbrio entre as lesões endoteliais e a capacidade de recuperação (Deanfield *et al.*, 2005). A disfunção endotelial manifesta-se por anomalias na vasodilatação endotelial e pela ocorrência de processos inflamatórios. Posto isto, a disfunção endotelial é considerada como o factor inicial para o desenvolvimento da aterosclerose (António *et al.*, 2010a, Van & Conraads, 2010). É fundamental manter a função endotelial normal, pois apesar da disfunção endotelial ser um fenómeno decorrente da idade, mesmo em indivíduos saudáveis, ela está directamente relacionada com desenvolvimento de DCVs. A diminuição da biodisponibilidade de NO, tem sido proposta como um importante mecanismo para o desenvolvimento de disfunção endotelial. Especificamente, a disfunção endotelial está associada à redução da produção de NO, propriedades anticoagulantes, aumento da agregação de plaquetas, aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento da expressão das quimiocinas e citocinas e aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*, ROS) a partir do endotélio. Todos estes factores estão possivelmente envolvidos no desenvolvimento de complicações macro e microvasculares das doenças vasculares da diabetes (Oyadomari *et al.*, 2001; António *et al.*, 2010a).

Após tudo isto, é importante realçar que a expressão e fosforilação da eNOS são essenciais para a sobrevivência, migração e angiogénese de EPCs e das células endoteliais. O NO derivado da eNOS tem sido identificado por promover a mobilização de EPCs da medula óssea através da nitrosilação e da elevada expressão do factor de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF). A biodisponibilidade de NO é, deste modo, essencial para a actividade funcional normal das EPCs (António *et al.*, 2010a). As EPCs circulantes podem, assim, representar um mecanismo de reparação endógena essencial para manter a função endotelial normal (António *et al.*, 2010a; Thum *et al.*, 2007). O recrutamento de EPCs da medula óssea para

os locais de angiogénese ou regeneração de vasos sanguíneos ocorre em resposta a factores de crescimento e citocinas, incluindo o VEGF, SDF-1 α , *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), eritropoietina (EPO) e estrogénios (Lovshin, J.A *et al.*, 2009; António *et al.*, 2010a). Estes agentes actuam através da via PI3K/Akt para activar a eNOS por fosforilação do resíduo de Ser 1177 e resultam no aumento da produção de NO (Sen *et al.*, 2011). A libertação de EPCs a partir da medula óssea é também dependente da actividade de *Matrix metalloproteinases* (MMPs), como a MMP-9. Uma redução do NO em circulação resulta na redução dos níveis de MMP-9 e da mobilização de EPCs, mesmo na presença de elevadas concentrações sanguíneas de VEGF. Concluindo, com base na interacção e influência directa das EPCs na função endotelial, estas células podem ser consideradas como um biomarcador robusto para as DCVs (António *et al.*, 2010b).

1.8.1. Importância das EPCs na diabetes

Durante a última década, um número significativo de resultados experimentais tem sugerido que alterações nas EPCs podem ter um importante papel no desenvolvimento e progressão de quase todas as complicações da diabetes (Brownlee, 2005).

A preservação da estrutura e funcionalidade do endotélio depende: i) do equilíbrio entre a produção real de NO e de ROS e ii) da regeneração do endotélio por EPCs circulantes (Van & Conraads, 2010). A diminuição da produção de NO conjuntamente com o *stress* oxidativo, resulta na diminuição da biodisponibilidade de NO. Ao mesmo tempo, a apoptose de células endoteliais e alterações no número e função das EPCs conduzem a deterioração da função vascular (Heiss *et al.*, 2005). A reparação endotelial não depende apenas da migração e proliferação de células maduras endoteliais. Está demonstrado que EPCs derivadas da medula óssea também intervêm neste processo (Asahara *et al.*, 1997). A diferença entre estes dois tipos de células reside no facto das células maduras endoteliais possuírem apenas capacidade de reparação, ao passo que as EPCs dirigem-se para os locais com lesões endoteliais e isquémicas, onde proliferam, diferenciam-se e integram a camada endotelial, ou ainda exercendo uma função parácrina pela produção de factores de crescimento vascular (Van *et al.*, 2010). Com base em diversos estudos, verificou-se que a redução no número e função das EPCs parece contribuir significativamente para a aterogénese e a consequente progressão da doença aterosclerótica na diabetes. Ao mesmo tempo, uma diminuição no número e na capacidade de migração e de adesão de EPCs às células endoteliais maduras, bem como um aumento da taxa de apoptose, foram descritos em culturas de EPCs em condições de

elevadas concentrações de glicose (Kränkel *et al.*, 2005). A síndrome metabólica, hipertensão, hipercolesterolemia e o tabagismo estão também associados com a insuficiência do número e função das EPCs. Da mesma forma, estudos recentes mostraram números reduzidos e uma degradação das EPCs quer em doentes com DM1, quer em doentes com DM2 (Thum *et al.*, 2007; Fadini *et al.*, 2010). Observou-se ainda que as EPCs de doentes diabéticos produzem quantidades excessivas de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e apresentam uma menor capacidade migratória quando em comparação com indivíduos controlo não diabéticos (Thum *et al.*, 2007). Além disso, evidências sugerem que há uma correlação negativa entre a gravidade da diabetes e o número e função das EPCs (António *et al.*, 2010b).

Evidências científicas demonstram que a vasodilatação endotelial está alterada em situações de hiperglicémia em pessoas normais e diabéticas (Du *et al.*, 2001). No entanto, o mecanismo responsável pelas alterações no relaxamento endotelial em situações de diabetes ainda permanece pouco esclarecido. É por isso, fundamental realizar estudos no sentido compreender de que forma as alterações na biodisponibilidade do NO contribuem para este estado patológico e avaliar o envolvimento da eNOS na patogénese da disfunção endotelial associada à diabetes. Elevadas concentrações de NO produzem efeitos tóxicos irreversíveis, nomeadamente no sistema cardiovascular. O NO é um radical livre que vai ser rapidamente inativado na parede dos vasos devido à sua interacção com $O_2^{\cdot-}$, levando à produção de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um potente peroxidante que causa danos celulares significativos (Beckman & Koppenol, 1996). Isto é, o NO exerce funções fisiológicas em baixas concentrações e patológicas em elevadas concentrações. As acções patológicas do NO não são mediadas por si só, mas sim pelos seus produtos de oxidação. Todos estes factores culminam num estado de *stress* oxidativo que consiste num desequilíbrio entre as ROS e os mecanismos celulares responsáveis por detoxificar os intermediários reactivos ou por reparar os danos resultantes. Por todas estas razões, métodos que possam estimular a produção de EPCs na diabetes são actualmente alvo de uma vasta pesquisa.

1.9. Mecanismos moleculares associados à DM

A insulina desempenha um papel central na manutenção da homeostasia da glicose em humanos e animais (Jiang & Zhang, 2005). Esta hormona é sintetizada pelas células beta (β) dos ilhéus de Langerhans pancreáticos em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos, após as refeições (Pessin & Saltiel, 2000). É sintetizada sob a forma de pré-pró-insulina, que migra para o complexo de Golgi, onde sofre clivagem e origina insulina e peptídeo

C. A insulina regula a homeostasia da glicose actuando a vários níveis: reduz a produção hepática de glicose (via diminuição da neoglucogénese e glicogenólise) e aumenta a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogénese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise (Pessin & Saltiel, 2000), bem como aumenta a síntese proteica e inibe a sua degradação.

As acções biológicas da insulina são mediadas por receptores de membrana celular, que apresentam actividade de tirosina-cinase intrínseca (Figura 6). O receptor de insulina (*insulin receptor*, IR) é uma proteína heterotetramérica formada por duas subunidades alfa (α) extracelulares, dispostas simetricamente e que se ligam, cada uma delas, por pontes de dissulfeto a uma subunidade β transmembranar, com domínio intracelular, que possui actividade de tirosina-cinase intrínseca (Chang et al., 2005). O IR actua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a actividade de tirosina-cinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α do receptor induz uma alteração conformacional, seguida de autofosforilação da subunidade β . A activação do IR resulta na activação da cinase do receptor e consequentemente na fosforilação de resíduos de tirosina dos diferentes substratos do receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrates*, IRS-1, IRS-2 e IRS-3), e proteínas adaptadoras Gab1, Shc, Grb1, SIRPS, e outras (Jiang & Zhang, 2005), desencadeando a activação de diversas cascatas de sinalização e a ocorrência de diversas respostas celulares (Pirola et al., 2004). Deste modo, são activadas duas vias principais: a via da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/*extracelular signal-regulated kinase* (ERK), que regula a expressão génica e o crescimento celular, e a via da PI3K/Akt, que está preferencialmente envolvida na maioria das acções metabólicas da insulina (Saltiel & Kahn, 2001).

A insulina estimula a MAPK. Esta via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou *Src homology 2 domain containing* (SH2) que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) está constitutivamente associada à SOS (*Son of sevenless*), uma proteína que troca *guanosine diphosphate* (GDP) por *guanosine triphosphate* (GTP) da Ras (*related GTP-binding protein A*), activando-a. A activação da Ras requer a activação da SHP2. Uma vez activada, a Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK, o que estimula a proliferação e diferenciação celular (Bevan, 2001).

A PI3K é uma serina/treonina cinase composta por subunidades regulatórias e catalíticas, cuja actividade é essencial para diversos processos metabólicos induzidos pela insulina. A maioria dos tecidos expressa duas formas de subunidades regulatórias, p85 α e p85 β e duas formas de subunidades catalíticas, p110 α e p110 β . A activação da PI3K estimulada pela insulina inicia-se quando proteínas IRS são fosforiladas em múltiplos resíduos de tirosina (Tyr), decorrentes da

activação do IR. A fosforilação em Tyr das proteínas IRS cria locais de reconhecimento para moléculas que contenham domínios SH2, tais como a PI3K (Bevan, 2001). A interacção entre os IRS e a PI3K ocorre através da subunidade regulatória p85 da enzima, e resulta no aumento da actividade catalítica da subunidade p110. Uma vez activada, a subunidade catalítica da enzima catalisa a fosforilação de fosfatidilinositois na posição 3 do anel inositol, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP), fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 actua como segundo mensageiro intracelular e regula a localização e actividade de diversas proteínas intracelulares, como a PDK-1 e 2 (PDK = *PIP3-dependent protein kinase*). Por sua vez, a PDK-1 fosforila e activa a PKB/Akt, uma serina/treonina cinase que possui três isoformas (Akt 1, Akt 2 e Akt 3) e cuja activação regula várias respostas fisiológicas da insulina, como a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática, a síntese de glicogénio e outros efeitos metabólicos. A PKB fosforila e inactiva a enzima *glycogen synthase kinase 3* (GSK-3), responsável pela fosforilação e inactivação da enzima glicogénio sintase (GS), estimulando a síntese de glicogénio e também activa a proteína *AS160 Rab GTPase activating protein* (Rab-GAP AS160) que facilita a translocação do GLUT-4. Adicionalmente, a PKB possui outras funções não metabólicas, tais como a inibição de apoptose e degradação proteica no músculo esquelético através da fosforilação e inactivação da proteína *Bcl2 antagonist of cell death* (Bad) e de factores de transcrição como a *Forkhead box protein O* (FoxO), respectivamente. Além de fosforilar a Akt, pensa-se que a PDK-1 seja capaz de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da proteína cinase C (*Protein kinase C*, PKC) envolvidas na síntese proteica e no transporte de vesículas de GLUT-4 para a membrana celular para promover a captação de glicose.

Para além da fosforilação de resíduos de Tyr, ambos o IR e as proteínas IRS podem ser fosforilados em resíduos de serina/treonina, o que atenua a transmissão do sinal pela diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em resíduos de Tyr após a ligação da insulina. Estas fosforilações inibitórias causam feedback negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina.

Existe uma segunda via independente da activação da PI3K, que é também responsável pelo transporte de glicose. Esta via envolve a fosforilação do protooncogene c-Cbl, que surge geralmente associado à proteína adaptadora CAP (Cbl-associated protein). Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína adaptadora CrkII, que está constitutivamente associada à proteína C3G. A C3G é uma proteína de troca de nucleótidos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10, activando-a. A TC10, por sua

vez, desencadeia a translocação de GLUT-4 para a membrana celular, paralelamente à activação da via da PI3K.

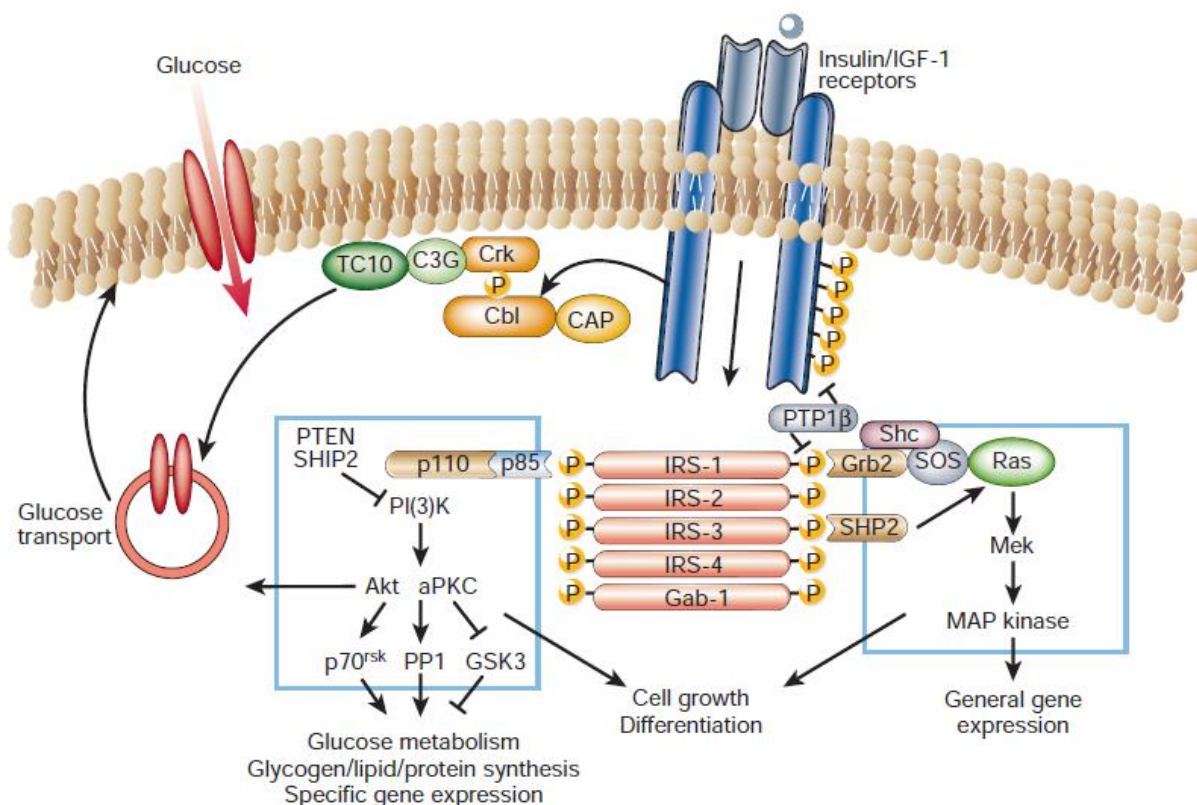


Figura 6 - Vias de sinalização da insulina. O receptor de insulina é uma tirosina-cinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas de sinalização através dos seus domínios SH2, resultando na activação de vias de sinalização intracelular como a via da PI3K, a cascata da MAPK e a activação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogénio, lípidos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário. (Retirado de Saltiel & Kahn, 2001)

1.10. Stress Oxidativo na DM

O *stress* oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos, como antioxidantes não enzimáticos ou enzimáticos, que as removam ou reparem os danos por elas causados. Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas como o NADH, equilíbrio esse mantido por enzimas à custa de energia metabólica. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares.

Geralmente, a diabetes é acompanhada por aumento da produção de radicais livres ou de uma disfunção dos mecanismos de defesa antioxidantes. A hiperglicémia é um dos factores que contribui para os danos a nível endotelial, em parte por aumentar a produção de ROS. Uma disfunção na produção de radicais livres e o declínio simultâneo dos mecanismos de defesas antioxidantes pode conduzir a danos celulares e enzimáticos, aumento da peroxidação de lípidos e desenvolvimento de resistência à insulina. De acordo com várias evidências, o aumento do *stress* oxidativo tem sido uma proposta amplamente aceite para o desenvolvimento e progressão da diabetes e das suas complicações, como a hipertensão. Como tal, fármacos que simultaneamente sejam capazes de reduzir os níveis de glicose no sangue e de exercer efeitos favoráveis ao nível do endotélio vascular poderão ser fundamentais para o tratamento destes doentes.

1.11. Disfunção endotelial na DM

As complicações vasculares são a maior causa de morbimortalidade em pacientes com diabetes. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças micro e macrovasculares são complexos e ainda parcialmente compreendidos. Estudos realizados em vasos sanguíneos humanos isolados (Saenz *et al.*, 1989) e em ratos (Bucala & Tracey, 1991) revelam a existência de uma disfunção das células endoteliais ou uma redução da resposta ao NO endotelial em situações de diabetes (Cohen, 1995). Existem evidências da ocorrência de disfunção vasomotora em modelos experimentais e em estudos clínicos, tanto na DMT1 como na DMT2. Observações em culturas de células endoteliais com elevadas concentrações de glicose mostram um aumento da sua apoptose (Baumgartner-Parzer *et al.*, 1995), sugerindo o potencial da hiperglicémia no dano endotelial em pacientes diabéticos. Em estados iniciais de diabetes, existe uma selectiva disfunção dos receptores de agentes endotélio-dependentes, tais como a ACh e *Adenosine diphosphate* (ADP), que levam a uma diminuição da libertação de NO ou da resposta ao mesmo (Hattori *et al.*, 1991). Em estados mais avançados da doença, os níveis de cGMP são diminuídos, sugerindo que a libertação de NO ou sua acção sobre a GC é muito reduzida (Kamata *et al.*, 1992). A redução da resposta ao NO em vasos diabéticos pode ser devido a um aumento da destruição de NO endotelial pelas ROS, cuja produção está aumentada em doentes diabéticos, como vimos anteriormente. Simultaneamente, as ROS podem actuar como um factor contráctil endotelial. Na DMT1, diversos factores, como a hiperglicémia aguda, mau controlo glicémico crónico e o tempo de diagnóstico estão associados a disfunção endotelial (Joshua *et al.*, 2005). Um estado de hiperglicémia

prolongado resulta em várias alterações bioquímicas ao nível dos tecidos, incluindo a microvasculatura.

Tem sido demonstrado que a disfunção endotelial tem um papel essencial no prognóstico de eventos vasculares, pelo que um teste de função endotelial pode potenciar a detecção de DCVs, tais como enfarte do miocárdio, doença vascular periférica, AVC isquémico, e outros. Uma característica importante da disfunção endotelial é a incapacidade das artérias e arteríolas para dilatar de forma otimizada em resposta aos vasodilatadores que actuam no endotélio (Kolluru *et al.*, 2012). Esta disfunção endotelial está claramente associada à diminuição da biodisponibilidade do NO, que pode ser devida a deficiências na sua produção ou ainda pelo aumento da inactivação pelas ROS.

Ambas as células endoteliais e as células musculares lisas são capazes de produzir ROS a partir de uma variedade de fontes enzimáticas. Em estados patológicos como a diabetes, a produção vascular destas substâncias pode aumentar substancialmente (Kaneto *et al.*, 2010). Assim, o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ pode causar a diminuição da biodisponibilidade de NO através de uma reacção que ocorre mais rapidamente do que a reacção da superóxido dismutase (SOD) com o O_2 (Pacher *et al.*, 2007). Estes eventos vão alterar a regulação da vasomotricidade endotelial em diversas condições patológicas. No entanto, existem ainda diversas enzimas envolvidas na produção das ROS, ao mesmo tempo que o desacoplamento mitocondrial também produz estas espécies reactivas através de vários mecanismos. O $O_2^{\cdot-}$ libertado pela mitocôndria pode formar H_2O_2 e conduzir ao desacoplamento do metabolismo da glicose dependente da secreção de insulina.

Na DMT1, células T autoreactivas reconhecem e libertam citocinas pró-inflamatórias e ROS (Bottino *et al.*, 2004). Elevados níveis de *stress* oxidativo causam a destruição das células β (Nishikawa *et al.*, 2000). A vasodilatação endotelial está, deste modo, prejudicada em animais e humanos diabéticos. A produção vascular excessiva de superóxido contribui para o enfraquecimento do vasorrelaxamento endotélio-dependente (Kim *et al.*, 2002). Resultados de estudos em ratos diabéticos STZ mostraram que o pré-tratamento com a SOD e/ou catalase melhorou a disfunção endotelial, o que comprova que a produção vascular de superóxido e H_2O_2 pode contribuir para a disfunção endotelial (Alexander, 1995). Outro mecanismo envolve a inactivação directa do *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) através dos AGEs e do aumento da adesão de leucócitos ao endotélio (Vitek *et al.*, 1994).

Por outro lado, evidências demonstram que a falta de insulina e de peptídeo C em doentes com DMT1 são responsáveis por parte da diminuição da resposta dilatadora à estimulação pelo NO endógeno. Existe um papel sinérgico entre estas duas hormonas. Assim, resultados referem

que a falta de insulina facilita o desenvolvimento de um ambiente de *stress* oxidativo na célula que pode levar à diminuição da disponibilidade de NO devido à sua utilização na formação das ROS ou devido ao desacoplamento da eNOS. Por sua vez, o peptídeo C parece ser necessário para a normal actividade da Na^+K^+ ATPase e sua perda com o desenvolvimento da DMT1 pode, de alguma forma, danificar a activação da eNOS (Joshua *et al.*, 2005). Assim sendo, um efeito sinérgico entre estes dois agentes biológicos é necessário para manter a função dilatadora normal das células endoteliais (Figura 7). O tratamento da DMT1 com reposição de insulina é, como iremos ver em seguida, uma ferramenta utilizada para tratar perturbações no metabolismo da glicose, no entanto muitas das anomalias vasculares associada a esta doença persistem, pelo que a suplementação do tratamento com peptídeo C poderá exercer efeitos benéficos para o tratamento destes doentes.

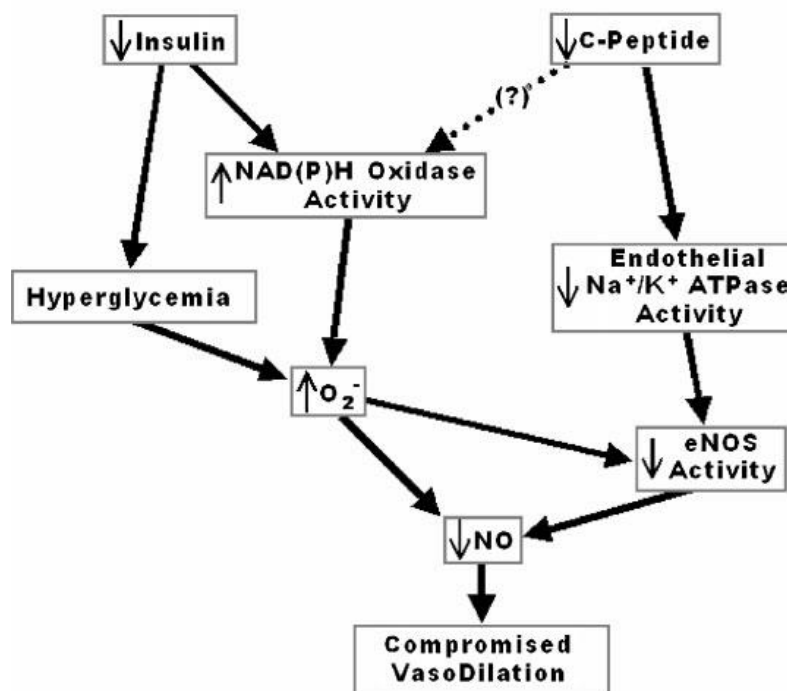


Figura 7 - Diagrama que representa os possíveis mecanismos para explicar a atenuação das respostas dilatadoras endoteliais (disfunção endotelial) observadas com o desenvolvimento de DMT1. (Retirado de Joshua *et al.*, 2005)

1.11.1. Mecanismo eNOS *uncoupling*

Em condições fisiológicas, a eNOS confere protecção vascular anti-aterosclerótica e geralmente, uma maior expressão da eNOS é considerada benéfica. No entanto, sob determinadas condições fisiopatológicas, a regulação positiva da expressão da eNOS está associada à redução da

vasodilatação endotélio-dependente, fenómeno este que é explicado pela eNOS *uncoupling*, que segundo pesquisas recentes constitui uma das principais causas subjacentes à disfunção endotelial encontrada na aterosclerose, hipertensão e lesões de isquémia e reperfusão (Kietadisorn *et al.*, 2012). Para além disto, este mecanismo parece também ser importante na disfunção endotelial associada à diabetes (Thum *et al.*, 2007). Ou seja, a produção de grandes quantidades de NO, particularmente quando associadas com o *stress* oxidativo tem a capacidade de afectar diversas enzimas e vias de sinalização. Evidências demonstram que o mecanismo da eNOS *uncoupling* é a causa subjacente de disfunção endotelial em diversos modelos animais, como o rato STZ diabético (Hink *et al.*, 2001).

Em situações de hiperglicémia crónica há um aumento do *stress* oxidativo e uma inibição da actividade da eNOS (Kietadisorn *et al.*, 2012). A inibição da NOS com L-NAME (*L-NG-Nitroarginine Methyl Ester*) atenua a produção destas espécies e normaliza a capacidade funcional das EPCs de doentes diabéticos. Os mecanismos moleculares subjacentes ao desacoplamento da eNOS não estão ainda completamente clarificados, mas foi proposto que a redução da biodisponibilidade de *tetrahydrobiopterin* (BH4), um cofactor essencial à óptima actividade da eNOS, e o envolvimento da PKC estão relacionados com a produção exagerada de $O_2^{\cdot-}$. O BH4 facilita a transferência de electrões do NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) a partir do domínio redutase da eNOS para o domínio oxigenase, para converter a L-arginina em NO e L-citrulina. Quando os níveis de BH4 são inadequados, a eNOS torna-se instável e desacoplada, levando a uma menor produção de NO e a um aumento da produção de superóxido. Além disso, a interacção entre o NO e o superóxido conduz à formação de peroxinitrito, um oxidante potente, que oxida ainda mais o BH4. Apesar de muitos estudos terem mostrado que a sobre-expressão da eNOS gera efeitos vasoprotectores através do aumento da produção de NO pelo endotélio (Kawashima *et al.*, 2001), em situações de disfunção endotelial, a expressão da eNOS permanece em níveis normais e, em alguns casos, estes níveis estão aumentados (Channon, 2004). De facto, um aumento da expressão da eNOS, sem um aumento adicional dos níveis de BH4, resulta no desacoplamento da eNOS devido ao desequilíbrio criado pela falta do cofactor enzimático (Bendall *et al.*, 2005), tal como ilustra a figura 8.

A eNOS regula a mobilização e função das EPCs, que constituem reguladores-chave na protecção vascular (Fadini *et al.*, 2007). O desacoplamento da eNOS resulta na formação de espécies $O_2^{\cdot-}$, diminuindo a disponibilidade de NO, causando uma redução do número e função das EPCs e, conseqüentemente disfunção endotelial diabética.

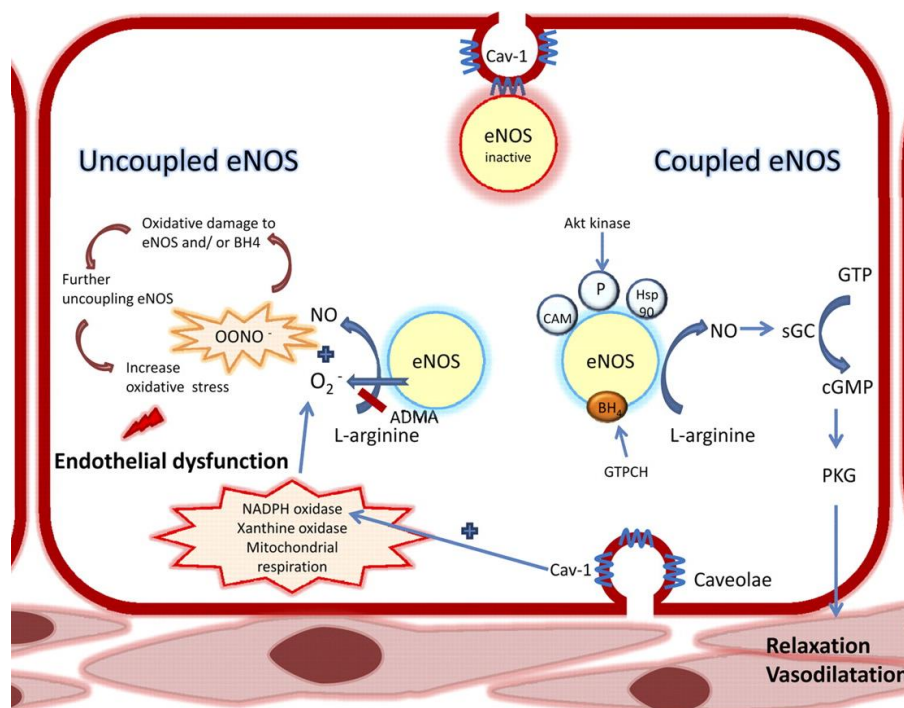


Figura 8 – Mecanismos de sinalização que conduzem à disfunção endotelial na diabetes: papel central do desacoplamento da eNOS na patogênese da disfunção endotelial. Nas células endoteliais, a eNOS está inativa quando ligada à caveolina (*caveolin 1*, CAV-1). Para se tornar activa, a eNOS dissocia-se da cav-1 e liga-se à calmodulina (CAM) e à *heat shock protein 90* (Hsp90) e em conjunto com a fosforilação dos locais serínicos (por exemplo, Ser1177). A proteína eNOS funcional é um dímero (*coupled eNOS*). O BH4 é um cofactor essencial para a actividade óptima da eNOS. A eNOS é constituída por dois tipos de proteínas globulares (domínios reductase e oxidase). O BH4 facilita a transferência de electrões derivados do NADPH do domínio reductase da eNOS para o domínio oxigenase, de forma a converter a L-arginina em NO e L-citrulina. Quando os níveis de L-arginina ou BH4 são inadequados, a eNOS torna-se instável e desacoplada, o que se traduz numa menor produção de NO e numa maior produção de superóxido. Além disso, a interacção entre o NO e o superóxido leva à formação de peroxinitrito, um potente oxidante, que oxida o BH4, resultando no desacoplamento da eNOS, e subsequentemente na disfunção endotelial. (Adaptado de Kietadisorn *et al.*, 2012)

1.12. Terapêutica da DM

Embora os dois tipos de diabetes sejam muito diferentes no que respeita à fisiopatogenia da doença, eles apresentam consequências comuns, que se caracterizam por um declínio da massa de células β funcionais, que origina a desregulação do metabolismo lipídico e dos hidratos de carbono (Reimann *et al.*, 2009). Desde sempre que o objectivo primordial da terapêutica farmacológica para a diabetes consistiu em controlar a hiperglicémia, evitando as graves complicações associadas à exposição dos tecidos a concentrações excessivamente elevadas de glicose (Hinnen & Nielsen, 2006). Apesar dos enormes avanços na medicina durante o século passado, até ao momento ainda não foi encontrada cura para a diabetes, pelo que o principal objectivo no tratamento desta doença tem-se baseado em minimizar ao máximo qualquer elevação nos níveis de glicose sanguínea para

manter os níveis dentro de valores o mais perto possível dos níveis normais, minimizando sempre a ocorrência de episódios de hipoglicémia. Isto porque um controlo metabólico rigoroso é fundamental para retardar ou até mesmo impedir as complicações crónicas da diabetes já vistas anteriormente. No entanto, na última década assistimos a uma mudança paradigmática nas abordagens para o tratamento desta epidemia. Para além de reduzir a hiperglicémia, actualmente, as terapêuticas pretendem preservar e regenerar as células β responsáveis pela produção de insulina e, deste modo, prevenir o início da doença (Meier, 2008). A escolha do tratamento, quer seja em monoterapia ou por associação de vários fármacos, segue critérios que devem ser avaliados, nomeadamente o perfil clínico do doente: peso, idade, valores das glicémias em jejum e pós-prandial, valores de HbA1c, presença de complicações, outros distúrbios metabólicos e doenças associadas, assim como possíveis interações com outros medicamentos, reacções adversas e contra-indicações.

A terapêutica convencional da diabetes é geralmente feita por insulino-terapia e/ou pela administração de ADOs, cujos mecanismos de acção serão clarificados em seguida.

1.12.1. Insulino-terapia

A insulina é usada no tratamento de doentes com todos os tipos de diabetes. Uma vez que, como já vimos, a DMT1 se caracteriza pela ausência/deficiência desta hormona, é necessária a suplementação com doses diárias ajustadas de insulina exógena, administrada por via subcutânea, para promover um controlo glicémico rigoroso e diminuir a maioria das complicações diabéticas crónicas (Ding *et al.*, 2013). Por sua vez, a DMT2 pode progredir da resistência à insulina para uma insuficiência da mesma, como resultado de um declínio da função das células β . Dessa forma, doentes com este tipo de diabetes também podem desenvolver a necessidade da terapêutica insulínica.

A descoberta da insulina em 1921 constituiu um passo muito importante na terapêutica para a DMT1, sendo que nessa altura se pensou que esta hormona pudesse representar a cura para esta patologia crónica. No entanto, frequentemente, mesmo após a administração de insulina, os doentes podem continuar a apresentar algumas complicações, bem como uma taxa de mortalidade e morbidade elevadas (Atkinson & Eisenbarth, 2001). Os riscos e os efeitos adversos mais relevantes da terapêutica insulínica são os episódios de hipoglicémia e o aumento do peso corporal. Contudo, nas últimas décadas surgiram alguns avanços significativos que iremos abordar em seguida e que permitem contornar este problema constituindo mais-valias para a terapêutica da DMT1.

1.12.2. Antidiabéticos Oraís

Os ADOs são fármacos que têm como finalidade reduzir a glicémia e mantê-la em níveis normais (inferior a 99 mg/dL em jejum). Os actualmente disponíveis na terapêutica podem ser subdivididos em três tipos, tendo em conta o seu principal modo de acção: secretores de insulina (sulfonilureias, as meglitinidas e as incretinas), que estimulam o pâncreas a produzir esta hormona, os sensibilizadores da insulina (biguanidas e as glitazonas), que tornam o organismo mais sensível à acção da insulina e ainda os inibidores da α -glucosidase, que reduzem a velocidade de digestão e absorção de hidratos de carbono (Krentz & Bailey, 2005). Em ensaios clínicos de fase III estão os inibidores dos transportadores sódio-glicose tipo 2 (*sodium glucose transporters 2*, SGLT-2), as gliflozinas.

Os ADOs são utilizados há vários anos como terapêutica para a DMT2, porém, apesar da sua eficácia estar comprovada, existe alguma controvérsia quanto à sua utilização devido à existência de algumas limitações à sua acção: elevada frequência de efeitos adversos (aumento de peso, hipoglicémia, edema, efeitos gastrointestinais), dificuldade em assegurar um bom controlo glicémico a longo prazo, sendo também contra-indicada a sua administração em doentes idosos e/ou com determinadas patologias (De León *et al.*, 2006). Para além disto, verifica-se também um aumento dos níveis de glicose e HbA1c ao longo do tempo, o que pode ser um indício da disfunção progressiva das células β pancreáticas. Além do mais, estes fármacos também não são eficazes no tratamento de doentes diabéticos tipo 1, pois nestes a secreção de insulina é nula ou praticamente nula, embora possam ser usados como co-adjunvantes, melhorando a utilização periférica da glicose.

Assim sendo, quando as terapêuticas convencionais são insuficientes no controlo da progressão da doença, outros agentes terapêuticos hipoglicemiantes podem ser administrados. O conhecimento emergente dos mecanismos que envolvem a fisiopatologia da DM permite que sejam investigados novos alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos promissores para o tratamento desta patologia. Com base na descoberta de La Barre, em 1932, de que uma substância sintetizada no intestino, à qual chamou incretina, apresentava propriedades hipoglicémiantes e que poderia ser usada no tratamento da DMT2 (Barre, 1932), o foco de investigação voltou-se para uma nova classe de substâncias cuja acção se baseia no “Efeito incretina”, sendo este mediado pelas principais hormonas incretinas: o peptídeo insulínico dependente de glicose (*Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*, GIP, ou *Gastric Inhibitory Polypeptide*) e o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (*Glucagon-Like Peptide-1*, GLP-1) (Fortin *et*

al., 2010). Desta classe fazem parte os medicamentos com acção semelhante à do GLP-1 (miméticos e análogos das incretinas), e as gliptinas, que actuam como inibidores da enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV).

1.12.3. Incretinas

1.12.3.1. Metabolismo fisiológico da glicose

O conceito de que a administração por via oral de nutrientes (glicose) potencia a secreção de insulina num grau muito mais elevado (aproximadamente 60% maior) em comparação com a mesma quantidade de glicose plasmática administrada por via parenteral é conhecido por “Efeito incretina” (Ussher & Drucker, 2012). A relação entre o intestino e as células dos ilhéus pancreáticos foi denominada de “eixo entero-insular”, um termo pela primeira vez usado por Unger e Eisentraut (Unger & Eisentraut, 1969). As incretinas são um grupo de hormonas peptídicas gastrointestinais libertadas por células endócrinas do intestino ao longo do dia, e os seus níveis aumentam após uma refeição. Apresentam actividade insulínica, integrando um sistema endógeno envolvido na regulação fisiológica da homeostasia da glicose, isto é, potenciam a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, em resposta ao aumento dos níveis de glicose do sangue, podendo ser responsáveis por mais de 70% da secreção pós-prandial de insulina. Para além disto, tem sido cada vez mais referido que as incretinas possuem outras funções independentes da redução da glicose, tais como a expansão dos ilhéus pancreáticos através da indução da proliferação e sobrevivência das células β (Chyan & Chuang, 2007), o metabolismo ósseo, neuroproteção e cardioproteção (Davidson, 2013).

Em indivíduos normais, com o aumento das concentrações de glicose no sangue (período pós-prandial), as incretinas GLP-1 e GIP aumentam a síntese e libertação de insulina dependente de glicose a partir das células β pancreáticas, através de mecanismos de sinalização intracelular que envolvem a adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Fortin *et al.*, 2010; Lenski *et al.*, 2011). Os efeitos do GLP-1 e do GIP são dependentes da glicose pelo que, quando as concentrações de glicose no sangue são baixas não se observa estimulação da libertação de insulina nem supressão da secreção de *glucagon* logo, o GLP-1 não compromete a resposta normal do *glucagon* à hipoglicémia. No seu conjunto, as hormonas incretinas e os seus receptores contribuem em vários níveis para a manutenção da homeostasia normal da glicose e para a regulação do peso corporal (Fortin *et al.*, 2010).

1.12.3.2. Caracterização das hormonas GIP e GLP-1

O GIP foi a primeira hormona incretina descrita e é um peptídeo constituído por 42 aminoácidos que é sintetizado e secretado principalmente a partir das células K presentes no duodeno e no jejuno, mas também pelas células α pancreáticas e alguns neurónios (Takeda *et al.*, 1987). Em jejum são secretados níveis basais de GIP, sendo que os seus níveis plasmáticos aumentam substancialmente em poucos minutos após a ingestão de nutrientes (Holst & Gromada, 2004). Apesar da principal acção do GIP ser a estimulação da secreção de insulina em resposta à glicose (actividade insulínica), este também é responsável por regular o metabolismo dos lípidos nos adipócitos, nomeadamente pela estimulação da actividade da lipoproteína lipase e incorporação e síntese de ácidos. Simultaneamente, o GIP promove a proliferação das células β e a sobrevivência celular (Drucker, 2003).

O GIP é menos susceptível que o GLP-1 à DPP-IV, sendo o seu tempo de semi-vida de aproximadamente 2 minutos em modelos animais (Kieffer *et al.*, 1995), 7 minutos em indivíduos saudáveis e cerca de 5 minutos em doentes com DMT2 (Deacon *et al.*, 2000). O GIP activo existe na forma GIP (1-42), que é convertido pela DPP-IV em GIP (3-42), que não tem actividade biológica conhecida. O GIP é rapidamente eliminado pelos rins (Gupta, 2012). O receptor do GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor*, GIP-R) é um membro da classe B da família de receptores acoplados à proteína G e a sua activação está conectada à activação da *adenylyl cyclase* (AC), conduzindo à produção de cAMP e à secreção de insulina a partir das células dos ilhéus pancreáticos. O GIP-R é expresso nos ilhéus pancreáticos, tecido adiposo, coração e cérebro (Holst & Gromada, 2004; Drucker, 2006). As duas isoformas do GIP são amplamente expressas em tecidos extra-pancreáticos, nomeadamente ao nível do tracto gastrointestinal, tecido adiposo, coração, córtex adrenal e também em diversas regiões do SNC (Drucker, 2006).

Por sua vez, o GLP-1 foi a segunda hormona incretina identificada e é responsável por mais de 90% dos efeitos fisiológicos das incretinas. Esta hormona é secretada pelas células L no íleo e no cólon, células α do pâncreas, e por neurónios especializados, em resposta à ingestão de nutrientes (Lenski *et al.*, 2011; Kutoh, 2011). O GLP-1 é uma das hormonas produzidas pela clivagem da proteína precursora *proglucagon* (MacDonald *et al.*, 2002). A partir desta formam-se outros produtos de clivagem, como o GLP-2 e o *glucagon* (Tomas & Habener, 2010). Este último constitui a principal hormona produzida pelas células α pancreáticas durante o jejum. À semelhança do GIP, os níveis plasmáticos do GLP-1 aumentam rapidamente em resposta à ingestão de nutrientes. O GLP-1 desempenha um papel fundamental no metabolismo e

homeostasia da glicose, nomeadamente pela estimulação da biossíntese de insulina, expressão do gene da insulina (Wang & Cahill, 1999), redução do esvaziamento gástrico (o que torna a absorção de alimentos mais lenta e retarda o aumento dos níveis de glicose no sangue) e aumento da saciedade a curto prazo (Meier *et al.*, 2003; Badyal & Kaur, 2008), com concomitante perda de peso a longo prazo (Davis *et al.*, 1998). Um dos principais efeitos do GLP-1 consiste ainda na inibição da secreção de elevados níveis *glucagon* pelas células α do pâncreas (Komatsu *et al.*, 1989), o que reduz a produção de glicose (via neoglicogénese hepática), normalizando a glicémia pós-prandial (Triplitt *et al.*, 2006). O GLP-1 promove ainda a captação de glicose pelo miocárdio (Chyan & Chuang, 2007; Read *et al.*, 2010). Também foi já demonstrado que o GLP-1 preserva ou aumenta a função das células β funcionais como resultado da proliferação de células β e inibição da apoptose (Farilla *et al.*, 2002). Embora a função fisiológica principal do GLP-1 pareça estar relacionada com o controlo glicémico, evidências sugerem que este também pode ter outros efeitos benéficos que são independentes dos seus efeitos sobre o metabolismo da glicose, nomeadamente desempenhando um papel importante no sistema cardiovascular, um tema que será abordado mais à frente neste trabalho.

São secretadas *in vivo* múltiplas isoformas do GLP-1: GLP-1 (1-37) e GLP-1 (1-36) NH₂, ambas inactivas, e GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36) NH₂, que são biologicamente activas. A maioria do GLP-1 activo é produzida a partir do GLP-1 (1-37). As duas isoformas GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36) são equivalentes, uma vez que diferem apenas num aminoácido, e apresentam tempos de semi-vida e actividade biológica idênticos através do mesmo receptor (Ban *et al.*, 2009). O GLP-1 (7-36), geralmente referido apenas como GLP-1, constitui mais de 80% de GLP-1 activo circulante (Drucker, 2006; Gupta, 2012; Ban *et al.*, 2008). Foi já demonstrado, em estudos pré-clínicos e em humanos, que o GLP-1 (7-36) é capaz de estimular a secreção de insulina de forma dependente de glicose. O GLP-1 pode ser eliminado da circulação por três mecanismos distintos: depuração renal, hepática ou ainda degradação na circulação. O tempo de circulação do GLP-1 *in vivo* é relativamente curto, aproximadamente 1 a 2 minutos após a sua secreção (Mentlein, 1999). Isto ocorre porque ambas as formas activas de GLP-1, assim como o GIP, contém alanina na posição 2, sendo rapidamente degradadas pela enzima DPP-IV, originando GLP-1 (9-37) e GLP-1 (9-36) NH₂ (Drucker, 2006; Chyan & Chuang, 2007), o que limita o seu potencial terapêutico. Estas últimas constituem as formas circulantes maioritárias de GLP-1 (cerca de 80-90 % do GLP-1 total circulante), com um tempo de vida de aproximadamente 8 a 10 minutos (Tomas & Habener, 2010). A actividade do metabolito resultante, GLP-1 (9-36), é controversa. O GLP-1 (9-36) apresenta uma afinidade mil vezes inferior para o receptor de GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1 receptor*, GLP-1R) e é caracterizado por uma completa ausência de actividade insulínica nos

seres humanos, sendo o seu potencial de redução da glicémia pequeno quando comparado com o GLP-1 (7-36) (Read *et al.*, 2010). Inicialmente acreditava-se que o GLP-1 (9-36) era biologicamente inactivo ou que actuava como um agonista inactivo ou fraco do GLP-1R, porém ao longo do tempo este tem sido alvo de diversos estudos que iremos abordar mais à frente e que demonstram que este metabolito possui afinal importantes efeitos biológicos (Duda *et al.*, 2004; Drucker, 2006; Ban *et al.*, 2009).

Em humanos, a administração de GIP em indivíduos saudáveis estimula o aumento da libertação de insulina, porém, este efeito insulínico aparece gravemente diminuído em indivíduos diabéticos. Em contraste, a administração intravenosa de GLP-1 exerce um efeito insulínico forte na libertação de insulina em doentes diabéticos tipo 2. Contudo, nestes doentes, ocorre uma redução da secreção de GLP-1 endógeno em resposta à glicose, apesar da sua acção ser preservada (Chyan & Chuang, 2007).

1.12.4. Degradação das Incretinas: Papel da enzima DPP-IV

Como já foi dito, a actividade do GLP-1 e do GIP endógenos é limitada pela enzima DPP-IV, que hidrolisa rapidamente estas hormonas incretinas para produzir os seus metabolitos (Bhansali *et al.*, 2010), como se pode ver na figura 9. A DPP-IV é uma glicoproteína transmembranar existente na circulação e na superfície de diversos tecidos e células, nomeadamente nas células endoteliais, epiteliais, linfócitos e sistema cardiovascular (Drucker, 2006). Esta enzima é ainda expressa nos rins, tracto gastrointestinal e biliar, fígado, placenta, útero, próstata e pele (Gallwitz, 2007; Ban *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2011).

A sequência desta enzima é composta por 766 aminoácidos que se organizam em duas subunidades, cada uma com um local activo. A dimerização proteica é essencial para a sua actividade catalítica e a glicosilação tem impacto nas suas funções fisiológicas (Jose & Inzucchi, 2012). É uma exopetidase serínica que cliva preferencialmente peptídeos com os aminoácidos alanina ou prolina na posição 2 do N-terminal da cadeia peptídica, como o GLP-1 e GIP, modificando ou inibindo a sua actividade (Chyan & Chuang, 2007; Thornberry & Gallwitz, 2009; Ussher & Drucker, 2012), uma vez que este terminal é necessário para a sua ligação ao receptor. A enzima regula diversos processos fisiológicos por clivagem de uma vasta gama de substratos, entre os quais factores de crescimento, neuropeptídeos, quimiocinas (SDF-1 α/β), hormonas peptídicas e substância P, não sendo apenas específica para as incretinas mencionadas (Jose & Inzucchi, 2012).

A DPP-IV existe em duas formas moleculares: uma forma ancorada à membrana, onde é conhecida por antigénio CD26 da superfície celular (*cluster of differentiation 26*, CD26) e uma

forma solúvel circulante (DPP-IV). Ambas estão envolvidas no metabolismo das hormonas incretinas e activação e proliferação dos linfócitos T (Varga *et al.*, 2011; Suen & Burn, 2012). A enzima pode ser quantificada através da sua actividade enzimática no plasma (Thornberry & Gallwitz, 2009).

A actividade da DPP-IV na degradação das hormonas incretinas faz com que esta desempenhe um papel fundamental no metabolismo de hidratos de carbono e, portanto, no controlo da homeostasia da glicose. Porém, esta enzima possui muitas outras actividades biológicas, tais como: regulação imune (co-estimulação das células T pela CD26 ligada à membrana), migração celular, inflamação e metastização de tumores. A DPP-IV é expressa em baixos níveis nas células T em repouso, mas há um aumento da sua expressão em situações de activação destas células (Varga *et al.*, 2011). A actividade enzimática e níveis séricos da enzima DPP-IV/CD26 estão aumentados em situações de hiperglicémia em doentes diabéticos tipo 2 (Pala *et al.*, 2005). Também a expressão desta enzima nas células T CD4⁺ e CD8⁺ está aumentada nestes indivíduos (Lee *et al.*, 2013). Assim sendo, a inibição ou inactivação desta enzima é actualmente usada no tratamento clínico da DMT2, em consequência do aumento do tempo de semi-vida e biodisponibilidade das formas intactas das incretinas GLP-1 e GIP, potenciando assim o seu efeito biológico no controlo da homeostasia da glicose.

Modelos animais deficientes no gene que codifica a enzima DPP-IV/CD26 revelaram ser resistentes à diabetes induzida por STZ e apresentavam elevados níveis circulantes de GLP-1 e outras hormonas incretinas (Gallwitz, 2007), demonstrando ainda uma melhoria na tolerância à glicose (Conarello *et al.*, 2003). Ao mesmo tempo, estudos em ratinhos *knockout* para o gene da enzima DPP-IV exibiram também uma melhor tolerância à glicose, aumento dos níveis de GLP-1, GIP e insulina, aumento da sensibilidade à insulina e uma maior resistência à indução de obesidade (Drucker, 2006). Simultaneamente, a inibição química desta enzima impediu a inactivação de GLP-1 e GIP e reduziu os níveis de glicose em estudos pré-clínicos e clínicos. A inibição da actividade da DPP-IV em estudos de 4 a 52 semanas foi capaz de reduzir os níveis de HbA1c, ao mesmo tempo que preveniu o aumento de peso, potenciou a função das células β e suprimiu a libertação de *glucagon* em doentes humanos com DMT2 (Drucker, 2006). Dado ainda a diversidade de substratos da DPP-IV, a sua inibição traduz-se numa multiplicidade de efeitos biológicos. Deste modo, a inibição da DPP-IV tem uma vasta gama de possíveis efeitos pleiotrópicos, muito além da modulação do GLP-1, que podem ou não exercer efeitos positivos adicionais no tratamento da diabetes.

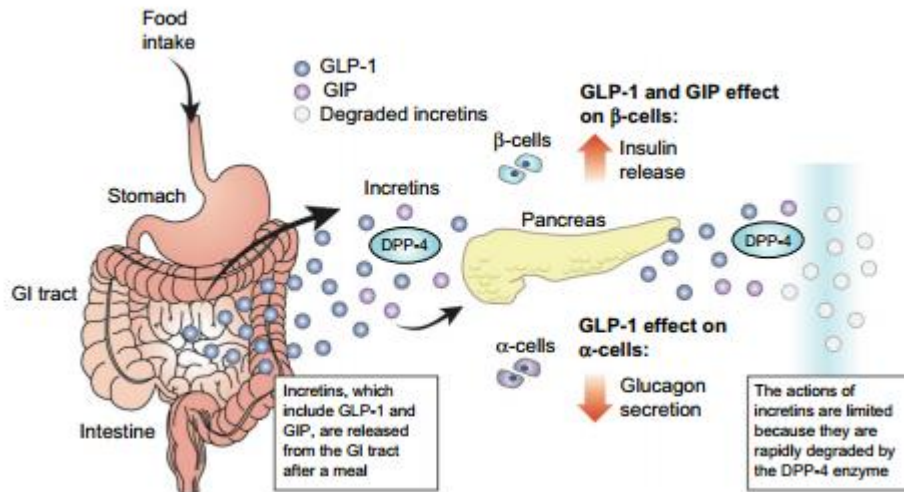


Figura 9 – Degradação das incretinas pela DPP-IV. (Retirado de Edelman, 2010)

1.13. Receptor do GLP-1

O GLP-1R é um membro da família B dos receptores de *glucagon* acoplados à proteína G que é constituído por 463 aminoácidos, incluindo um grande domínio extracelular e sete domínios transmembranares (Baggio & Drucker, 2007; Suen & Burn, 2012). É amplamente expresso em diversos tecidos, nomeadamente nos ilhéus pancreáticos, rins, pulmões, células do músculo liso, tecido neuronal, tracto gastrointestinal, glândulas gástricas, hipotálamo e tronco cerebral (Thorens & Drucker, 2003; Drucker, 2006), tendo sido recentemente identificado em cardiomiócitos, endocárdio, endotélio microvascular e ainda na aorta (Ban *et al.*, 2008). O GLP-1R medeia a maioria das acções do GLP-1 *in vivo*. A presença de GLP-1R em diversos tecidos fornece uma forte evidência de possíveis efeitos fisiológicos do GLP-1 numa grande variedade de funções extra-pancreáticas, nomeadamente a nível cardiovascular (Baggio & Drucker, 2007). Os receptores GLP-1R de roedores e humanos apresentam uma homologia de aproximadamente 90%.

1.14. Mecanismo de acção do GLP-1 e GIP

Após a sua libertação, o GLP-1 e o GIP afectam diversos tecidos, exercendo acções que são mediadas pela ligação aos seus receptores acoplados à proteína G (MacDonald *et al.*, 2002). A capacidade do GLP-1 em aumentar a secreção de insulina de forma glucose-dependente é, actualmente, o efeito fisiológico melhor descrito, dadas as suas possíveis aplicações clínicas. São diversos os trabalhos que revelam que o GLP-1 exerce efeitos biológicos importantes numa

variedade de vias de sinalização pela ligação ao seu receptor (Ban *et al.*, 2008). A activação do GLP-1R estimula a proteína G_{α} , conduzindo à activação de diferentes moléculas e vias de sinalização que estimulam a produção de insulina e a proliferação e sobrevivência das células β (Pettus *et al.*, 2013), como ilustra a figura 10.

Nas células β pancreáticas, o GLP-1 liga-se aos seus receptores de membrana ligados à proteína G_{α} , o que resulta na activação da AC (Suen & Burn, 2012), estimulando a produção de cAMP e o influxo de cálcio (Ban *et al.*, 2009). Estes últimos, por sua vez, activam a proteína cinase A (*Protein kinase A*, PKA), levando à rápida libertação de insulina pelas células e indução da transcrição do gene da insulina (Ban *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, a activação de cAMP nas células β aumenta a sua sensibilidade à insulina (Tomas & Habener, 2010). A insulina aumenta a captação de glicose pelas células musculares esqueléticas, sendo desta forma que o GLP-1 exerce a sua acção antidiabética. Para além disto, o GLP-1 também diminui os níveis de glicose através da inibição da secreção de *glucagon* pelas células α pancreáticas. A inibição da secreção de *glucagon* pode ser directa, através de receptores de GLP-1 expressos nas células, ou indirecta, pela estimulação de secreção de insulina (Drucker, 2006). Estudos revelam ainda que a estimulação da produção de cAMP pelo GLP-1 conduz a um aumento da expressão do factor de transcrição *cAMP response element-binding protein* (CREB) e indução do IRS2. O GLP-1 está envolvido na activação de diversos factores de transcrição, como o PDX-1 (*insulin promoter factor 1*), e na inibição de vias apoptóticas, como a da caspase-3, que no seu conjunto potenciam a proliferação e sobrevivência das células β e a inibição da apoptose (Drucker, 2006; Pratley & Gilbert 2008).

Por outro lado, a ligação ao GLP-1R conduz à regulação e activação da via PI3K e Akt (Ban *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2011) e ainda da via *member of the MAPK signaling cascade* (MEK) /ERK (Tomas & Habener, 2010). GLP-1 também exerce efeitos nos factores de transcrição FoxO1, PDX-1, Foxa2 e outros que têm sido implicados em melhorar a sobrevivência das células β (Buteau, 2006). Os agonistas do GLP-1R estimulam ainda a proliferação de células β , em parte, através de transactivação do receptor de factor de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). No entanto, muitos estudos têm sugerido que o GLP-1 parece também aumentar a utilização de glicose pelos tecidos por mecanismos não-insulino-dependentes (Tomas & Habener, 2010). O seu metabolito, GLP-1 (9-36) reduz a glicémia pós-prandial, porém não influencia as concentrações de insulina nem de peptídeo C, nem altera o esvaziamento gástrico (Meier *et al.*, 2006). A activação do GLP-1R promove, assim, o crescimento e sobrevivência das células β (Suen & Burn, 2012), inibe o esvaziamento gástrico e a secreção de *glucagon*, aumenta a secreção de insulina, tem função cardioprotectora e promove a saciedade (Drucker, 2006).

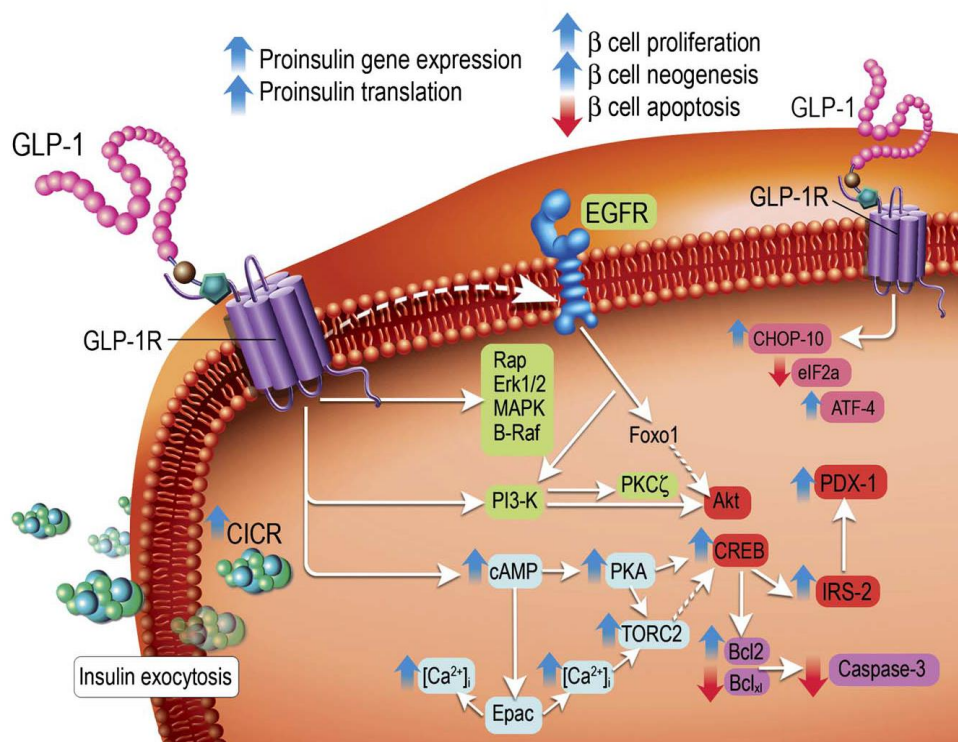


Figura 10 - Ativação do receptor GLP-1R e principais vias de transdução de sinal pelas células β . A activação do GLP-1R conduz à libertação de insulina através da estimulação de vias excitóticas e recruta mecanismos de sinalização que promovem a proliferação e sobrevivência das células. (Retirado de Drucker, 2006)

Como vimos anteriormente, os efeitos fisiológicos do GLP-1 contribuem de forma importante para o controlo da glicémia, tanto no período pós-prandial como durante o jejum, efeitos estes que se encontram diminuídos nos indivíduos diabéticos. A normalização dos níveis plasmáticos de GLP-1 em doentes com DMT2 motivou fortemente a formulação de estratégias para o seu uso terapêutico.

1.15. Diferenciação e regeneração das células β na DMT1

Até ao momento do diagnóstico, cerca de 70-80 % da massa de células β foi perdida ou danificada, em grande parte devido à apoptose das células β (Belle *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2013). Dados recentes sugerem que a função residual das células β na DMT1 persiste durante um longo período de tempo após o diagnóstico, porém com o decorrer do tempo vai havendo uma diminuição progressiva do número e função das células β e, conseqüentemente um agravamento da hiperglicémia (Meier, 2008; Mudaliar & Henry, 2010). O limiar crítico da massa de células β atingido no diagnóstico ainda é suficiente para ser recuperado ou dar origem a novas células (Ding *et al.*, 2013).

A ideia geralmente mais aceite é de que até ao final da gestação a maioria das células β resulta da diferenciação de células-tronco adultas ou células progenitoras, geralmente presentes em ductos pancreáticos e ilhéus de Langerhans e até mesmo na medula óssea ou baço (Paris *et al.*, 2004), e de que após o nascimento, a maioria das células β são formadas pela replicação de células β diferenciadas pré-existentes, e não pela replicação de células progenitoras especializadas (Dor *et al.*, 2004). Em humanos, a massa de células β expande significativamente desde o nascimento até à idade adulta (Ding *et al.*, 2013). No entanto, os processos pelos quais a replicação de células β adultas ocorre estão, actualmente, ainda pouco clarificados, embora haja já um grande número de estudos *in vivo* e *in vitro* que sugerem fortemente a ideia de que o factor sistémico chave no controlo da replicação de células β é a glicose (Ding *et al.*, 2013). Ou seja, estudos em modelos de roedores mostraram um aumento significativo da replicação de células β em virtude de uma situação de hiperglicémia leve e hiperinsulinémia induzida (Alonso *et al.*, 2007). Também a replicação de células β humanas transplantadas foi estimulada por hiperglicémia *in vivo* num modelo de rato com diabetes induzida por STZ e imunodeficiência combinada severa (Levitt *et al.*, 2011). O tratamento de ratos diabéticos STZ com um inibidor da DPP-IV durante 7 semanas provocou um aumento de 2 a 8 vezes na secreção de insulina, no número de ilhéus pancreáticos (35%), e ainda no número total de células β (120%) (Pospisilik *et al.*, 2003). Alguns estudos em ilhéus pancreáticos humanos indiciam ainda que a massa de células β pode aumentar através da replicação destas células em resposta ao aumento da taxa metabólica, como em casos de obesidade (Georgia & Bhushan, 2004; Suen & Burn, 2012). Além da insulina, compostos como os ácidos gordos e as hormonas incretinas também têm sido implicados na replicação de células β (Georgia & Bhushan, 2004).

No passado, pensava-se então que as células β pós-natais seriam células pós-mitóticas, ou seja, sem capacidade regenerativa durante a vida adulta e, portanto, a sua perda seria um processo irreversível (Paris *et al.*, 2004). Contudo, estudos recentes têm contestado esta teoria, indicando que, à semelhança de muitos tecidos, também a massa de células β é regulada de forma dinâmica, possuindo, ao longo da vida, uma significativa capacidade de regeneração espontânea por processos de neogénese e proliferação celular, para repor as células β perdidas ou danificadas (Nir *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2013). Estes avanços oferecem o potencial de atingir a regeneração das células β como um futuro tratamento promissor para a diabetes. Na DMT1, este equilíbrio entre a morte de células β e a sua renovação encontra-se danificado e o *deficit* da massa de células β (aproximadamente 99% em diabéticos tipo 1 de longa data) é em grande parte causado por apoptose mediada por reacções auto-imunes. Digno de nota é ainda o facto de doentes que já possuem DMT1 há bastante tempo, apesar da glucotoxicidade e do ataque auto-imune inflamatório

persistente, ainda apresentarem células β , o que nos permite concluir que a formação de células pode de facto ocorrer durante toda a vida (Meier *et al.*, 2005). Deste modo, o principal objectivo das terapêuticas para a diabetes consiste, para além de assegurar um bom controlo glicémico, em manter a função destas células ou melhor, conseguir parar o seu processo de destruição. Para tal, têm sido realizados estudos na tentativa de estudar os possíveis benefícios das actuais terapêuticas na preservação e regeneração das células β .

1.16. Farmacoterapia baseada nos efeitos das Hormonas Incretinas

O que inviabiliza o uso terapêutico do GLP-1 nativo é o seu tempo de semi-vida no plasma ser extremamente curto, devido à acção da DPP-IV. A administração exógena de GLP-1 a indivíduos diabéticos não é uma terapia viável já que a actividade da DPP-IV se encontra aumentada em doentes diabéticos tipo 2, pelo que a resposta secretora pós-prandial do GLP-1 às refeições se encontra diminuída (Pala *et al.*, 2005), colocando-se a hipótese de que esta contribui para a patogénese da diabetes (Vilsbøll *et al.*, 2001). Para contornar essa situação foram seguidas duas estratégias: o desenvolvimento de incretinomiméticos, que são resistentes à inactivação enzimática e que podem ser de dois tipos, os agonistas do receptor do GLP-1 e os análogos do GLP-1, e a criação de agentes inibidores da actividade da enzima DPP-IV, que prolongam a semi-vida do GLP-1 endógeno activo e os seus níveis circulantes (Triplitt *et al.*, 2006; Lovshin & Drucker, 2009). Em conjunto, as estratégias terapêuticas baseadas em incretinas podem ser bastante promissoras no tratamento da diabetes.

1.16.1. Características dos Miméticos do GLP-1

Os agentes farmacológicos que mimetizam a acção das incretinas são conhecidos como incretinomiméticos. Estes integram uma nova classe de agentes farmacológicos com múltiplas acções antihyperglicémicas e que reproduzem alguns dos efeitos das hormonas incretinas endógenas, nomeadamente o aumento da produção de insulina de forma dependente de glicose. Ou seja, os incretinomiméticos aumentam a secreção de insulina apenas no estado de hyperglicémia (Hinnen & Nielsen, 2006).

Estas substâncias são consideradas uma terapêutica atractiva para a DMT2, uma vez que restauram a regulam as concentrações de glicose por mecanismos que incluem o aumento da secreção de insulina de forma dependente de glicose, inibição da secreção pós-prandial de *glucagon*, redução do esvaziamento gástrico e promoção da saciedade precoce. Para além disto,

também protegem e preservam as células β e, eventualmente, melhoram os factores de risco como o excesso de peso. Os miméticos de GLP-1 actuam no sentido de melhorar o controlo glicémico, verificando-se uma redução moderada nos níveis de glicose durante o período de jejum e uma redução significativa no período pós-prandial (Triplitt *et al.*, 2006). No entanto, as acções destas substâncias podem não ser mediadas exclusivamente pelo GLP-1R pancreático (Hinnen & Nielsen, 2006), daí a distinção entre os análogos do GLP-1 e os agonistas do GLP-1R.

Os análogos do GLP-1 são substâncias que têm estrutura similar à do GLP-1, porém apresentam propriedades químicas e biológicas distintas como, por exemplo, a liraglutida. Por sua vez, os agonistas do GLP-1R são substâncias que se ligam ao GLP-1R, activando-o e promovendo assim, uma resposta farmacológica como é o caso da exenatida (Jose & Inzucchi, 2012). Ambos podem ser usados em combinação com metformina, sulfonilureias e tiazolidinedionas. A sua administração é feita apenas por via subcutânea, uma vez que são peptídeos e como tal seriam destruídos pelo ácido gástrico, o que torna os inibidores da DPP-IV mais vantajosos, dado o facto de serem administrados oralmente.

No entanto, em comparação com os inibidores da DPP-IV, os agonistas do GLP-1R induzem uma actividade farmacológica do GLP-1 mais elevada. A segurança e eficácia dos agentes terapêuticos baseados nas incretinas, em doentes com DMT2 foram já demonstradas em diversos ensaios clínicos (Bosi, 2010).

1.16.2. Inibidores da DPP-IV

Actualmente existem diversos inibidores da DPP-IV para o tratamento da DMT2 (sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina e alogliptina), que estão já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e outros estão ainda em desenvolvimento. Apesar de apresentarem estruturas químicas distintas, todos eles inibem a enzima DPP-IV e evitam o catabolismo do GLP-1 e GIP, aumentando os seus níveis endógenos e potenciando, assim, a secreção de insulina e redução da secreção de *glucagon* (Gallwitz, 2007; Chyan & Chuang, 2007; Badyal & Kaur, 2008), como demonstra a figura 11. A administração de uma única dose diária destes fármacos pode originar 70-90 % de inibição da actividade da DPP-IV no plasma ao longo de um período de 24 h. São activos oralmente e rapidamente absorvidos. A sua concentração máxima é observada entre 1 a 2 horas e a sua biodisponibilidade é superior a 80% após ingestão oral. Aumentam os níveis de GLP-1 e diminuem os níveis de glicémia em jejum e no estado pós-prandial, melhoram a função das células α e β pancreáticas na DMT2 e aumentam o número de células β e a sensibilidade à insulina (Nyström *et al.*, 2004). Reduzem os níveis de HbA1c em aproximadamente 0,5% a 1% e

promovem a diminuição dos níveis de colesterol total e *low-density lipoprotein* (LDL) e dos triglicéridos (Ussher & Drucker, 2012), aumentando ainda os níveis de colesterol *high-density lipoprotein* (HDL), isto é, melhoram o perfil lipídico normalmente alterado em doentes diabéticos. Em contraste com os análogos de GLP-1, os inibidores de DPP-IV não têm efeitos sobre o esvaziamento gástrico e peso corporal (Kutoh, 2011; Jose & Inzucchi, 2012). Com a utilização dos inibidores da DPP-IV, os níveis de GLP-1 activo aumentam cerca de 2 a 3 vezes (Thornberry & Gallwitz, 2009). Este aumento representa uma actividade biológica menor do que a obtida com o uso dos análogos de GLP-1 ou dos agonistas do GLP-1R, situação na qual o aumento é de cerca de cinco vezes os níveis basais. À semelhança da exenatida, os inibidores da DPP-IV também apresentam um perfil de segurança cardiovascular favorável. Existem ainda outras enzimas com actividade de DPP-IV, como a DPP-VIII e DPP-IX, porém, os inibidores da DPP-IV são produzidos de forma a serem altamente selectivos para esta enzima, pelo que não inibem as suas formas relacionadas (Jose & Inzucchi, 2012). O risco de causar hipoglicémia é muito reduzido e os efeitos secundários observados baseiam-se, principalmente, em cefaleias, nasofaringites e infecções do tracto respiratório. Os inibidores da DPP-IV podem ser administrados como monoterapia ou em combinação com outros ADO's, o que resulta numa melhoria do controlo glicémico (Deacon & Holst, 2006).

Em Outubro de 2006, a sitagliptina (Januvia®, Merck and Co, Inc.) foi o primeiro fármaco antidiabético da classe dos inibidores da DPP-IV a ser aprovado pela FDA para o tratamento da DMT2, dado o facto de ser eficaz, bem-tolerada e segura tanto em monoterapia, como em combinação com insulina ou outros fármacos, como a metformina ou tiazolidinedionas, para potenciar o controlo glicémico nesses doentes quando a dieta e o exercício físico não são suficientes (Badyal & Kaur, 2008; Richard *et al.*, 2011). Mais tarde, em Março de 2007, foi aprovado na União Europeia. A sitagliptina está actualmente aprovada em 42 países. Mais tarde, em Julho de 2009, a saxagliptina foi também aprovada pela FDA. Actualmente, a vildagliptina está aprovada na Europa, decorrendo ainda o processo de avaliação nos Estados Unidos. Em Janeiro de 2013, a alogliptina foi aprovada para o tratamento da DMT2.

Genericamente, os inibidores de DPP- IV são considerados fármacos seguros, contudo, já foram descritos vários efeitos secundários raros, entre os quais lesão hepática aguda, hemólise, leucopenia severa, angioedema e artrite reumatóide, pelo que na prescrição destes fármacos a doentes com risco elevado de desenvolvimento destas doenças devem ser tomados certos cuidados (Zhao *et al.*, 2014).

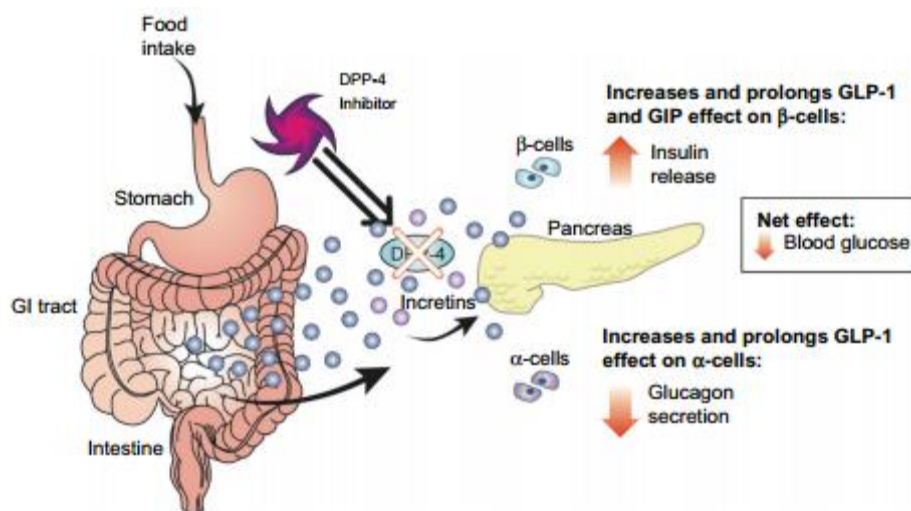


Figura 11 – Mecanismo de acção dos inibidores da DPP-IV. (Retirado de Edelman, 2010)

1.17. Sitagliptina

A sitagliptina, cuja estrutura química está representada na figura 12, é um inibidor potente e selectivo da enzima DPP-IV, prevenindo a hidrólise das hormonas incretinas (Ban *et al.*, 2009). É um fármaco modulador do metabolismo do GLP-1 e GIP, actuando, deste modo, como agente hipoglicemiante. A inibição competitiva da DPP-IV pela sitagliptina vai aumentar a biodisponibilidade e tempo de semi-vida das formas activas de GLP-1 e de GIP, prolongando o seu efeito fisiológico. Assim, é estimulada a libertação de insulina e a diminuição dos níveis de *glucagon*, o que permite regular os níveis de glicose plasmática, potenciando o controlo glicémico. Isto é, o aumento da concentração de GLP-1 activo vai diminuir ou até normalizar os níveis de glicose plasmáticos em doentes diabéticos. Nos diversos estudos realizados até à data, a sitagliptina demonstrou ser eficaz na redução dos níveis de HbA1c (Gallwitz, 2007) e da glicose plasmática em jejum e no estado pós-prandial (Ellis *et al.*, 2011), para além de melhorar a função das células β (Gallwitz, 2007).

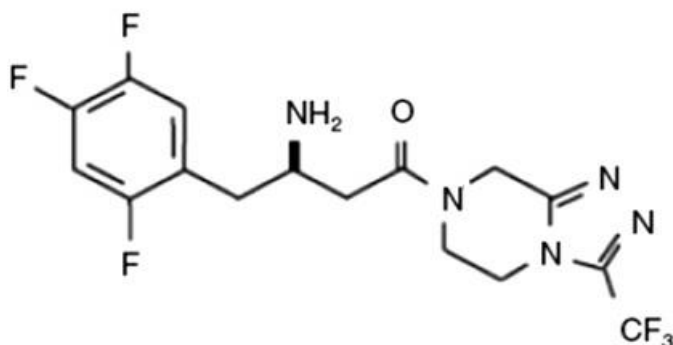


Figura 12 – Estrutura química da sitagliptina. A sitagliptina é uma molécula de baixo peso molecular (523,32Da), e corresponde quimicamente a 7-[(3*R*)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butyl]-5,6,7,8-tetrahydro-3-(trifluormethyl)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyrazine phosphate (1:1)monohydrate. (Adaptado de Thornberry & Gallwitz, 2009)

A biodisponibilidade da sitagliptina é de aproximadamente 87% e o seu tempo de semi-vida varia entre 8 e 14 horas. Cerca de 38% está ligada às proteínas do plasma. A sua eliminação ocorre principalmente pelos rins na sua forma inalterada (Badyal & Kaur, 2008). Em ensaios clínicos, a sitagliptina demonstrou uma incidência global de efeitos colaterais comparáveis ao placebo. Os efeitos secundários detectados mais comuns foram infecção do trato respiratório superior, dor de garganta, dor de cabeça e diarreia. Ao contrário dos agonistas do GLP-1R, a sitagliptina não causa alterações no peso corporal e não aumenta a incidência de episódios hipoglicémicos (Badyal & Kaur, 2008). Actualmente, a sitagliptina está prescrita para o tratamento da DMT2 (Gallwitz, 2007). A dose diária recomendada de sitagliptina é de 100 mg. Porém, é necessário reajustar a dose em doentes com função renal moderada ou gravemente comprometida. A sitagliptina também está contra-indicada na cetoacidose diabética (Badyal & Kaur, 2008). O mecanismo de acção deste fármaco está ilustrado na figura 13.

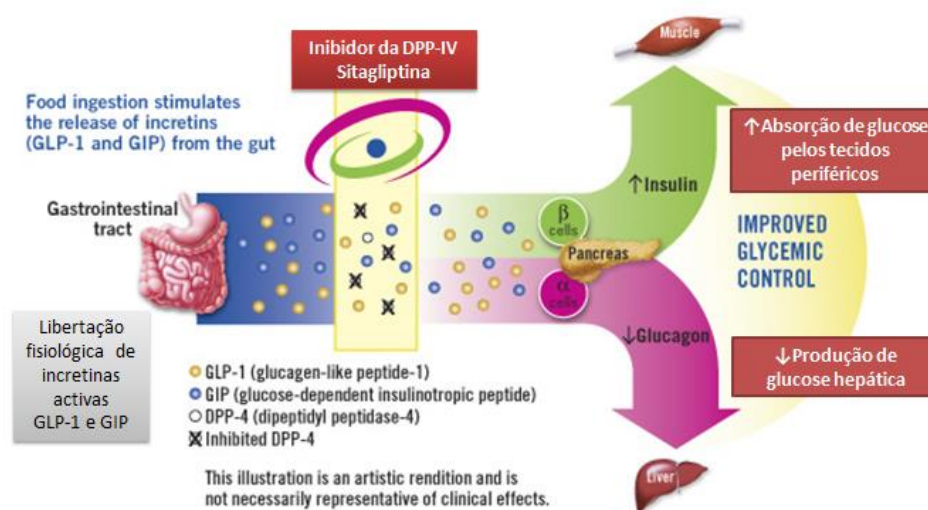


Figura 13 – Mecanismo de acção da sitagliptina. (Adaptado de *Januvia*, Merck)

1.18. Acções cardiovasculares e vasoactivas do GLP-1

A principal função fisiológica do GLP-1 está relacionada com o controlo glicémico. O GLP-1 influencia a função cardíaca indirectamente através das suas acções nas células β pancreáticas, aumentando a secreção de insulina dependente de glicose e inibindo a secreção de *glucagon*, melhorando assim o controlo glicémico e prevenindo as complicações cardiovasculares da diabetes. Para além disto, também a perda de peso contribui para reduzir o risco de DCVs nos doentes diabéticos. No entanto, recentemente, um grande número de evidências sugere que o GLP-1 e os seus análogos podem também desempenhar um papel directo importante no sistema cardiovascular (Ban *et al.*, 2009), nomeadamente pelo aumento da função cardíaca e diminuição da disfunção endotelial. Isto porque estes efeitos são detectados em experiências com corações e vasos sanguíneos isolados, estando as concentrações de glicose controladas, sugerindo assim que os agonistas do GLP-1R actuam directamente sobre estes órgãos alvo.

Estudos recentes demonstraram a presença de receptores de alta afinidade para o GLP-1 em humanos e modelos animais, ao nível dos cardiomiócitos, endotélio vascular e células musculares lisas (Ban *et al.*, 2010). A presença destes receptores sugere a possibilidade de alvos terapêuticos potenciais para insuficiência cardíaca e outras DCVs, tanto na presença ou ausência de diabetes pré-existente. Recentemente, têm sido realizados diversos ensaios pré-clínicos para estudar de que forma os agonistas do GLP-1R podem estimular a função cardiovascular. Os efeitos mais evidentes do GLP-1 a nível cardiovascular incluem: modulação da frequência cardíaca, da pressão sanguínea, redução da absorção de triglicéridos, melhoria da contractilidade ventricular esquerda do miocárdio, do tónus vascular (Drucker, 2006), do volume sistólico e do débito cardíaco (Nikolaidis *et al.*, 2004; Ban *et al.*, 2009), indução de vasorrelaxamento, aumento da produção de NO, aumento da captação de glicose pelo miocárdio (Okerson & Chilton, 2012) e redução da dimensão do enfarte (Zhao *et al.*, 2014). Curiosamente, estas melhorias na função cardiovascular mantiveram-se em alguns doentes mesmo meses após a cessação da administração de GLP-1, o que sugere que este peptídeo cardioactivo possa ter efeitos benéficos a longo prazo. Um estudo recente em ratos sugeriu também que a exenatida reduziu a adesão de macrófagos ao endotélio, um processo crucial na iniciação da formação de placas ateroscleróticas (Arakawa *et al.*, 2010).

Num estudo recente, a activação do receptor GLP-1R melhorou a sobrevivência após enfarte do miocárdio em corações de ratos normais e ratos diabéticos, o que sugere que a activação do receptor GLP-1R é acompanhada por efeitos na modulação de mediadores essenciais à sobrevivência dos cardiomiócitos, nomeadamente Akt e o receptor activado pelo proliferador de peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor beta or delta*, PPAR- β/δ). Do mesmo

modo, evidências recentes sugerem efeitos vasculares do GLP-1 independentes do seu receptor e ainda efeitos adicionais mediados por péptidos como GLP-1 (9-36) (Ban *et al.*, 2009). Verificou-se ainda que os efeitos vasodilatadores do GLP-1 (7-36) e do GLP-1 (9-36) podem ser atenuados com uma pré-incubação de vasos sanguíneos isolados com inibidores da NOS (Ban *et al.*, 2008), como o L-NAME, sugerindo que o mecanismo vasodilatador destas incretinas é, pelo menos em parte, dependente da via NO/cGMP.

Deste modo, e de acordo com o que se observa na figura 14, são sugeridas duas vias para as acções cardiovasculares do GLP-1: i) via que depende da acção inotrópica do GLP-1 no seu receptor e das acções directas do GLP-1 no sistema cardiovascular e ii) via dependente do rápido metabolismo do GLP-1 a GLP-1 (9-36), sendo que este último metabolito apresenta efeitos benéficos na melhoria da função cardíaca e vasodilatação, que independentes dos receptores GLP-1R (Ban *et al.*, 2008, 2010). A supressão dos efeitos cardioprotectores e vasodilatadores do GLP-1 pela sitagliptina também sugere que o GLP-1 (9-36) pode funcionar como um intermediário chave para os efeitos cardiovasculares do GLP-1 e que a extensão com que o GLP-1 é metabolizado a GLP-1 (9-36) pode ter implicações funcionais no sistema cardiovascular (Ban *et al.*, 2008).

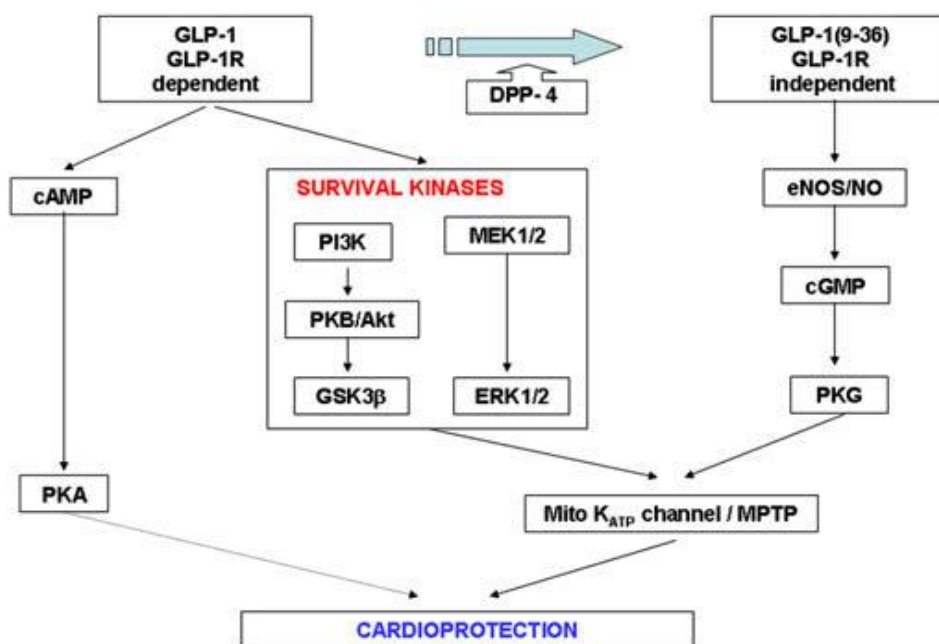


Figura 14 – Mecanismos cardioprotectores do GLP-1. (Adaptado de Ban *et al.*, 2009)

Estudos experimentais em ratos demonstraram que o GLP-1 (7-36) exerce efeitos directos no coração, nomeadamente através do aumento da captação de glicose pelo miocárdio, melhoria da recuperação da função cardíaca após isquémia e ainda redução do enfarte do miocárdio. Isto pode estar, em parte, relacionado com a diminuição das concentrações de piruvato e lactato pelo GLP-1.

Verificou-se também, uma redução da dimensão de enfartes num modelo animal, utilizando um agonista do GLP-1R (exenatida) (Read *et al.*, 2010).

Actualmente existem ainda poucos estudos sobre o efeito do GLP-1 no coração humano. Contudo, a infusão intravenosa de GLP-1 originou uma redução na dimensão do enfarte agudo do miocárdio em doentes submetidos a angioplastia coronária e melhorou ainda a função ventricular esquerda, assim como a qualidade de vida em doentes com insuficiência cardíaca grave, em comparação com os indivíduos controlo (Read *et al.*, 2010; Jose & Inzucchi, 2012). A infusão de GLP-1 em estudos clínicos com doentes diabéticos tipo 2 e doença arterial coronária também demonstrou uma melhoria da função endotelial, pressão arterial e função cardíaca no estado pós-operatório imediato à cirurgia de implantação de bypass (Sokos *et al.*, 2007).

No entanto, outros estudos têm também demonstrado efeitos cardioprotectores pelo uso de agonistas do GLP-1R (exendina-4) em ratos *knockout* para GLP-1R [GLP-1R (-/-)], sugerindo efeitos do GLP-1 independentes do receptor e que podem ser, em parte, mediados pelo metabolito GLP-1 (9-36) (Ban *et al.*, 2009). Independentemente do GLP-1 (9-36) ter uma actividade agonista insulínica residual, ou mesmo nula, estudos recentes demonstram que ele exerce acções cardioprotectoras antioxidantes, reduz o *stress* oxidativo nos tecidos vasculares e suprime a produção de glicose hepática (Tomas & Habener, 2010). Ao contrário do que inicialmente se pensava, o GLP-1 (9-36) é, actualmente, considerado um peptídeo activo com importantes acções biológicas.

1.18.1. Evidência para as acções directas do GLP-1 (9-36) no endotélio vascular

Um dos primeiros estudos que evidenciaram a possível acção do GLP-1 (9-36) no coração foi realizado num modelo canino, por Nikolaidis e seus colaboradores, onde a infusão de GLP-1 (9-36), em cães com insuficiência cardíaca grave induzida e hiperinsulinémia, foi capaz de reverter a insuficiência cardíaca, melhorou a hemodinâmica do ventrículo esquerdo e estimulou a absorção de glicose pelo miocárdio (Nikolaidis *et al.*, 2004). Surpreendentemente, a infusão de GLP-1 (9-36) não teve efeito nos níveis de insulina plasmáticos (Drucker, 2006; Read *et al.*, 2010; Tomas & Habener, 2010). Desde essa altura têm sido realizados bastantes estudos no sentido de esclarecer a validade desta hipótese.

Em ratos com isquémia induzida e reperfusão pós-isquémica também foi possível observar os efeitos cardioprotectores do GLP-1 (9-36). A infusão de GLP-1 (9-36) em corações isolados de rato com lesões isquémicas melhorou a função cardíaca, aumentou a vasodilatação e o fluxo

sanguíneo e reduziu a extensão da lesão do miocárdio (Tomas & Habener, 2010). Estas observações foram ainda acompanhadas pelo aumento de cGMP no miocárdio e aumento da actividade da NOS, com conseqüente libertação de NO, culminando todos estes resultados numa acção antioxidante e redução das ROS (Ban *et al.*, 2008).

Outro estudo recente, realizado por Sonne e seus colaboradores avaliou os efeitos de um agonista do GLP-1 (exendina-4) e do GLP-1 (9-36) em corações isolados de rato com lesões de isquémia e reperfusão, verificando-se que ambos foram eficazes no aumento da função ventricular esquerda, sendo estes efeitos apenas parcialmente inibidos por um antagonista do GLP-1R, exendina (9-39). Contudo, ao contrário da exendina-4, o GLP-1 (9-36) falhou na redução do tamanho do enfarte. A este último nível, os efeitos da exendina-4 foram completamente abolidos pelo exendina (9-39) (Sonne *et al.*, 2008).

Estudos também demonstraram que o pré-tratamento com o GLP-1 (9-36) antes de um episódio de isquémia/reperfusão não exerceu qualquer efeito benéfico sobre a função cardíaca, ao contrário do GLP-1. Em contraste, quando o GLP-1 (9-36) foi infundido durante a fase de reperfusão, ou seja, após a isquémia, ele potenciou drasticamente a recuperação funcional e diminuiu as lesões celulares em corações de ratinhos *wild-type* e *knockout* para GLP-1R (Ban *et al.*, 2009).

A observação de que GLP-1 (9-36), mas não a exendina-4, promove a sobrevivência dos cardiomiócitos em ratos GLP-1R *-/-* e em células endoteliais arteriais humanas suporta a existência de um receptor alternativo para o GLP-1 (9-36), distinto do GLP-1R, tanto em cardiomiócitos, como em células endoteliais (Ban *et al.*, 2010). À semelhança destes dados, verificou-se que *in vitro*, quer o GLP-1 (9-36), quer a exendina-4 aumentaram significativamente os níveis de cAMP e a fosforilação dos alvos da PI3K/Akt, ERK1/2 e CREB em cardiomiócitos mantidos em condições normais de oxigénio (Ban *et al.*, 2010). É importante referir que estas vias de sinalização são essenciais na cardioprotecção contra as lesões causadas pela isquémia e reperfusão. Os efeitos cardioprotectores anteriormente referidos foram atenuados pelos inibidores da PI3K e ERK1/2, o que sugere fortemente que o GLP-1 (9-36) exerce os seus efeitos citoprotectores através das vias de sinalização PI3K/Akt e MAPK/ ERK1/2 (Ban *et al.*, 2010). Ainda neste estudo, os autores identificam uma concentração mínima de 0,3 nM de GLP-1 (9-36) para que sejam detectadas acções citoprotectoras, no entanto a concentração mínima capaz de exercer efeitos cardioprotectores *in vivo* ainda não foi estabelecida.

Simultaneamente, alguns trabalhos também realçam as acções antioxidantes do GLP-1 (9-36) a nível vascular. O uso de sitagliptina para bloquear a conversão do GLP-1 (7-36) em GLP-1 (9-36) diminuiu, mas não aboliu completamente a resposta vasodilatadora do GLP-1, sugerindo

que tanto o GLP-1 como o seu metabolito têm acções vasodilatadoras (Ban *et al.*, 2008). Sabe-se, também, que o GLP-1 aumenta a vasodilatação basal e a induzida por ACh em indivíduos saudáveis, sendo este efeito independente de alterações nas concentrações de glicose e insulina (Scheen, 2012). Para além disto, experiências realizadas por Green e seus colaboradores permitiram demonstrar que os peptídeos GLP-1 (9-36), GLP-1 (7-36), exendina-4 e o GLP-1 (9-39) exercem propriedades vasorrelaxantes na aorta isolada de rato (Green *et al.*, 2008; Tomas & Habener, 2010). Os trabalhos realizados revelaram que os efeitos vasorelaxantes destes peptídeos são, pelo menos em parte, mediados pela estimulação de cAMP e activação específica de canais de potássio sensíveis ao *adenosine triphosphate* (ATP). A pré-incubação da aorta com bloqueadores destes canais reduziu significativamente a resposta vasorrelaxante ao GLP-1, indicando o envolvimento específico destes mesmos canais. Simultaneamente, a utilização de um antagonista de cAMP, que previne a activação da PKA, diminuiu significativamente o relaxamento pelo GLP-1. Para além disto, o relaxamento induzido pela incubação com exendina (9-39) e GLP-1 foi acompanhado por uma significativa elevação da produção vascular de cAMP. Estes resultados comprovam o envolvimento da via da cAMP no relaxamento vascular induzido pelo GLP-1 (Green *et al.*, 2008).

Após tudo isto, diversos estudos evidenciam que as acções do GLP-1 na função vascular são, em parte, independentes do receptor GLP-1R. Muitos dos efeitos benéficos do GLP-1 (9-36) a nível cardiovascular têm sido ao longo dos anos atribuídos ao GLP-1, pelo que a identificação e caracterização de um receptor para o GLP-1 (9-36) e do mecanismo de acção deste metabolito pode contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos cardiovasculares do GLP-1 e dos seus peptídeos relacionados (Ban *et al.*, 2010).

1.19. Efeitos cardiovasculares dos inibidores da DPP-IV

Como já vimos anteriormente, o sistema de incretinas é expresso em grande extensão no sistema cardiovascular, estando descrito que a ligação do GLP-1 ao seu receptor em cardiomiócitos e células endoteliais pode exercer efeitos benéficos, nomeadamente activação de vias que garantem a sobrevivência das células e a preservação da função endotelial (Ban *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2011). As propriedades farmacológicas de GLP-1 tornam-no num potencial agente cardioprotector, uma vez que é um fármaco bem tolerado e com riscos mínimos de hipoglicémia. Os efeitos benéficos têm sido observados em doentes saudáveis e em doentes diabéticos (Read *et al.*, 2010).

A questão inicial implicava que se o GLP-1 era benéfico para o sistema cardiovascular, então a inibição da DPP-IV deveria induzir protecção cardiovascular pelo aumento da biodisponibilidade e acção do GLP-1. Diversos autores colocaram a hipótese de que a inibição da DPP-IV poderia mediar efeitos favoráveis sobre a função endotelial e remodelação cardiovascular em resposta à isquemia e reperfusão. Num estudo em humanos com doença arterial coronária, o aumento da concentração plasmática de GLP-1 (7-36), por inibição da DPP-IV, melhorou a *performance* ventricular esquerda em situações de *stress* e atenuou os eventos pós-isquémicos em comparação com o grupo controlo, sugerindo que o GLP-1 (7-36) tem um efeito directo sobre o coração, sendo este efeito independente do GLP-1 (9-36) (Read *et al.*, 2010).

Actualmente, de acordo com resultados de diversos estudos clínicos e experimentais está comprovado que os efeitos da inibição da DPP-IV são maioritariamente mediados pelo GLP-1 e seus peptídeos relacionados. Os inibidores da DPP-IV exercem, deste modo, efeitos vantajosos cardiovasculares através do controlo da diabetes, uma vez que esta constitui um importante factor de risco para as DCVs (Shah *et al.*, 2011). Tal como já vimos anteriormente, as incretinas GLP-1 e GIP são responsáveis pelo aumento da sensibilidade à insulina no miocárdio, pela captação de glicose pelo miocárdio e prevenção da apoptose de cardiomiócitos. Para além disto, verifica-se que o GLP-1 é também capaz de restaurar a função ventricular esquerda após enfarte do miocárdio (Chrysant & Chrysant, 2012).

Estudos realizados recentemente sugerem que estes fármacos exercem efeitos protectores directos no coração e conseqüentemente nos factores de risco cardiovasculares, independentemente do aumento dos níveis de incretinas (Shah *et al.*, 2011). Um estudo com alogliptina realizado recentemente procurou analisar os efeitos da inibição da DPP-IV na ausência do aumento de GLP-1 e GIP. A exendina (9-39) não comprometeu os efeitos relaxantes do fármaco inibidor da DPP-IV nos anéis de aorta de rato, o que significa que o relaxamento vascular foi independente de GLP-1. Ao mesmo tempo, os efeitos vasorelaxantes da alogliptina foram reduzidos pelo L-NAME e outras substâncias. Os resultados obtidos sugerem que os efeitos da inibição da DPP-IV são principalmente mediados pelo endotélio através de vias mediadas pelo EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*) e NO, que é libertado pelo mecanismo de fosforilação e activação da eNOS através da via PI3K/Akt, como iremos ver de seguida. Estas evidências contrariam os trabalhos de Green e seus colaboradores (Green *et al.*, 2008), que demonstraram que o relaxamento da aorta de rato se devia exclusivamente à activação de canais de potássio sensíveis ao ATP. Em situações de patologia, como hiperglicémia ocorre uma diminuição da fosforilação em resíduos de Tyr do IRS, acompanhada por um aumento da fosforilação em resíduos de serina, o que se traduz na redução da sinalização pela PI3K/Akt (Shah *et al.*, 2011).

Para além dos potenciais benefícios cardíacos possivelmente mediados pelo GLP-1, os inibidores da DPP-IV podem também exercer efeitos directos sobre o coração e nos factores de risco cardiovasculares independentes do sistema de incretinas, estando estes, pelo menos em parte, relacionados com o factor SDF-1 α , uma quimiocina da medula óssea que também exerce funções cardioprotectoras e anti-inflamatórias. Os inibidores da DPP-IV aumentam a estabilidade do SDF-1 α , prolongando o seu tempo de vida e a sua acção fisiológica (Jose & Inzucchi, 2012), potenciando a mobilização de EPCs, fundamentais para a preservação da estrutura e funcionalidade do endotélio intacto. Este mecanismo irá ser abordado posteriormente. O número e função das EPCs circulantes são fortes biomarcadores de risco vascular para uma infinidade de doenças, especialmente as doenças cardiovasculares (Sen *et al.*, 2011).

Em Junho de 2012 realizou-se um estudo para avaliar os efeitos da sitagliptina na sobrevivência e regeneração do miocárdio após enfarte induzido num modelo animal. Este estudo demonstrou que a administração de sitagliptina diminuiu significativamente a actividade da enzima DPP-IV após a aplicação e induziu uma redução significativa do enfarte. A aplicação adicional do AMD3100, um antagonista do receptor do SDF-1 α (CXCR4) reverteu os efeitos benéficos do tratamento, o que comprova a importância do eixo SDF-1 α /CXCR4 na redução do enfarte. Conclui-se, assim, que a administração de sitagliptina tem efeitos benéficos sobre a regeneração cardíaca, para além do seu potencial antidiabético e pensa-se que pode constituir um novo regime terapêutico após enfarte agudo do miocárdio (Krieg *et al.*, 2012).

Relativamente aos efeitos dos inibidores da DPP-IV nos factores de risco cardiovasculares, como a hipertensão e hiperlipidemia, estes ainda são pouco claros, uma vez que ainda não se sabe em concreto se são efeitos directos destes fármacos ou se estão relacionados com o sistema fisiológico das incretinas. No entanto, dada a presença da enzima nas células endoteliais, um estudo recente demonstrou que a inibição da DPP-IV induz relaxamento do tónus vascular directamente através de NO (Jose & Inzucchi, 2012), o que pode resultar num melhor controlo da pressão sanguínea. Em ratos com hipertensão espontânea, o tratamento com 10 mg/kg por dia de sitagliptina durante 2 semanas melhorou o relaxamento endotelial em artérias renais, reduziu a pressão arterial sistólica, restaurou o fluxo sanguíneo renal e melhorou a reactividade vascular da aorta, potenciando a resposta de contracção muscular para diferentes doses de NA (Liu *et al.*, 2012). A administração de sitagliptina em doentes japoneses hipertensos com DMT2 resultou numa redução significativa na pressão arterial em apenas 1 mês de tratamento (Russell-Jones *et al.*, 2012). O efeito da sitagliptina na pressão arterial pode ser explicado por três mecanismos: 1) melhoria na função endotelial causada pela activação sequencial do eixo PKA/ AMPK/ eNOS com concomitante aumento da produção de NO e vasodilatação, efeitos estes que são revertidos com a

utilização de L-NAME; 2) o tratamento com sitagliptina aumentou a expressão GLP-1R que estava reduzida em doentes hiperglicémicos hipertensos; 3) a inibição da DPP-IV pela sitagliptina atenua o aumento da pressão sanguínea em ratos hipertensos pela diminuição da reabsorção de sódio no túbulo contornado proximal, do que se conclui que a produção de NO não é única via pela qual a sitagliptina protege o endotélio vascular (Shehata *et al.*, 2013).

Por outro lado, em humanos, no que respeita aos efeitos no perfil lipídico, não foram observados efeitos significativos na concentração de lípidos circulantes. Porém, em estudos com outro inibidor da DPP-IV, a vildagliptina, em doentes diabéticos tipo 2 observou-se uma melhoria no metabolismo de triglicerídeos e apolipoproteína B48 (Apo B48) (Jose & Inzucchi, 2012).

Para finalizar, os principais efeitos pleiotrópicos destes fármacos sobre o sistema cardiovascular são: acção hipolipidémica, melhoria da disfunção endotelial, redução da pressão arterial e efeitos protectores directos no miocárdio. Porém, é importante realçar que em estudos pré-clínicos utilizam-se doses supra-fisiológicas de GLP-1 para estudar os efeitos vasculares, ao passo que a inibição da DPP-IV vai aumentar os níveis de GLP-1 para valores intermédios, o que pode não ser tão eficaz na protecção cardiovascular. No entanto, apesar dos inibidores da DPP-IV estarem experimentalmente comprovados como eficazes no tratamento da DMT2, os seus efeitos no metabolismo cardíaco ainda não estão completamente esclarecidos, sendo a sua compreensão fundamental no contexto do tratamento de indivíduos em risco de DCVs, como a cardiomiopatia diabética (Lenski *et al.*, 2011).

1.20. Acções do GLP-1 independentes do seu receptor

Existe uma certa controvérsia no que respeita à existência de receptores GLP-1R ao nível dos hepatócitos. Alguns estudos apoiam a existência destes receptores em hepatócitos de rato e humano (Ding *et al.*, 2006), ao passo que outros contrariam esta hipótese. Estudos realizados até ao momento sugerem que as acções do GLP-1 ao nível dos hepatócitos são mediadas por outro receptor também acoplado à proteína G, mas que não é o GLP-1R conhecido. Este possível receptor poderá pertencer à família dos receptores de *glucagon*, ou até mesmo ser o próprio receptor de *glucagon*, uma vez que este é estruturalmente semelhante ao GLP-1R e é largamente expresso nos hepatócitos. Posto isto, de acordo com os estudos realizados, coloca-se a forte hipótese de que a exendina-4 possa activar o receptor de *glucagon* no fígado. Estudos recentes demonstram que a infusão de GLP-1 (9-36) em doentes com resistência à insulina e obesidade reduziu fortemente a neoglicogénese, pouco tempo após a administração (Tomas & Habener, 2010). Assim sendo, é possível que o GLP-1 (9-36) possa actuar como um antagonista ou um

agonista inverso do receptor de *glucagon* no fígado. Esta hipótese poderia, assim, explicar a supressão da produção de glicose hepática em consequência da infusão de GLP-1 (9-36) em doentes humanos. Porém, outros estudos revelam que esta acção do GLP-1 (9-36) em suprimir a neoglucogénese não se verifica em humanos com baixo peso e com uma boa sensibilidade à insulina. Estes resultados sugerem que a activação destes possíveis receptores pode estar dependente do estado metabólico dos hepatócitos, isto é, deverá haver alguma alteração que actue como pré-requisito para a inibição da neoglucogénese pelo GLP-1 (9-36), como acontece nos doentes obesos (Tomas & Habener, 2010).

1.21. Possível mecanismo de acção do GLP-1 no fígado, coração e endotélio vascular

É ainda importante referir que as acções do GLP-1 semelhantes às da insulina, ao nível do coração, fígado e endotélio vascular podem ser mediadas ao nível das funções mitocondriais, nomeadamente a regulação da fosforilação oxidativa, formação de ROS, neoglucogénese e oxidação de ácidos gordos (Tomas & Habener, 2010). Como já vimos, são actualmente colocadas duas hipóteses para as acções do GLP-1. Um mecanismo depende da ligação do GLP-1 (7-36) ao receptor GLP-1R, que conduz à activação da via PI3K/Akt e cAMP/PKA. Tanto a PI3K, como a PKA actuam ao nível da mitocôndria e regulam a apoptose (Horbinski & Chu, 2005), aumentando a sobrevivência das células. Na ausência deste receptor pressupõe-se, como já foi referido, que os agonistas do GLP-1 possam activar um outro receptor presente nos hepatócitos. O segundo mecanismo envolve a ligação do GLP-1 (9-36) a um novo receptor, que hipoteticamente pode ser o CD36/FAT (*Cluster of Differentiation 36/ fatty acid translocase*), um receptor que transporta e se liga a peptídeos e oxida proteínas de baixa densidade no interior das células (Demers *et al.*, 2004). Neste modelo, o GLP-1 (9-36) é transportado para o interior da célula e clivado na região C-terminal por uma endopeptidase intracelular (*neutral endopeptidase*, NEP), obtendo-se os peptídeos GLP-1 (28-36) e GLP-1 (32-36). Ao nível do fígado, o GLP-1 (9-36) e/ ou os seus metabolitos podem inibir a oxidação de ácidos gordos e, deste modo, a neoglucogénese. Este mecanismo poderá oferecer benefícios em doentes obesos e com síndrome metabólica. Por outro lado, ao nível do coração e endotélio vascular, o GLP-1 (9-36) inibe a formação de ROS, actuando como antioxidante e promovendo, deste modo, a sobrevivência e funções do miocárdio e endotélio vascular (Tomas & Habener, 2010).

Todas estas hipóteses colocadas anteriormente evidenciam que o GLP-1 exerce acções favoráveis no coração, endotélio vascular e fígado por mecanismos dependentes e independentes do seu receptor. Apesar destes resultados parecerem promissores, são necessários estudos adicionais com a utilização de técnicas *in vitro* com células cardíacas e vasculares de forma a explorar as vias bioquímicas e celulares pelas quais o GLP-1 (9-36) exerce as suas acções antioxidantes e regula a fosforilação oxidativa.

1.22. Efeito da Sitagliptina nas EPCs

Estudos recentes revelam que a redução de células progenitoras circulantes na diabetes é pelo menos em parte devido a deficiências na medula óssea (Fadini *et al.*, 2010). Em situações de isquémia, o factor SDF-1 α é regulado positivamente e, após ligação ao seu receptor CXCR4, estimula a medula óssea a libertar EPCs que são recrutadas para os locais isquémicos, conduzindo à diminuição das complicações micro e macrovasculares da diabetes. Desta forma, uma vez que o SDF-1 α é um substrato fisiológico da DPP-IV, prevê-se que a inibição desta enzima aumente os níveis circulantes de SDF-1 α aumentando, assim, a mobilização das EPCs (Fadini *et al.*, 2010).

Num estudo recente, a sitagliptina aumentou a concentração de SDF-1 α plasmático e das EPCs circulantes. Alternativamente, a redução da glicose pode por si só melhorar a biodisponibilidade das EPCs (Fadini *et al.*, 2010). Ainda relativamente a este estudo, o aumento das concentrações do GLP-1 pela inibição da DPP-IV pode também ter produzido um efeito sobre EPCs pela activação da eNOS (Ban *et al.*, 2008), que é essencial para a mobilização destas células.

1.23. Relaxamento endotelial do GLP-1 mediado pelo Monóxido de Azoto

O GLP-1 induz relaxamento endotelial de forma dependente da produção de NO, que já vimos tratar-se de um mediador gasoso que transmite os sinais envolvidos no vasorrelaxamento, neurotransmissão, e citotoxicidade, sendo responsável por uma variedade de fenómenos fisiológicos e fisiopatológicos, tais como: regulação do tónus vascular e angiogénese na cicatrização de feridas, regulação da inflamação, de DCVs isquémicas e de doenças malignas.

Esta substância citotóxica derivada do endotélio que possui propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-plaquetárias e antioxidantes representa um marcador crucial na saúde

vascular (Duda *et al.*, 2004; António *et al.*, 2010). O NO também é responsável por iniciar ou mediar muitos processos fisiopatológicos em muitas DCVs.

1.24. Terapêuticas de Incretinas no tratamento da DMT1

A insulina continua a ser a principal ferramenta no controlo da DMT1, uma vez que uma melhoria nos níveis de HbA1c pela sua administração diária reduz significativamente as complicações microvasculares. No entanto, apesar destes avanços nas tecnologias e terapêuticas para a diabetes, a maioria dos doentes diabéticos tipo 1 apresentam níveis glicémicos bastante difíceis de controlar, possuindo por isso ainda um risco significativo para o desenvolvimento destas complicações. Doentes com DMT1 apresentam ainda níveis de secreção pós-prandial de *glucagon* significativamente elevados, o que contribui para um aumento da produção de glicose hepática e, conseqüentemente para o agravamento dos níveis de HbA1c e conseqüentemente, um pior controlo da glicose pós-prandial. Como estes doentes não têm a capacidade de secreção de insulina, o aumento da dosagem de insulina é uma possível solução para este problema. Contudo, isto pode provocar um aumento do risco de ocorrência de episódios de hipoglicémia e aumento de peso, o que constitui uma grande limitação à utilização clínica desta terapia no que respeita à possibilidade do doente atingir níveis euglicémicos (Kutoh, 2011).

Até ao momento não foi aprovado nenhum agente terapêutico com capacidade de prevenir ou retardar a progressão da DMT1, pelo que é fundamental procurar terapêuticas que possam afectar a fisiopatologia subjacente à doença e/ou auxiliar os doentes a melhorar os seus níveis glicémicos. Como já referimos, os compostos que interferem com o eixo das incretinas são conhecidos pelos seus efeitos pleiotrópicos na DMT2. No entanto, a possibilidade da utilização destes compostos é uma abordagem totalmente nova no tratamento da DMT1 que surgiu muito recentemente e por isso, foi ainda pouco explorada (Bosi, 2010; Hari & Shaikh, 2013; Suen & Burn, 2012). Um dos argumentos mais usados contra a utilização destas terapêuticas em doentes diabéticos tipo 1 assenta no facto das incretinas não exercerem qualquer função no mecanismo de destruição auto-imune das células β (Bosi, 2010), para além de não contribuírem para o controlo glicémico em indivíduos que já não são insulino-secretores. Porém, experimentalmente, em modelos animais e *in vitro*, foi já demonstrado que as terapêuticas de incretinas podem preservar e até mesmo regenerar a massa de células β , o que poderá ser a chave para assegurar um controlo glicémico permanente dos doentes com incapacidade total de produção de insulina (Meier, 2008; Mudaliar & Henry, 2010).

Neste momento são vários os estudos clínicos realizados no sentido de avaliar a eficácia dos agonistas do GLP-1 e dos inibidores da DPP-IV em pacientes com DMT1. Estudos *in vitro* e em modelos animais de diabetes não auto-imune têm demonstrado que estes agentes terapêuticos apresentam potencial de preservação da integridade e função das células β pancreáticas e expansão da sua massa, sendo que os mecanismos actualmente propostos incluem: aumento da expressão de factores de transcrição importantes, estimulação da neogénese dos ilhéus e proliferação celular, diferenciação de precursores celulares e redução da taxa apoptótica de células β (Drucker, 2006). O efeito destas terapêuticas foi também estudado num modelo animal de diabetes auto-imune, utilizando a exendina-4 que exerceu efeitos benéficos na massa celular β , tanto na presença (Sherry *et al.*, 2007), como na ausência de anticorpos (Hadjiyanni *et al.*, 2008). A administração de análogos de GLP-1 em ratinhos saudáveis tem demonstrado um aumento da proliferação de células β . Para além disto, agonistas de GLP-1R reduziram também a taxa de apoptose nas células β existentes em animais tratados com STZ (Li *et al.*, 2003). Estudos em humanos comprovaram os dados respeitantes à redução da apoptose com a administração de GLP-1, contudo, parece não haver nenhum efeito sobre a replicação ou neogénese das células β (Farilla *et al.*, 2003). Evidências sugerem que as propriedades regenerativas das células β podem ser específicas da idade e da espécie (Pettus *et al.*, 2013), porém o problema da replicação dos ilhéus pancreáticos continua a ser uma área de inconsistência entre os dados obtidos para roedores e humanos.

Diversos estudos em modelos animais diabéticos não-obesos (NOD) têm demonstrado um efeito benéfico dos agonistas de GLP-1R tanto na prevenção como na reversão da doença. Mais ainda, a infusão contínua de GLP-1 a *non-obese diabetic mice* (NOD) foi capaz de promover neoformação de células β , reduzir a apoptose e retardar o aparecimento da DMT1 (Zhang *et al.*, 2007), sugerindo que a neogénese de células β poderia ser aumentada mesmo em situações de activação imune. Estudos *in vitro* com GLP-1 e GIP induziram uma replicação superior a 50% em culturas primárias de células dos ilhéus de ratos recém-nascidos sob um estímulo de 24h. Esta resposta foi completamente abolida por inibidores da PKA, PI3K ou MEK. *In vitro*, a apoptose das células β também diminuiu com a utilização da exenatida (Friedrichsen *et al.*, 2006). Relativamente aos inibidores da DPP-IV, estes parecem ter a capacidade de reverter a diabetes precoce em ratinhos com imunodeficiência combinada severa através da modulação auto-imune pela CD26 e da potenciação da replicação das células β .

Um aumento das actividades mediadas pela DPP-IV foi também reportado para muitas doenças auto-imunes. Desta forma, coloca-se a hipótese de que os inibidores da DPP-IV, para além de prolongarem as acções do GLP-1, possam possuir propriedades imunitárias reguladoras, que possam retardar/impedir a destruição auto-imune das células β na DMT1. Tal como os

agonistas do GLP-1R, a sitagliptina também demonstrou efeitos protectores em ilhéus pancreáticos após um transplante, efeito este que pode ser atribuído à redução da mobilização de células T CD4⁺ para estes locais (Kim & Egan 2008), sendo este mecanismo responsável por um maior número de infecções do tracto respiratório associadas às gliptinas. Uma outra vantagem poderá ser a protecção das células β da acção de citocinas pró-inflamatórias libertadas localmente durante o processo auto-imune (Blandino-Rosano *et al.*, 2008). Estes e outros estudos colocam a possibilidade de que os inibidores da DPP-IV têm potencial para modular a resposta auto-imune e promover a função das células β na DMT1.

Se a forma como os inibidores da DPP-IV induzem protecção das células β se baseia ou não numa diminuição da destruição auto-imune ainda permanece desconhecida, porém evidências demonstram que estes processos estão ligados à modulação da actividade das células T (Zhao *et al.*, 2014).

Verifica-se que a sinalização por GLP-1R pode regular a proliferação de linfócitos e a manutenção das células T reguladoras periféricas (Hadjiyanni *et al.*, 2010). Um estudo muito recente observou um aumento da actividade da enzima DPP-IV sérica e uma diminuição da expressão da CD26 ligada à membrana de linfócitos em indivíduos diabéticos tipo 1 (Varga *et al.*, 2011). Esta última observação pode ser a base para explicar a disfunção de linfócitos T reguladores nestes doentes e, conseqüentemente fornecer alguma base clínica da possibilidade de utilização da inibição da DPP-IV em pacientes com DMT1. Estas observações fornecem evidências de que o eixo entero-insular está alterado em situações de doença auto-imune.

Existem já diversas evidências que sugerem que as terapêuticas de incretinas podem igualmente exercer efeitos potencialmente benéficos nas células β humanas:

1) A regeneração dos ilhéus pancreáticos humanos persiste ainda durante muito tempo após o aparecimento da DMT1, o que indicia que, mesmo quando a maior parte das células está destruída, o pâncreas humano pode ainda responder a tratamentos capazes de expandir essa massa celular (Meier *et al.*, 2005).

2) Estudos clínicos demonstraram a presença de células β remanescentes funcionais em doentes diabéticos tipo 1, bem como a existência de populações destas células que ainda não estão completamente diferenciadas.

3) O tratamento com exenatida melhorou a função dos ilhéus transplantados em pacientes com DMT1 (Gangemi *et al.*, 2008).

No entanto, até ao passado ano 2011, não existiam publicações que descrevessem a eficácia dos inibidores de DPP-IV em doentes com incapacidade total de secreção endógena de insulina, como ocorre em estados avançados de DMT1/2. Um dos primeiros estudos que avaliou a eficácia

clínica da sitagliptina no controlo glicémico em doentes adultos com DMT1 foi realizado por S. L. Ellis (Ellis *et al.*, 2011). Deste estudo fizeram parte doentes diabéticos tipo 1 diariamente sujeitos a tratamento com insulina e demonstrou que a sitagliptina reduziu significativamente a glicose sanguínea, melhorando claramente o controlo glicémico em jejum e pós-prandial nestes doentes. A sitagliptina foi também eficaz na redução dos valores de HbA1c e reduziu grandemente as necessidades de insulina diárias. Embora este estudo tenha demonstrado uma maior tendência para os doentes permanecerem com baixos níveis de glicose sanguínea, não foram detectados quaisquer eventos de hipoglicémia ou outros eventos adversos graves (Ellis *et al.*, 2011). A limitação deste estudo reside no facto de não terem sido avaliados os níveis de GLP-1, *glucagon* ou peptídeo C, pelo que não se pode concluir de forma exacta quais os mecanismos responsáveis pelos resultados obtidos, e se decorrem de um aumento da capacidade de secreção de insulina por parte do pâncreas deficitário, isto é, se são mecanismo pancreáticos ou extra-pancreáticos.

Outro estudo foi realizado com três doentes nos quais não foram detectados quaisquer níveis de peptídeo C: uma doente do sexo feminino com 91 anos de idade e DMT1; um doente do sexo masculino com 54 anos de idade e DMT2; e um doente com 30 anos de idade que apresentava sintomas característicos de DMT1 e 2. Estes doentes apresentavam um baixo controlo glicémico, apesar de estarem a ser medicados com agentes hipoglicémicos e insulino-terapia. Verificou-se uma melhoria notória do controlo glicémico nestes doentes, cuja capacidade de secreção de insulina e, conseqüentemente, a função residual das células β , estava gravemente diminuída. No entanto, não houve nenhuma melhoria na função residual das células β , já que, após as refeições, os níveis de peptídeo C permaneceram indetectáveis. Se descartarmos a hipótese de que possam ter ocorrido alterações mínimas nos níveis de peptídeo C nestes doentes que não foram detectadas pelo ensaio, o mecanismo pelo qual a sitagliptina provocou uma redução dos níveis de glicose pode ser devido outros factores. Neste estudo, ficou demonstrado que a sitagliptina, em conjunto com a insulina, foi eficaz e segura nos indivíduos com deficiência total de insulina (Kutoh, 2011).

Mais recentemente, outro estudo realizado com doentes com DMT1 ou DMT2 com total deficiência de insulina permitiu analisar a eficácia da sitagliptina em conjunto com a insulina administrada de forma exógena. Verificou-se uma redução eficaz dos níveis de HbA1c, porém, à semelhança do estudo anterior, também neste não foram detectadas quaisquer alterações das concentrações de peptídeo C em nenhum dos doentes. Para explicar esta situação os autores colocaram três hipóteses: a) para além do GLP-1 e do GIP, muitas outras moléculas são substratos da DPP-IV, podendo ter ocorrido alteração das suas funções biológicas, nomeadamente ao nível da homeostasia da glicose; b) supressão dos níveis de *glucagon*, embora esta possibilidade seja pequena, uma vez que a acção da sitagliptina ao nível do glucagon é bastante reduzida e de curta

duração; c) outros mecanismos que incluem vias de transdução de sinal independentes de GLP-1 (Kutoh & Hori, 2013).

Um estudo muito recente (Hari Kumar *et al.*, 2013) avaliou a eficácia da exenatida e da sitagliptina em 18 pacientes jovens e com um diagnóstico recente de DMT1 (aproximadamente $1,1 \pm 0,4$ meses), no período de 1 ano. Os indivíduos foram divididos em três grupos consoante o tipo de tratamento: grupo 1 (insulina), grupo 2 (insulina + exenatida) e grupo 3 (insulina + sitagliptina). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a adição de exenatida ou sitagliptina logo após o diagnóstico da DMT1 reduziu a necessidade de insulina nestes doentes, sem aumentar a produção de insulina nem a ocorrência de eventos hipoglicémicos. Nenhum dos compostos alterou o risco de hipoglicémia (que foi semelhante nos três grupos em estudo), nem afectou a preservação da secreção de insulina endógena. Assim sendo, qualquer fármaco que aumente a resposta das incretinas pode auxiliar no controlo da doença, o que fortalece a hipótese do uso de moduladores de incretinas em pacientes com DMT1, independentemente do potencial efeito regenerador na massa de células β . Este estudo mostrou uma pequena, mas significativa perda de peso com exenatida, em comparação com a sitagliptina. Verificou-se ainda, que ao fim de um ano, os indivíduos dos grupos 2 e 3 foram os que apresentaram um maior decréscimo significativo da necessidade de insulina. Os efeitos benéficos da exenatida foram superiores aos da sitagliptina, podendo isto dever-se a vários factores, como: diferenças clínicas no início do estudo, menor aumento de peso durante o estudo, maior efeito do GLP-1 e menor resistência à insulina. Por outro lado, a sitagliptina requer níveis adequados de GLP-1 nativo para exercer a sua acção e, estudos anteriores demonstraram que a acção do GLP-1 está diminuída em doentes com DMT1 (Dupré *et al.*, 2004). Embora os resultados deste estudo sejam promissores e concordantes com a hipótese colocada, o reduzido tamanho da amostra e a curta duração do período de observação constituem limitações para possíveis conclusões.

Posto isto, tendo como objectivo principal a protecção e preservação das células β , os agonistas do GLP-1R e os inibidores da DPP-IV podem, por si só, representar uma nova e revolucionária abordagem no tratamento da DMT1, ou até mesmo completar acção das já actuais terapêuticas de inibição dos processos auto-imunes (Bosi, 2010; Ding *et al.*, 2013), à semelhança do que acontece para a DMT2. Embora pertençam à mesma classe de fármacos, estudos revelam que os análogos do GLP-1/agonistas do GLP-1R e os inibidores da DPP-IV podem exercer efeitos diferentes sobre as células β . O mecanismo de acção dos inibidores da DPP-IV baseia-se, essencialmente, em estabilizar o GLP-1 endógeno através da inibição da enzima que o degrada, promovendo assim a proliferação celular.

Pressupõe-se que as terapêuticas de incretinas poderão ser mais benéficas nas fases iniciais da diabetes, quando o doente ainda preserva um nível razoável de células β capazes de responder ao estímulo do GLP-1 e, assim, estimular a secreção de insulina (Bosi, 2010). Deste modo, é expectável que esta terapêutica não seja tão eficaz em indivíduos nos quais não existe nenhuma função residual das células β , isto é, quando estas estão completamente danificadas ou destruídas e, por conseguinte, houve perda dos receptores de GLP-1R (Kutoh & Hori, 2013). Em virtude da sua capacidade de redução dos níveis de *glucagon*, coloca-se ainda a hipótese de que os inibidores da DPP-IV possam ser utilizados em fases mais avançadas da doença, em associação com outros antidiabéticos orais ou insulina. Nos casos mais graves, isto é, quando a maioria ou até mesmo a totalidade das células β estão danificadas ou perdidas, podem ter de ser aplicados tratamentos mais drásticos e invasivos, nomeadamente o transplante pancreático ou dos ilhéus pancreáticos ou a trans-diferenciação de células β provenientes de outras fontes, com concomitante administração de imunossuppressores de forma a evitar a rejeição dos órgãos e também impedir a destruição auto-imune dos ilhéus transplantados/regenerados (Shapiro *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2013). No entanto, estes procedimentos são associados a morbilidade cirúrgica e ainda aos efeitos adversos da imunossupressão crónica (Meier, 2008), ao mesmo tempo que há uma quantidade insuficiente de pâncreas disponíveis face ao aumento do número de pessoas com diabetes. Assim sendo, é cada vez mais crucial a procura de abordagens alternativas capazes de restaurar massa de células β funcionais em doentes diabéticos.

Tendo em conta as evidências anteriores, como perspectiva futura, o objectivo primordial das possíveis abordagens terapêuticas para a cura da DMT1 consistirá em restabelecer a tolerância imunológica conjuntamente com a reposição ou estimulação da regeneração da massa de células β funcionais nestes doentes a fim de normalizar a homeostasia da glicose, garantindo a ausência de efeitos adversos do tratamento (Suen & Burn, 2012; Ding *et al.*, 2013). A combinação de factores de crescimento de células β , como a exendina-4, com protocolos de imunoterapia representa uma potencial abordagem para o tratamento de doentes com DMT1.

Para finalizar, perante tudo isto coloca-se a hipótese de que os efeitos deste fármaco possam estar também relacionados com mecanismos independentes da via que envolve o GLP-1, nomeadamente vias de transdução de sinal extra-pancreáticas (Kutoh, 2011). A sitagliptina pode exercer um papel na regulação do *output* de glicose hepática, glicogénese, neoglicogénese, glicólise ou no *uptake* periférico de glicose (músculo esquelético ou tecido adiposo) diferente da acção de insulina ou *glucagon*.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2. Objectivos

O objectivo principal da minha tese consistirá em avaliar se um inibidor da DPP-IV, a sitagliptina, também pode ser benéfico no tratamento de doentes com DMT1, e quais as suas possíveis acções no sistema cardiovascular destes doentes. Para tal, são estabelecidos os seguintes objectivos:

- Avaliar o efeito da sitagliptina na reversão/atenuação da disfunção endotelial, por um mecanismo independente do aumento de secreção de insulina, num modelo animal de DMT1, isto é, diabetes induzida por STZ em ratos *Wistar*;
- Caracterizar farmacologicamente a resposta vasorrelaxante da aorta isolada de rato à ACh, através de estudos funcionais de relaxamento do músculo liso vascular, comparando a resposta vasorrelaxante de anéis de aorta de ratos controlo com aquela de ratos diabéticos tipo 1, ambos tratados e não tratados com sitagliptina;
- Comprovar o relaxamento NO-dependente induzido pela ACh na aorta dos 4 grupos de animais em estudo;
- Através da técnica de *Western blotting*, observar a expressão do receptor do GLP-1 e das formas totais e fosforiladas das enzimas eNOS e Akt, de forma a avaliar o estado da via de sinalização Akt/eNOS, na presença e na ausência de tratamento com sitagliptina, em ratos controlo e ratos diabéticos tipo 1;
- Recorrendo a marcadores de *stress* oxidativo, avaliar a presença de aniões superóxido nos anéis de aorta dos 4 grupos de animais;
- Complementar os estudos funcionais através de estudos histoquímicos de modo a caracterizar a micro-anatomia dos anéis de aorta dos 4 grupos de animais.

CAPÍTULO 3

Material e Métodos

3. Material e Métodos

Todos procedimentos que envolveram animais foram realizados de acordo com a Declaração ARVO para a utilização de animais em estudos oftálmicos e da visão, e aprovados pelo Comité da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para o tratamento e utilização dos animais (Aprovação ID de Ética Institucional: 015-CE-2011).

3.1. Caracterização do Modelo Animal de diabetes tipo 1: indução da diabetes por STZ

Neste trabalho, o modelo animal utilizado foi o rato *Wistar* macho com cerca de 8 semanas (200-300g), fornecido pela *Charles River Laboratories* (Barcelona, Espanha). Antes do início dos procedimentos experimentais, os ratos foram mantidos no biotério, ventilados sob condições controladas de temperatura (22°C) e humidade relativa (60%) e ciclos de luz/obscuridade de 12 horas. Durante este período, os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e a uma dieta *standard* para roedores (SAFE A04, Augy, France).

A diabetes foi induzida através de uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) (65 mg/kg em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5). Simultaneamente, ratos controlo da mesma idade receberam apenas tampão citrato. Após aproximadamente 48h deste procedimento, os animais com níveis de glicose superiores a 13,9 mmol/L foram considerados diabéticos. Após 2 semanas da indução da diabetes, os animais foram tratados oralmente com veículo (sumo de laranja) ou sitagliptina (Januvia[®], MSD, Portugal) 5 mg/kg/dia durante 2 semanas, sendo então divididos em quatro grupos: (1) controlos tratados com veículo, (2) diabéticos tratados com veículo, (3) controlos tratados com sitagliptina e (4) diabéticos tratados com sitagliptina. Digno de nota é o facto da última dose de sitagliptina ter sido administrada aos animais duas horas antes do seu sacrifício. Para os estudos funcionais foram utilizados dos 6 a 8 animais disponíveis por grupo, 3 animais de cada um dos quatro grupos experimentais.

3.2. Isolamento e Preparação do órgão

No final do tratamento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 2mg/kg de uma solução 2:1 (v/v) de 50mg/mL de cloridrato de cetamina (Ketalar[®]) em clorpromazina 2,5% (Largactil[®]). Recolheu-se o sangue da veia jugular, com agulhas previamente heparinizadas (B Braun Melsungen AG, Alemanha), para a quantificação da glicose, insulina e níveis HbA1c (Sena *et al.*, 2011). Posteriormente, os ratos foram sacrificados por decapitação e procedeu-se à excisão da aorta que foi utilizada para estudos de função vascular, avaliação dos marcadores de *stress* oxidativo e *Western blotting*.



Figura 15 – Aorta de rato *Wistar*.

Deste modo, procedeu-se ao isolamento da aorta com eliminação do tecido conjuntivo adjacente (Figura 15), que foi imediatamente colocada numa solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* fria e arejada com carbogénio (95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono), com a seguinte composição (em mmoles/L): NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO₄.7H₂O 0,57; CaCl₂ 1,90; KH₂PO₄.2H₂O 0,90; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,1; pH 7,4. Seguidamente, a aorta foi dividida em anéis com 3-4 mm de comprimento que foram suspensos entre duas ansas de fio de platina, sob uma tensão óptima basal de 19,6 mN (1 g de massa sob condições gravitacionais normais exerce uma força de 9,8 mN), e colocados em banhos de órgãos de 15 mL com a solução fisiológica *Krebs-Henseleit* anteriormente preparada que foi mantida a 37°C (termóstato GFL) (Figura 16).



Figura 16 - Banho de órgãos com solução fisiológica *Krebs-Henseleit* a 37°C.

A tensão basal em cada experiência foi a que ocorreu espontaneamente no tecido submetido à tensão óptima (2g, o correspondente a 19,6 mN), após o período de equilíbrio que se segue à montagem do órgão, de acordo com a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2007). Durante este período, a solução de *Krebs-Henseleit* no banho foi substituída a cada 20 minutos.

Simultaneamente, os anéis de aorta não usados nos estudos funcionais foram fixados numa solução de formol tamponado a pH 6,9 e processados de forma convencional, com posterior inclusão em parafina; ou foram embebidos em meio de inclusão O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature compound*) (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe B.V.), um meio utilizado para a incorporação de tecido congelado para garantir a preservação da ultra-estrutura celular (histologia) e dos ácidos nucleicos; ou foram congelados a -80°C para posterior lise e homogeneização.

3.2.1. Parâmetros Bioquímicos

Os níveis de glicose e insulina foram medidos usando *kits* comerciais (Sigma-Aldrich and Mercodia, Uppsala, Sweden, respectivamente) e os níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c) no sangue total foram medidos usando um sistema analisador DCA 2000⁺ (Bayer Diagnostics, Barcelona, Espanha), de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.2. Ensaio da enzima DPP-IV no soro

Para medir a actividade da DPP-IV, recorreu-se a um ensaio fluorométrico contínuo, usando H-Gly-Pro-AMC.HBr (BACHEM, Bubendorf, Suíça), que é clivado pela enzima para libertar o *aminomethylcoumarin* fluorescente (AMC). Resumidamente, 20 µL de amostra de soro foi

misturada com o tampão de ensaio (glicina 50 mM, pH 8,7, EDTA 1 mM). Após a pré-incubação durante 5 min, à temperatura ambiente, a reacção foi iniciada pela adição do substrato Gly-Pro-AMC até uma concentração final de 200 μ M. O volume final da reacção para cada poço foi de 100 μ L. A libertação do AMC foi monitorada nos comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão) (microplate reader Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA) a cada 5 min, para um total de 60 min. Para comparação da actividade de DPP-IV entre amostras, os dados foram representados graficamente como unidades de fluorescência relativa em função do tempo para cada amostra. Determinou-se o intervalo de tempo durante o qual a reacção foi linear. Uma linha de tendência para estes pontos de dados foi obtida e o declive determinado.

3.3. Protocolo Experimental - Estudos Funcionais

Os anéis de aorta de rato previamente montados em banhos de órgãos foram ligados a transdutores de força (Letica Scientific Instruments) ligados a um polígrafo de quatro canais (Polygraph 4006, Letica Scientific Instruments) (Figura 17) e sujeitos a um período de duas horas de equilíbrio com lavagens periódicas, de forma a remover os produtos de metabolismo e ainda permitir a recuperação das reservas de ATP e restauração do potencial de membrana por reactivação do transporte iónico dependente de ATP. Após uma pré-incubação dos anéis de aorta, durante 30 minutos, com 10 μ M de cocaína, para inibir o uptake neuronal (Sigma, St Louis, MO, USA) e 40 μ M de deoxicorticosterona (DOCA; Sigma, St Louis, MO, USA), para inibir o uptake extraneuronal, foi induzida a contracção máxima do músculo liso da aorta com NA exógena (10 μ M), para posterior comparação de resultados das diferentes experiências. A partir do platô de contracção à NA procedeu-se ao registo do relaxamento isométrico de duas curvas cumulativas concentração-resposta (CR) de ACh (Figura 18), na ausência e na presença do éster metílico de N^G-Nitro-L-arginina (*N^G-Nitro-L-arginine methylesther*, L-NAME), um inibidor da eNOS, adicionado ao banho de órgãos 30 minutos antes da segunda curva CR.

Em todas as experiências foram efectuadas duas curvas cumulativas CR de ACh, com um intervalo de recuperação de pelo menos 45 minutos entre cada curva. Após cada curva, as preparações foram lavadas com solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* até atingirem novamente o tónus basal inicial, tal como descrito em Silva e colaboradores (2007).

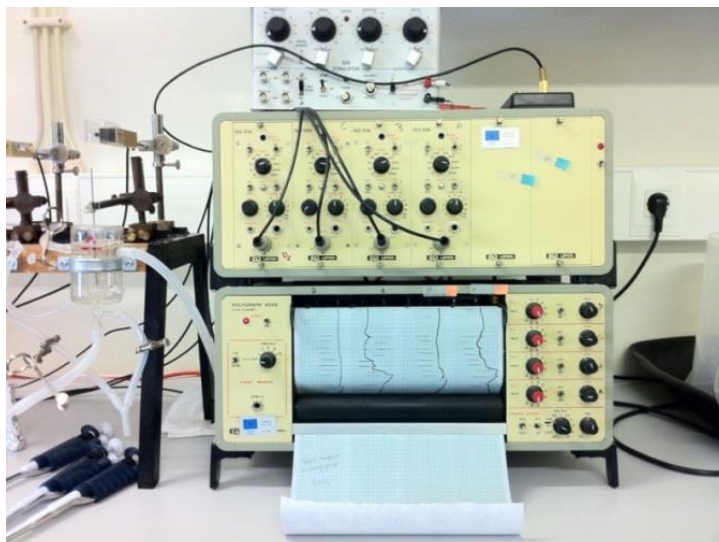


Figura 17 - Polígrafo de quatro canais da *Leticia Scientific Instruments* ligado a transdutores isométricos de força.

Em ambas as curvas, as respostas à ACh, e nomeadamente a respectiva resposta máxima ($E_{máx}$), foram expressas em percentagem da inibição da resposta contráctil de cada anel à NA. É importante referir que a primeira curva é sempre realizada na ausência de L-NAME. Cada anel funcionou como controlo de si próprio, já que as respostas à ACh da segunda curva foram expressas em percentagem do relaxamento máximo obtido na primeira curva CR do respectivo anel. Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta obtida nos anéis controlo.

A potência foi traduzida através do pEC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar de ACh capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pEC_{50} foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa CR em escala semilogarítmica (% do relaxamento máximo versus logaritmo da concentração em mol/L), usando métodos computacionais (*CurveExpert*, versão 1.4 para Windows).

Os resultados foram ainda analisados em termos de mN de tensão, de forma a traduzir por valores absolutos, a actividade intrínseca ($E_{máx}$) da Na em induzir contracção.

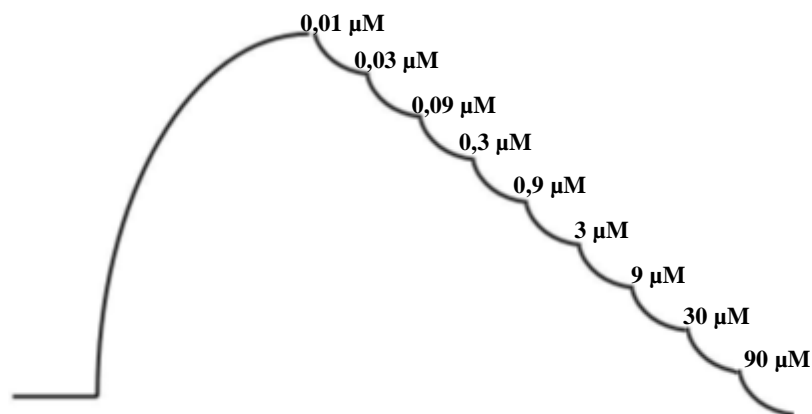


Figura 18 – Representação esquemática de uma curva cumulativa concentração-resposta à ACh em aorta isolada de rato.

3.4. Análise Estatística dos resultados dos estudos funcionais

No que se refere ao tratamento estatístico dos dados, foram avaliadas as diferenças entre os valores de $E_{máx}$ e pEC_{50} da ACh de animais controlo e diabéticos tratados e não tratados com sitagliptina, bem como as diferenças entre as respostas vasorrelaxantes induzidas por cada dose da curva CR de ACh executada na ausência (controlo) e na presença de L-NAME. Para a determinação das diferenças estatísticas entre dois grupos de valores utilizou-se o teste de *t* de Student para dados não emparelhados. Foi ainda utilizado para análise estatística da resposta contráctil da aorta de rato à NA nos animais controlo e diabéticos, tratados ou não com sitagliptina o teste ANOVA (*Analysis of variance*) seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas. Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados presentes neste trabalho estão expressos como média \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de experiências (*n*) indicado.

Relativamente à análise e comparação dos dados obtidos para os níveis de glicose plasmática, HbA1c e insulina, aqueles estão expressos em valores médios \pm S.E.M e a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste de Bonferroni de comparações múltiplas, uma vez verificada pela análise de variância (*Analysis of Variance*, ANOVA) que as amostra não provinham da mesma população.

Posto isto, todos os dados foram ser processados e analisados por métodos computacionais, nomeadamente *GraphPad Prism PC Software* e *IBM SPSS Statistics*.

3.5. Reagentes e fármacos utilizados nos estudos funcionais

Os reagentes usados na preparação da solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* foram adquiridos na Panreac (Barcelona, Espanha) e foram produtos *pro analysi*. Para os estudos funcionais foram usados os seguintes fármacos: noradrenalina, cloridrato de acetilcolina, cocaína e DOCA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, E.U.A.), éster metílico de N^G-Nitro-L-arginina (*N^G-Nitro-L-arginine methylester*, L-NAME) (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). As soluções foram preparadas com os solventes indicados pelos fabricantes.

3.6. Protocolo experimental – Detecção de proteínas por *Western blotting*

3.6.1. Extracção de proteínas a partir de aorta de rato

Com o objectivo de investigar a presença das proteínas do GLP-1R, Akt, eNOS e as respectivas formas fosforiladas, p-Akt e p-eNOS, na aorta dos animais controlo e diabéticos, tratados e não tratados com sitagliptina, analisámos, por *Western blotting*, as proteínas dos extractos de lisados de amostras do referido vaso. Anéis de aorta representativos dos 4 grupos de animais foram pesados, cortados em pequenas porções e homogeneizados por dissociação mecânica com um *Potter-Elvehjem* (Uni Form, Jencons, Inglaterra), em gelo, com 300 µL de tampão de lise RIPA [150 mM NaCl; 50 mM Tris (pH 7,5); 5mM ácido etilenoglicol-bis (β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA); 1% (v/v) Triton X-100 (Tx-100); 0,5% (m/v) desoxicolato de sódio (DOC); 0,1% (m/v) de dodecilssulfato de sódio (SDS)], suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks, Roche) e de inibidores de fosfatases (PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks, Roche). Após incubação em gelo durante 1 h, os lisados foram sonicados e centrifugados a 15194 x g, durante 10 minutos, a 4 ° C. No final da centrifugação, recolheu-se a fracção sobrenadante resultante (correspondente ao extracto total) e determinou-se a concentração de proteína utilizando o reagente ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockfor, IL, USA). Por fim, o extracto total restante foi desnaturado durante 5 minutos, a 95°C, com tampão Laemmli [350 mM Tris-HCl (pH 6,8), 30% (m/v) glicerol, 10 % (m/v) de SDS, 600 mM DL-dithiothreitol (DTT) e 0,012 % (m/v) de azul de bromofenol] para posterior análise electroforética.

3.6.2. Quantificação da Proteína pelo método BCA

A quantificação da proteína foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*, BCA), um método simples, rápido e preciso que permite a detecção

colorimétrica e a quantificação de proteínas totais. Este método combina a redução de Cu^{2+} a Cu^+ pelas proteínas em meio alcalino (reação de biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e selectiva, do íon Cu^+ através de um único reagente contendo o ácido bicinconínico (Pierce). Nesta reação forma-se um produto de cor roxa, solúvel em água, com forte absorvância a 570 nm, que é linear com concentrações crescentes de proteína, ao longo de uma gama extensa de concentrações (20 $\mu\text{g/ml}$ – 2000 $\mu\text{g/ml}$), permitindo a quantificação de proteínas.

Assim sendo, de acordo com as indicações do fabricante, as amostras previamente preparadas foram diluídas na razão de 1:10. Para a curva padrão prepararam-se 7 diluições utilizando-se albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) e ainda um padrão que funcionou como branco (sem proteína). Os dois reagentes A e B (Thermo Scientific) utilizados foram misturados na proporção de 50A:1B e aplicados a cada amostra (incluindo padrões). Posteriormente, tapou-se a placa e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. De seguida mediram-se as absorvâncias a 570 nm. Todas as amostras e padrões foram preparados em duplicado. Por fim, construiu-se a curva padrão, representando num gráfico a $A_{570\text{nm}}$ de cada uma das soluções padrão versus a sua concentração de proteína em $\mu\text{g/mL}$. Usando a curva padrão, determinou-se a concentração de proteína para cada uma das amostras.

3.6.3. Electroforese em gel de Poliacrilamida e Imunodeteção

Para a análise por *Western Blotting*, 40 μg de proteína de cada amostra foram carregadas por poço e separadas por electroforese em gel de poliacrilamida SDS-8% ou SDS-10% (SDS-PAGE) em tampão 125 mM Tris (pH 8,3) contendo 125 mM bicina e 0,5% (m/v) SDS, a 140 V. Após isto, as proteínas foram electrotransferidas para membranas de fluoreto de polivinilidene (PVDF) (Immobilon®-P PVDF transfer membranes 0,45 μm , Millipore). A transferência do *western blot* decorreu em tampão CAPS 100 mM (pH 11) durante 1h 30min a 0,75 A, à temperatura de 4°C. A fim de evitar reações inespecíficas, os locais proteicos residuais das membranas foram bloqueados com leite desnatado 5% (m/v) em tampão Tris salino [TBS: 20 mM Tris (pH 7,6) e 150 mM NaCl, contendo 0,1% (v/v) Tween-20 (TBS-Tween)], durante 1h sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela I), diluídos em TBS-T suplementado com 1% (m/v) de leite desnatado ou 5% (m/v) de BSA, *overnight*, a 4°C. Após lavagem das membranas com TBS-T, em intervalos de 5 minutos, durante 30 min, as mesmas foram incubadas com os anticorpos secundários (Tabela I) sob agitação durante 1h, à temperatura ambiente. No final deste procedimento, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T durante 30 minutos. Posteriormente, a intensidade das bandas foi detectada por um substrato potenciador da quimioluminescência (ECF) (GE Healthcare Bio-Sciences AB,

Uppsala, Sweden) usando um sistema de imagem (Typhoon FLA 9000, GE Healthcare Bio-Sciences AB), de acordo com as indicações do fabricante. No final deste procedimento, as membranas foram sujeitas a *stripping* e re-incubadas com os anticorpos anti-eNOS e anti-Akt, cujas diluições estão também representadas na tabela I, para verificar a quantidade total das proteínas eNOS e Akt em cada banda. Para confirmar a existência de uma quantidade equivalente de proteína e avaliar se a transferência foi bem efectuada, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-actina β (Tabela I) e respectivo anticorpo secundário (Tabela I). Para normalizar os dados, utilizou-se a actina como uma proteína de *loading*. A densidade óptica das bandas foi quantificada por densitometria, com recurso ao *software* TotalLab TL120, e os resultados foram normalizados em função dos resultados para a actina correspondente.

Tabela I - Anticorpos primários e secundários usados para a análise por *Western Blotting*.

Anticorpo	Diluição	Fabricante
Anticorpo de rato anti-p-eNOS (pS1177)	1:250	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA)
Anticorpo de rato anti-eNOS/ NOS Type III	1:250	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, USA)
Anticorpo de coelho anti-p-Akt (Ser473)	1:1000	Cell Signaling
Anticorpo de coelho anti-Akt	1:1000	Cell Signaling
Anticorpo policlonal de coelho anti-GLP-1R	1:400	Abcam
Anticorpo monoclonal anti- β -Actina	1:10000	Sigma-Aldrich Co.
<i>Alkaline phosphatase conjugate secondary anti-mouse</i>	1:10000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
<i>Alkaline phosphatase conjugate secondary anti-rabbit</i>	1:10000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

3.7. Detecção dos níveis de anião superóxido na aorta de rato

Em virtude da sua capacidade para permear membranas celulares, sendo por isso facilmente incorporada pelas células, a sonda dihidroetídio (Dihydroethidium, DHE) é livremente usada para controlar a produção de radicais superóxido (Lee & Miller, 1996). Para quantificar o anião superóxido, anéis de aorta representativos dos 4 grupos de animais foram embebidos em O.C.T., utilizado para a incorporação de tecido congelado, e mantidos a -80°C . O DHE é oxidado na reacção com o $\text{O}_2^{\cdot-}$, convertendo-se em brometo de etídio (EtBr), que por sua vez dá origem a um composto que apresenta fluorescência de cor vermelha (etídeo) (Sena et al., 2011), que se intercala no DNA (Paul, 1994).

As lâminas contendo os cortes histológicos dos referidos anéis, obtidos em crióstato, foram incubadas a 37°C com DHE ($2\ \mu\text{M}$) diluída em tampão salino de fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na_2HPO_4 , 15 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) numa câmara húmida protegida da luz. Após 10 min de lavagens com PBS foram fixadas com 4% (m/v) de paraformaldeído (*paraformaldehyde*, PFA) durante 10 min, seguindo-se nova série de lavagens com PBS por 10 min. As lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem *Glycergel* (Palex Medical SA, Dako, Barcelona) e analisadas num microscópio de fluorescência confocal (LSM 710, Carl Zeiss, Gottingen, Germany), tendo a fluorescência sido detectada a 568 nm.

3.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando um programa específico (GraphPad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA) e expressos como média \pm S.E.M. A comparação dos valores entre os diferentes grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas *Tukey* ou de *Bonferroni*, conforme indicado na legenda. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.9. Técnica de histologia - Micro-anatomia do vaso sanguíneo em estudo

Com o objectivo de determinar a natureza muscular e/ou elástica da artéria submetida a estudo, bem como verificar possíveis alterações da micro-anatomia da mesma, decorrentes da patologia induzida ou do tratamento com sitagliptina, foram realizados estudos histoquímicos. Assim realizaram-se cortes histológicos de $4\ \mu\text{m}$ de espessura de amostras representativas dos 4 grupos de animais, que foram sujeitos a coloração com hematoxilina/eosina convencional.

CAPÍTULO 4

Resultados

4. Resultados

4.1. Modelo animal de diabetes do tipo 1

Modelos animais de diabetes são extremamente úteis para compreender a etiologia das complicações diabéticas. Além de possuírem uma esperança média de vida curta, estes animais também apresentam muitas características fisiológicas e fisiopatológicas semelhantes à da DM humana. Ao longo do tempo têm sido desenvolvidos modelos animais com diabetes induzida por factores genéticos e químicos. Modelos induzidos quimicamente, nomeadamente por STZ permitem um melhor controlo da duração e gravidade da situação diabética. Ratos com diabetes crónica exibem muitas anomalias cardiovasculares semelhantes às observadas em doentes humanos diabéticos (Kobayashi & Karnata, 2001). Numerosos estudos, *in vivo* e *in vitro*, demonstraram também a ocorrência de anomalias funcionais em tecidos vasculares de ratos diabéticos por STZ (MacLeod, 1985).

Neste estudo utilizou-se um modelo animal de DMT1 para caracterizar a disfunção endotelial na aorta e avaliar o potencial efeito terapêutico de um fármaco anti-diabético, a sitagliptina, na reversão/atenuação, da disfunção endotelial, por um mecanismo independente do aumento de secreção de insulina. O modelo animal de DMT1 utilizado foi o rato *Wistar*, em que a diabetes foi induzida às 8 semanas de idade, por injeção com STZ. A STZ tem um efeito tóxico relativamente específico nas células β dos ilhéus de Langerans pancreáticos, conduzindo a uma reduzida síntese de insulina e morte celular. Este modelo mimetiza assim uma DMT1 semelhante à observada em humanos (Junod *et al.*, 1969), com uma hiperglicémia severa, resultante da insuficiência de insulina (hipoinsulinémia). Dois dias após injeção com STZ, os animais com uma concentração de glicose no sangue superior a 13,9 mmol/L foram considerados diabéticos, sendo as experiências realizadas após um mês de diabetes.

Os valores referentes à média do peso corporal, glicémia e níveis de HbA1c e insulina para os ratos controlo e diabéticos de 8 semanas de idade encontram-se apresentados na Tabela II. Verifica-se que os ratos diabéticos apresentaram um peso corporal inferior aos ratos controlo, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Não houve alterações no peso dos animais após a administração de sitagliptina. De forma semelhante, os níveis de glicose (mmol/L) e de HbA1c (%) foram superiores nos animais diabéticos, em comparação com os controlos. Estas diferenças foram também estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Os níveis de glicose, HbA1c e insulina mantiveram-se constantes após a administração de sitagliptina, ou seja, a sitagliptina não

melhorou o controlo glicémico. Verifica-se ainda que os níveis de insulina são significativamente inferiores nos animais diabéticos, em virtude da destruição da massa de células β pancreáticas.

Tabela II – Peso corporal, glicose, HbA_{1c} e níveis de insulina plasmáticos em ratos *Wistar* controlo e diabéticos, não tratados e tratados com 5 mg/kg/dia de sitagliptina durante 2 semanas.

	Cont	Sita	Diab	Diab + Sita
Peso corporal (g)	319,00 ± 7,26	320,7 ± 6,65	229,30 ± 5,37***	230,70 ± 5,65
Glicose (mmol/L)	9,24 ± 0,60	8,56 ± 0,70	40,22 ± 3,07***	41,02 ± 3,32
HbA_{1c} (%)	3,83 ± 0,06	3,70 ± 0,04	9,68 ± 0,09***	9,16 ± 0,25
Insulina (pmol/L)	584,64 ± 76,56	539,20 ± 96,51	19,14 ± 3,48***	22,62 ± 6,96

Nota: Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M. dos valores obtidos de 6-8 animais por grupo. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. *** $p < 0,001$ vs. ratos controlo.

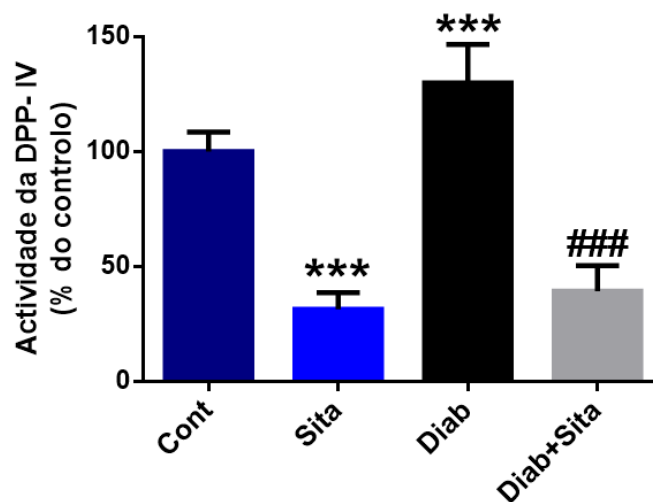


Figura 19 – Quantificação da actividade da DPP-IV de ratos *Wistar* machos de quatro grupos diferentes: ratos controlo e diabéticos, tratados e não tratados com 5 mg/kg/dia de sitagliptina durante 2 semanas. Os resultados estão apresentados como percentagem média do controlo ± S.E.M. dos valores obtidos de 6-8 animais por grupo. As barras verticais representam S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. *** $p < 0,001$ vs. ratos controlo. ### $p < 0,001$ vs. ratos controlo e ratos diabéticos.

O gráfico da figura 19 representa o efeito da diabetes e da sitagliptina na actividade da DPP-IV livre presente no plasma nos quatro grupos de animais em estudo. Verifica-se que, após um mês da indução da diabetes, há um aumento de 30% da actividade da enzima DPP-IV. No rato controlo tratado com sitagliptina, há uma redução de aproximadamente 70% da actividade da enzima. Por sua vez, no rato diabético tratado com sitagliptina, esta redução atinge os 90%.

4.2. Influência da Sitagliptina na resposta vasorrelaxante da aorta isolada de rato à ACh

No sentido de caracterizar farmacologicamente a influência da sitagliptina na resposta vasorrelaxante dependente do endotélio da aorta isolada de rato à ACh, isto é, o vasorrelaxamento dependente da produção de NO induzida pela ACh, foram realizados estudos funcionais de relaxamento do músculo liso da artéria aorta. Inicialmente induziu-se a contracção máxima dos anéis aórticos com NA exógena (10 μ M), seguindo-se posteriormente o registo do relaxamento isométrico de curvas cumulativas CR de ACh.

A análise do gráfico da figura 20 revela que a resposta contráctil à NA está aumentada em situações de diabetes em comparação à situação controlo. Tanto na situação controlo como de diabetes, há uma tendência para a sitagliptina conferir uma capacidade de recuperação do relaxamento do vaso, uma vez que não há uma resposta tão acentuada à NA. Mais ainda, verificamos que no grupo de animais diabéticos tratados com sitagliptina a resposta contráctil à NA não é significativamente diferente daquela da situação controlo.

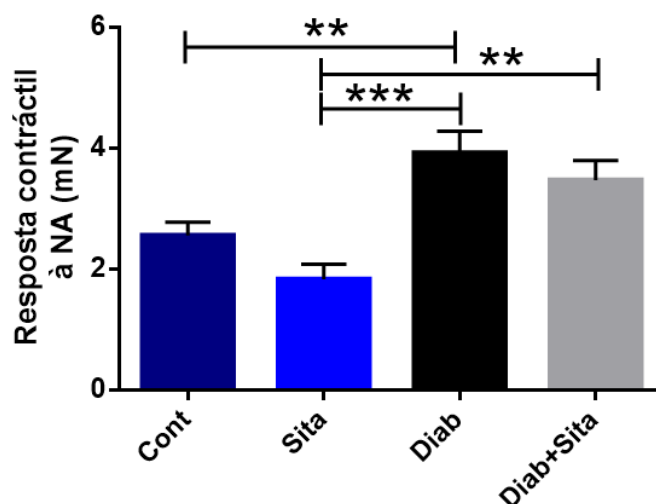


Figura 20 – Resposta contráctil da aorta de rato à NA nos animais controlo e diabéticos, tratados ou não com sitagliptina. Os resultados estão apresentados como média \pm S.E.M. de 16 experiências. As barras verticais representam S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

A ACh, testada em concentrações de 0,01 to 90 μM , induziu relaxamentos dependentes da concentração na aorta isolada de rato nos diferentes grupos em estudo. Nas tabelas III e IV, é possível comparar a resposta vasorrelaxante à ACh dos anéis aórticos de ratos controlo e diabéticos, não tratados e tratados com sitagliptina. Nelas estão representados os valores de relaxamento máximo da aorta em resposta à ACh (traduzidos em % de inibição da contracção obtida com 10 μM de NA) onde é possível verificar que tanto o grupo controlo, como o grupo diabético apresentam um relaxamento máximo de cerca de 60 %. No grupo dos animais controlo a sitagliptina não alterou significativamente a resposta máxima ($E_{\text{máx}}$) à ACh embora esta tenha sido mais potente ($p\text{EC}_{50}$) em induzir o vasorrelaxamento. No grupo dos animais diabéticos, a sitagliptina parece comprometer o efeito vasorrelaxante da ACh, com uma redução significativa da percentagem de inibição da contracção induzida pela NA ($E_{\text{máx}}$), sem alteração da potência.

Tabela III - Respostas vasorrelaxantes à ACh da aorta de ratos controlo, na ausência e na presença de sitagliptina.

	$E_{\text{máx}}$ (%NA)	$p\text{EC}_{50}$	n
Controlo	59,3±8,2	6,41±0,14	12
Controlo+sitagliptina	76,6±5,2	6,77±0,09*	12

$E_{\text{máx}}$ = relaxamento máximo traduzido em % da inibição da resposta contráctil a 10 μM de NA; $p\text{EC}_{50}$ = logaritmo negativo da concentração molar de ACh capaz de induzir metade do relaxamento máximo; n= número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M.; A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs controlo.

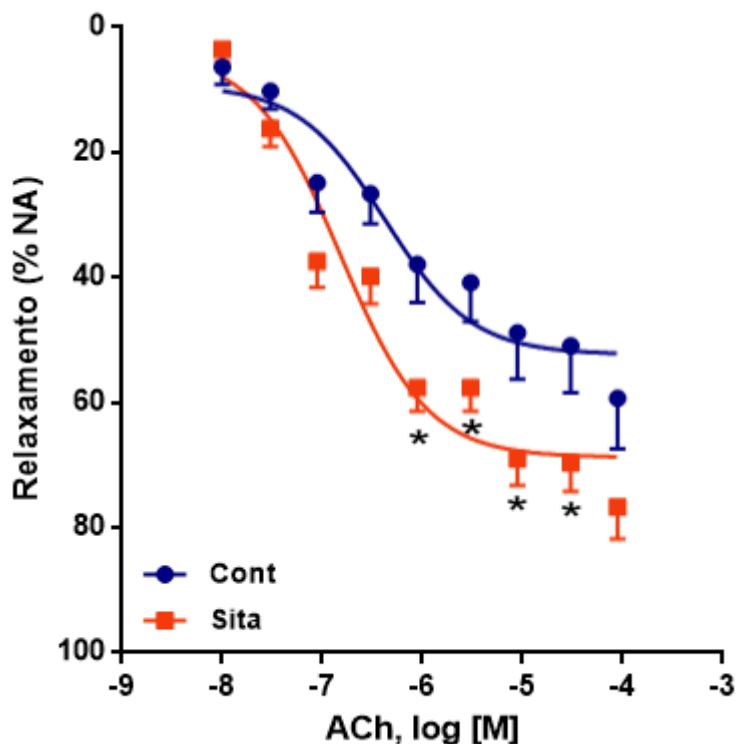


Figura 21 – Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos controlo à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA) na ausência (●, controlo) e na presença de tratamento com sitagliptina (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 12 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo.

Tabela IV - Respostas vasorrelaxantes à ACh da aorta de ratos diabéticos na ausência e na presença de sitagliptina.

	$E_{m\acute{a}x}$ (%NA)	pEC_{50}	n
Diabético	59,5±8,2	6,27±0,14	12
Diabético+sitagliptina	27,1±5,1*	5,93±0,21	12

$E_{m\acute{a}x}$ = relaxamento máximo traduzido em % da inibição da resposta contráctil a 10 µM de NA; pEC_{50} = logaritmo negativo da concentração molar de ACh capaz de induzir metade do relaxamento máximo; n= número de experiências; Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M.; A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,01 vs. diabético.

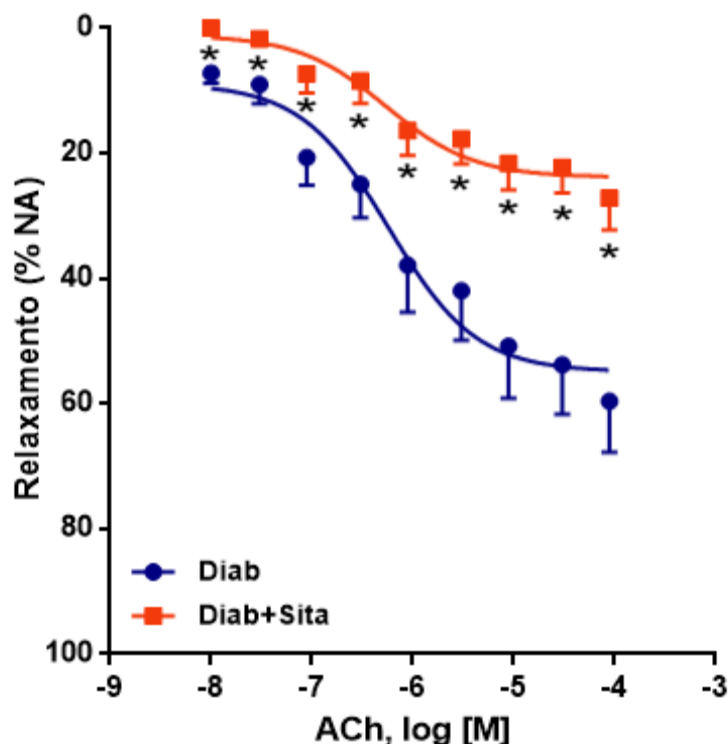


Figura 22 – Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos diabéticos à ACh (% de inibição da contração induzida pela NA) na ausência (●, diabéticos) e na presença de tratamento com sitagliptina (■). Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M. (n = 12 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs. controlo.

4.3. Efeito do L-NAME na resposta vasorrelaxante da aorta de rato à ACh

A ACh promove a produção de NO por activação da eNOS. Assim sendo, com o intuito de confirmar que o vasorrelaxamento induzido pela ACh e observado nos 4 grupos de animais estudados é mediado pelo NO, utilizou-se o L-NAME, um inibidor da isoforma endotelial da NOS, na concentração de 250 μ M. A pré-incubação com L-NAME praticamente aboliu a resposta vasorrelaxante à ACh nos quatro grupos de animais, demonstrando um antagonismo de tipo não competitivo com redução significativa da resposta máxima ($E_{m\acute{a}x}$) (Figuras 23, 24, 25 e 26).

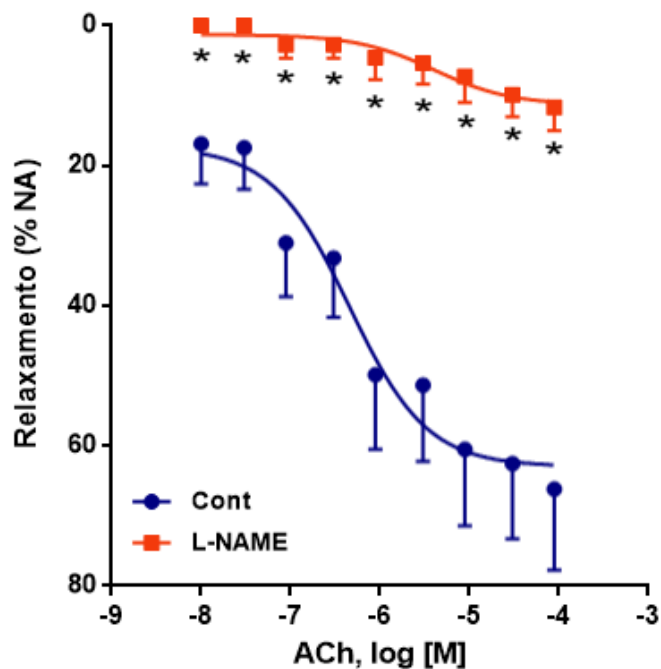


Figura 23 – Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos controlo à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 µM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 6 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo.

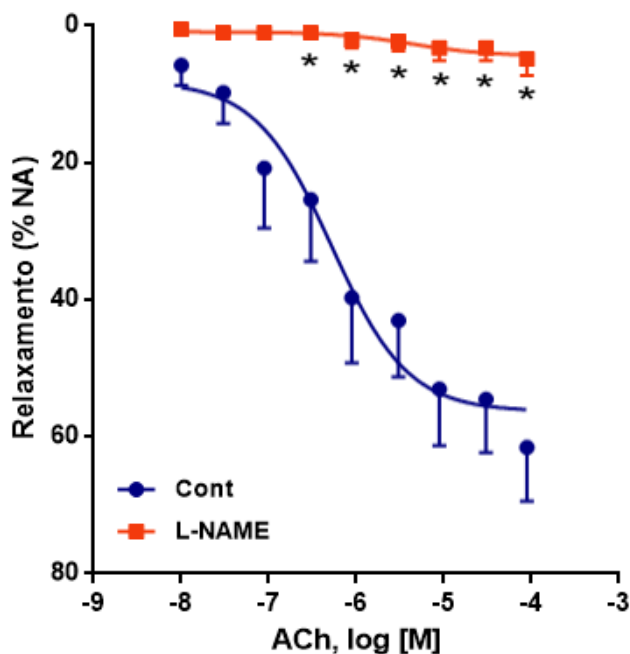


Figura 24 – Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos controlo tratados com sitagliptina à ACh (% de inibição da contracção induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 µM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 6 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo.

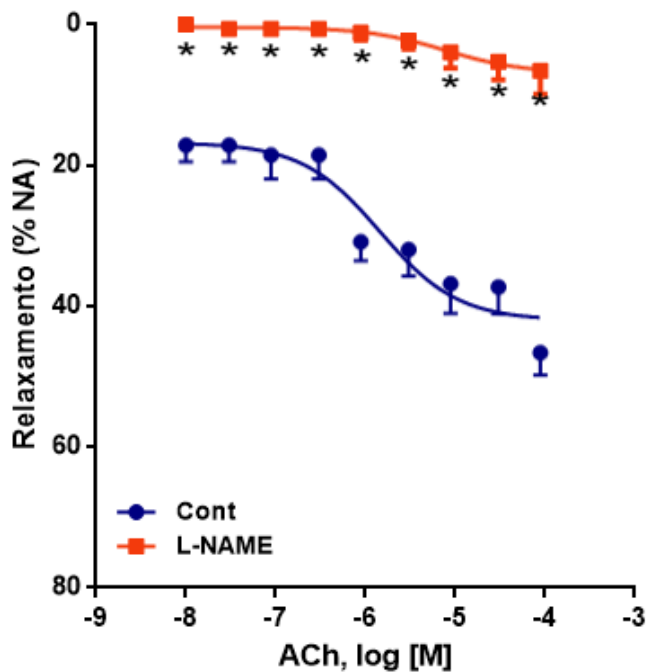


Figura 25 – Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos diabéticos à ACh (% de inibição da contração induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 μM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 4 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo.

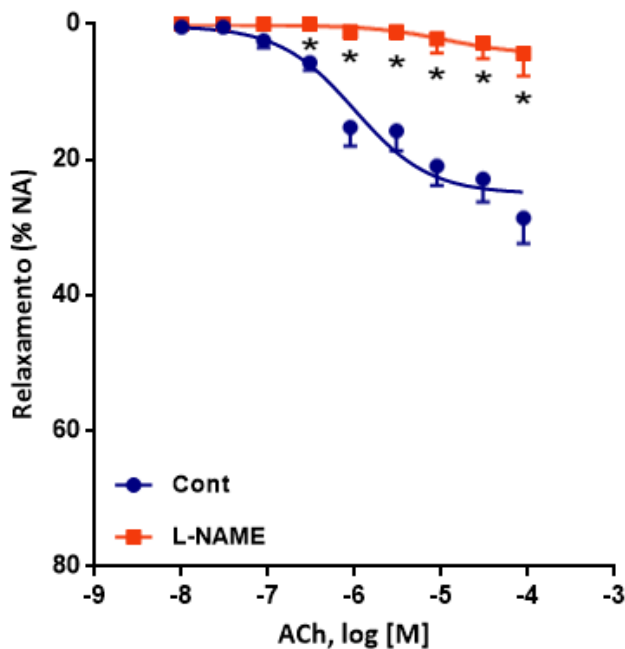


Figura 26 – Resposta vasorrelaxante da aorta de ratos diabéticos tratados com sitagliptina à ACh (% de inibição da contração induzida pela NA), na ausência (●, controlo) e na presença de 250 μM de L-NAME (■). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. (n = 4 por grupo); as barras verticais representam S.E.M.; a significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de Student. **p*<0,05 vs. controlo.

4.4. Estudo do efeito da sitagliptina no eixo das incretinas e respectivas vias de sinalização na aorta dos 4 grupos de animais

4.4.1. Análise da expressão do GLP-1R

Com o intuito de investigar o efeito da inibição da DPP-IV no eixo das incretinas e respectivas vias de sinalização, foi determinado o nível de expressão do GLP-1R em extractos totais de aorta de rato, por *Western Blotting*. Nos animais diabéticos verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) de cerca de 75% ($175,1 \pm 22,51\%$) na expressão do GLP-1R comparativamente com os animais controlo ($100,00 \pm 17,97\%$). No grupo de ratos diabéticos sujeitos a tratamento com sitagliptina, parece haver uma tendência para aproximação da situação controlo com uma redução da expressão do GLP-1R ($128,20 \pm 24,47\%$) (Figura 27).

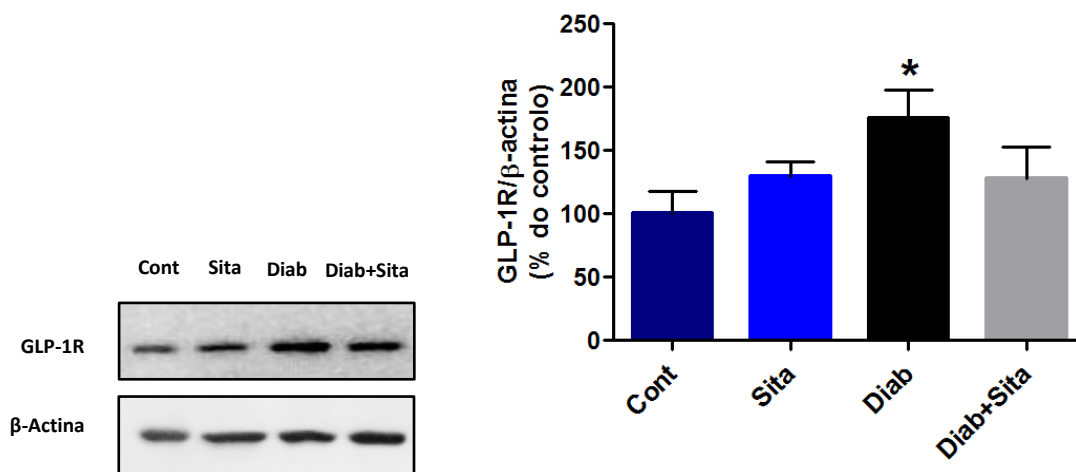


Figura 27 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos do GLP-1R em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. ($n = 7-9$ por grupo). A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$ vs. controlo.

4.4.2. Análise da expressão da Akt e p-Akt

A Akt é uma proteína essencial para a activação da cascata de sinalização da eNOS, responsável pela produção de NO que causa relaxamento do músculo liso vascular, assegurando a homeostasia da função endotelial. Posto isto, os níveis da Akt total na aorta, quer da sua forma fosforilada e activa, foram avaliados por *Western Blotting*. A partir dos dados recolhidos observou-se que o conteúdo proteico da Akt total não foi alterado com o tratamento de sitagliptina, e que os

ratos diabéticos não apresentaram diferenças estatísticas relativamente aos ratos controlo (Figura 28).

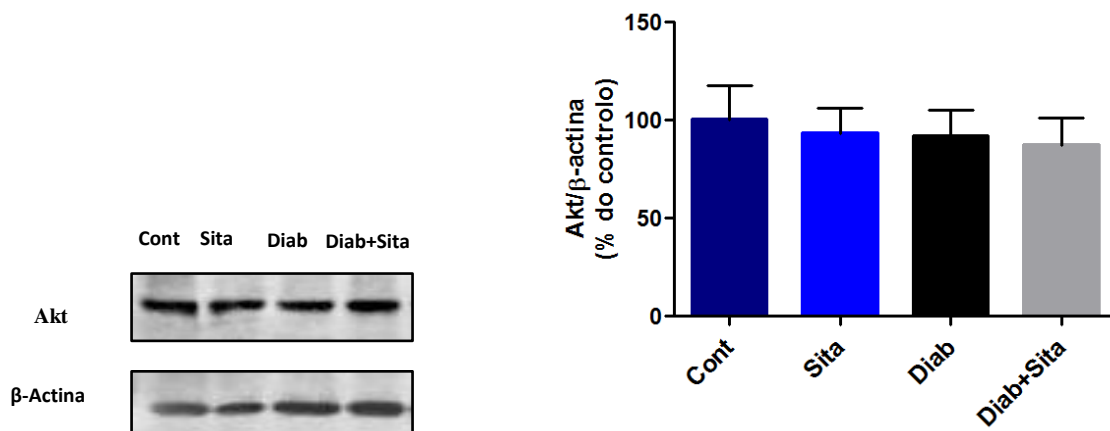


Figura 28 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos totais de Akt em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo ± S.E.M. (n = 7-8 por grupo).

Quanto à forma fosforilada da Akt, os animais diabéticos mostraram níveis de proteína p-Akt ($112,74 \pm 24,86\%$) semelhantes aos animais controlo ($100,00 \pm 20,61\%$). A administração de sitagliptina tendencialmente aumentou a fosforilação desta proteína tanto nos animais controlo como nos diabéticos em aproximadamente 56 e 58%, respectivamente; porém as diferenças estatísticas não foram significativas (Figura 29).

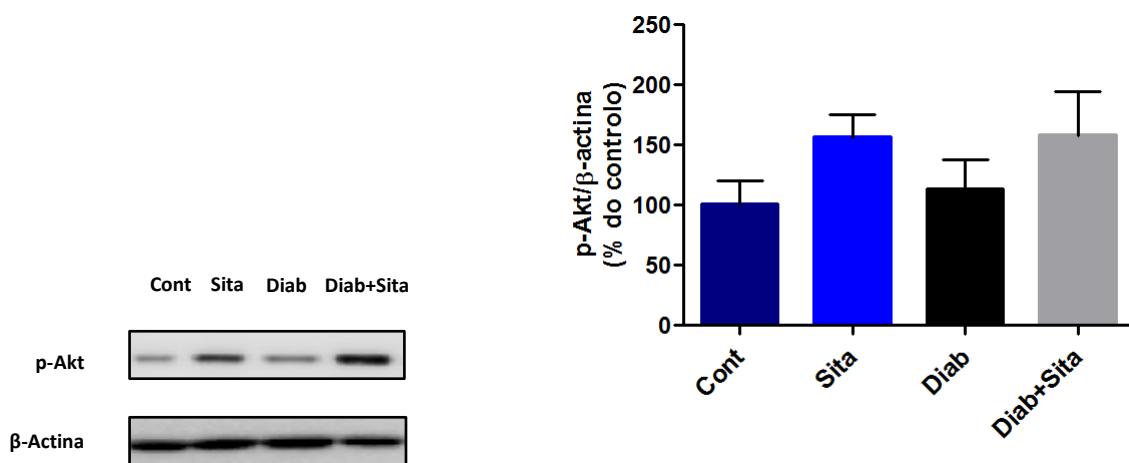


Figura 29 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos de p-Akt em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo ± S.E.M. (n = 8-10 por grupo).

No que diz respeito aos níveis de expressão de Akt activa, determinados através da razão p-Akt/Akt total, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados ($p>0,05$) (Figura 30). No entanto, a administração de sitagliptina tendencialmente aumentou a razão p-Akt/Akt total em ratos controlo ($163,92 \pm 38,32\%$) e em ratos diabéticos ($121,49 \pm 20,51\%$), embora nestes últimos o aumento tenha sido mais ténue.

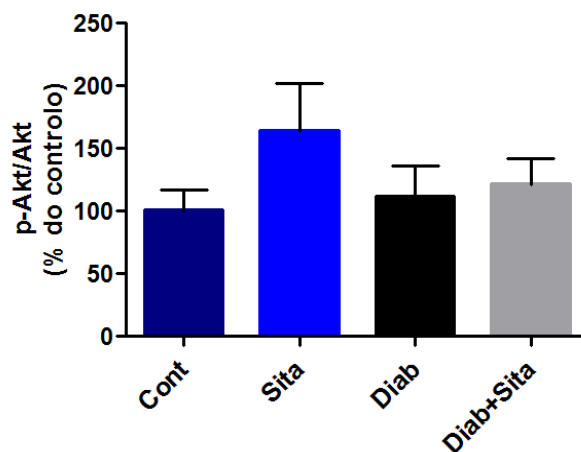


Figura 30 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos de Akt activa em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis de expressão da enzima Akt fosforilada/Akt total foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SEM ($n = 5-6$ por grupo).

4.4.3. Análise da expressão da eNOS e p-eNOS

Com vista a compreender os efeitos da sitagliptina na disfunção endotelial, fomos determinar os níveis de expressão da eNOS na aorta, através de *Western Blotting* para avaliar os níveis de biodisponibilidade do NO. Através da observação directa do *Western blot* e do gráfico da figura 31 verificou-se que o grupo diabético foi o que apresentou níveis tendencialmente mais aumentados de eNOS ($152,5 \pm 32,77\%$) entre os quatro grupos.

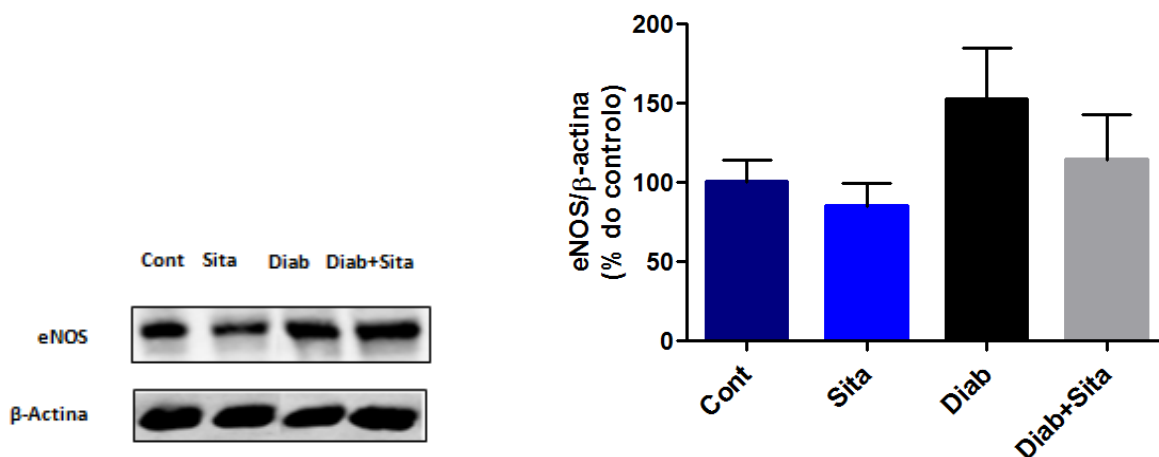


Figura 31 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos totais da eNOS em segmentos aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. ($n = 8-10$ por grupo).

Observou-se ainda uma tendência para uma diminuição da fosforilação da eNOS nos animais controlo e diabéticos tratados com sitagliptina (Figura 32), não sendo as diferenças observadas estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

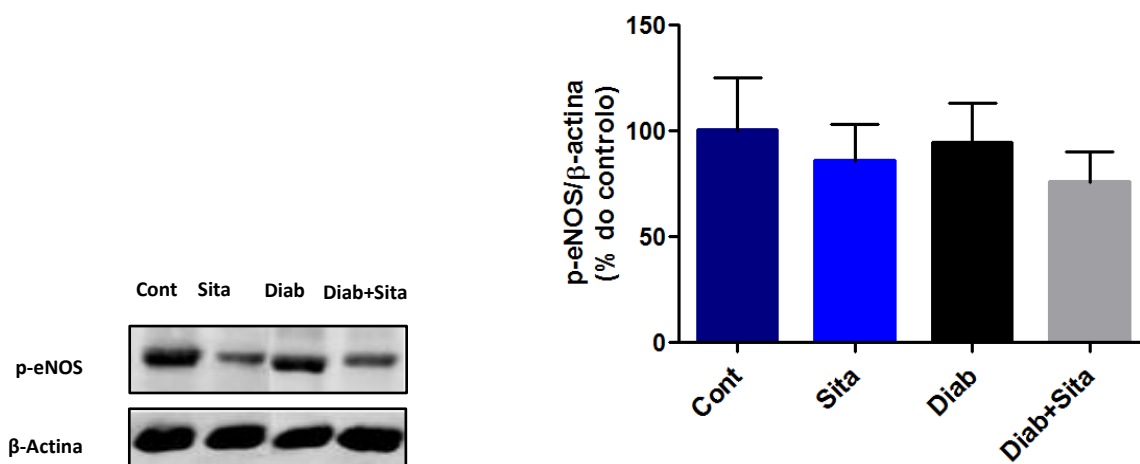


Figura 32 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos da p-eNOS em segmentos aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis proteicos foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. O *Western blot* apresentado é representativo de cada grupo de animais. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. ($n = 4-6$ por grupo).

Ao nível da aorta, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão de eNOS activa entre os quatro grupos em estudo (Figura 33), determinados através da razão p-eNOS/eNOS total ($p>0,05$).

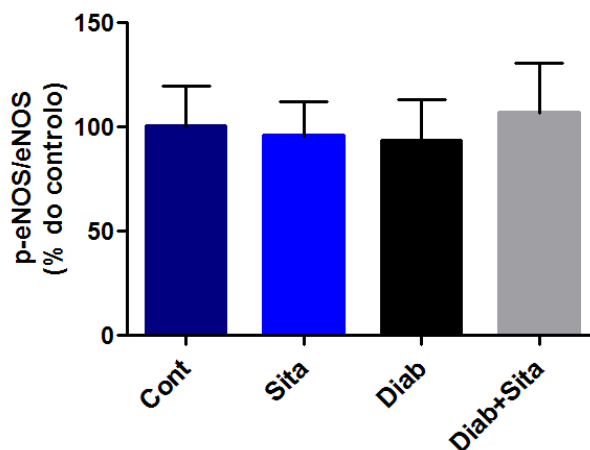


Figura 33 – Efeito da sitagliptina nos níveis proteicos de eNOS activa em anéis aórticos de ratos controlo e ratos diabéticos. Os níveis de expressão da enzima eNOSfosforilada/eNOS total foram determinados por *Western blotting* em extractos totais de aortas de ratos controlo (*Wistar*) e diabéticos (*Wistar* com diabetes induzida por STZ), tratados ou não com sitagliptina. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm S.E.M. (n = 8-10 por grupo).

4.5. Determinação da produção de anião superóxido na aorta nos 4 grupos de animais

O anião superóxido é o principal oxidante do NO, diminuindo a sua biodisponibilidade, fenómeno este que está na origem da disfunção endotelial. Assim, recorreu-se a uma técnica de fluorescência usando a sonda DHE para avaliar os níveis de $O_2^{\cdot-}$ na artéria aorta dos ratos controlo e diabéticos, não tratados e tratados com sitagliptina, com o intuito de avaliar se este fármaco poderá reverter o *stress* oxidativo. Como é possível observar através da análise das figuras 34 e 35, há um aumento no *stress* oxidativo nos anéis de aorta de ratos diabéticos, traduzido por um aumento da intensidade da fluorescência, comparativamente aos respectivos animais controlo ($p<0,001$). A administração de sitagliptina diminuiu significativamente ($p<0,001$) a intensidade da fluorescência, quer nos animais controlo, quer nos diabéticos, como o traduzem os resultados do gráfico da figura 35.

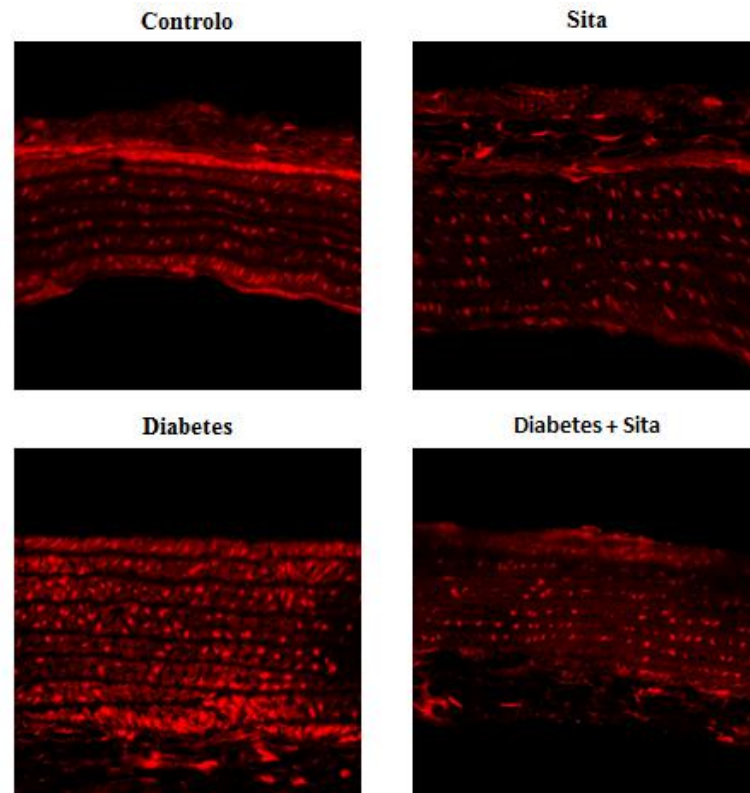


Figura 34 – Efeitos da diabetes e sitagliptina nos níveis de anião superóxido nos anéis de aorta de ratos *Wistar*. Imagens representativas da marcação (a vermelho) de secções de anéis aórticos com a sonda fluorescente dihidroetídio (n = 5 por grupo). Amplificação: 40x.

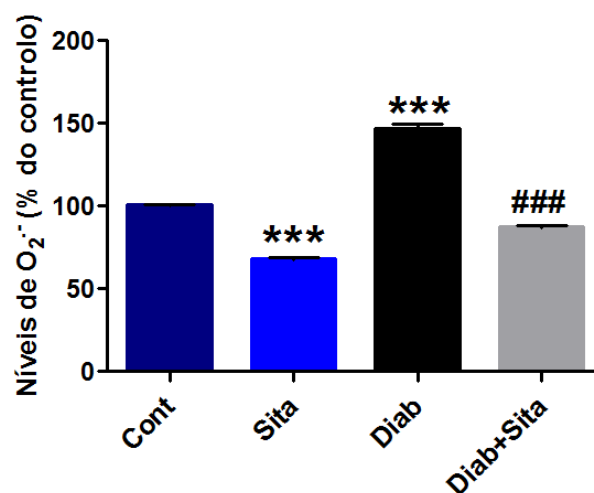


Figura 35 – Efeitos da diabetes e sitagliptina nos níveis de anião superóxido nos anéis de aorta de ratos *Wistar*. Os níveis de O₂^{•-} foram determinados por marcação de secções de anéis aórticos com a sonda fluorescente dihidroetídio. Os resultados estão apresentados como percentagem média do controlo ± S.E.M. dos valores obtidos de 5 secções representativas por grupo. As barras verticais representam S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. ****p*<0.001 vs. ratos controlo. ###*p*<0.001 vs. ratos diabéticos.

4.6. Micro-anatomia da aorta nos 4 grupos de animais

Com o objectivo de verificar a influência da diabetes e da sitagliptina na micro-anatomia dos anéis de aorta de rato *Wistar*, foram realizados estudos histoquímicos com a coloração hematoxilina/eosina (HE). A hematoxilina foi utilizada como corante de contraste para detectar os núcleos celulares que coram de azul, enquanto que a eosina cora o citoplasma de rosa. A análise histológica demonstrada pela HE revelou claramente a túnica íntima, média e adventícia (Figura 36).

Nos anéis aórticos de animais diabéticos, comparativamente aos animais controlo, a coloração HE demonstrou, ao nível da túnica média, uma perda de densidade da matriz constituída por proteoglicanos, embora sejam mantidas as camadas celulares. É ainda possível identificar um desarranjo estrutural das fibras elásticas e do tecido conjuntivo, em comparação com os animais controlo. A administração de sitagliptina nos ratos diabéticos conduziu a um aumento da densidade da matriz numa tentativa de aproximação da situação controlo. Relativamente aos animais controlo tratados com sitagliptina, não são observadas alterações significativas ao nível da túnica média nem da camada adventícia, ou seja, o fármaco não alterou o estado do vaso sanguíneo comparativamente à situação controlo.

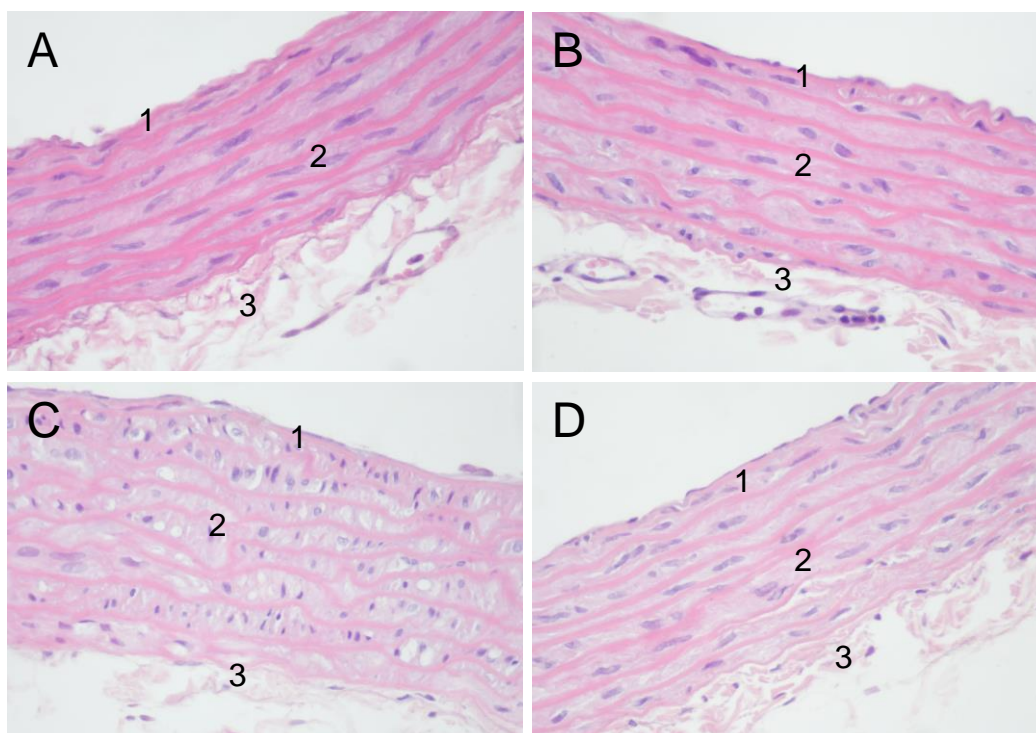


Figura 36 – Técnica de hematoxilina/eosina na aorta isolada de rato *Wistar* controlos e diabéticos, não tratados e tratados com sitagliptina. Os quatro painéis (X400) referem-se a secções representativas da túnica íntima (1), média (2) e adventícia (3) da aorta de ratos *Wistar* controlo (painel A), ratos *Wistar* tratados com sitagliptina (painel B), ratos diabéticos (painel C) e ratos diabéticos tratados com sitagliptina (painel D).

CAPÍTULO 5

Discussão

5. Discussão

O endotélio foi considerado durante anos como uma mera barreira selectivamente permeável entre a corrente sanguínea e a parede vascular, contudo, actualmente ele é considerado um órgão homeostático fundamental para a regulação do tónus e da estrutura vascular (Versari *et al.*, 2009). Sob condições fisiológicas, as células endoteliais são capazes de sintetizar e segregar múltiplas substâncias anti-ateroscleróticas, a mais caracterizada das quais o NO, produzido a partir do metabolismo da L-arginina pela eNOS. Em condições normais, a estimulação endotelial induz a produção de agentes que regulam a função vasomotora, desencadeiam processos inflamatórios e afectam a homeostasia vascular. Entre os vasodilatadores temos o NO, que se difunde para os tecidos circundantes e células, exercendo o seu papel protector a nível cardiovascular, através do relaxamento muscular, prevenção da adesão de leucócitos, da proliferação de células do músculo e adesão de plaquetas e da inibição da expressão de moléculas de adesão celular (Vanhoutte, 1989). A disfunção endotelial é uma das complicações vasculares mais frequentes decorrentes da diabetes e caracteriza-se por alterações funcionais e estruturais ao nível do endotélio, que perde o seu papel de protecção, tornando-se uma estrutura pro-aterosclerótica (Vanhoutte, 1989). A perda da função endotelial normal ocorre em consequência da diminuição da biodisponibilidade de NO. Nestas situações, o endotélio vai activar diversas vias fisiológicas compensatórias, nomeadamente: libertação de outros vasodilatadores derivados do endotélio, tais como prostanoídes (prostaciclina) e factores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) (Endemann & Schiffrin, 2004). Simultaneamente, há a produção de outras substâncias e mediadores com propriedades pró-ateroscleróticas, incluindo a endotelina-1 (ET-1), tromboxano A2, prostaglandina H2 e ROS, que podem exercer uma acção vasoconstritora (Verma & Anderson, 2002).

Devido ao facto da incidência da DM estar a aumentar a uma taxa alarmante (IDF diabetes Atlas) é fundamental implementar estratégias preventivas e terapêuticas eficazes de forma a diminuir o aparecimento e desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares subjacentes à diabetes, responsáveis pela elevada morbimortalidade em doentes diabéticos (Kolluru *et al.*, 2012).

Estudos revelam que, em situações de diabetes, há um aumento da actividade da DPP-IV (enzima responsável pela degradação das incretinas) presente no plasma e, consequentemente, uma deficiente resposta do sistema de incretinas, que é compensada pelos miméticos de incretinas (análogos/derivados de GLP-1) e inibidores da DPP-IV, que restauram os níveis endógenos de incretinas, actuando, assim, como anti-hiperglicémicos, já que estimulam a produção de insulina (Suen & Burn, 2012). A sitagliptina integra esta nova classe de agentes anti-hiperglicémicos orais,

os inibidores da DPP-IV, aumentando a biodisponibilidade e tempo de semi-vida da forma activa do GLP-1 (Drucker, 2006), prolongando o seu efeito fisiológico e, desta forma, melhora a glicémia pós-prandial e em jejum nos doentes com DMT2 e reduz os níveis de HbA1c (Gallwitz, 2007), podendo contribuir ainda para a regeneração das células β pancreáticas.

Desde a sua aprovação, as terapêuticas baseadas nas incretinas demonstraram a sua eficácia clínica em doentes diabéticos tipo 2. Actualmente, a sitagliptina está aprovada como auxiliar da dieta e exercício, em monoterapia ou como coadjuvante à terapêutica com outros ADOs, para melhorar o controlo glicémico em doentes com DMT2. Contudo, os potenciais benefícios clínicos destas abordagens na DMT1 estão ainda pouco clarificados (Davidson, 2010). Dado que os inibidores da DPP-IV são responsáveis por aumentar a secreção de insulina (Lovshin & Drucker, 2009), é provável que não sejam eficazes em situações onde não há qualquer função residual das células β (Kutoh & Hori, 2013). A possibilidade de aplicação destas terapêuticas em doentes diabéticos tipo 1 surgiu recentemente. Na DMT1, ocorrem deficiências ao nível da secreção de insulina devido à perda de células β (Davidson *et al.*, 2011). Posto isto, é de fundamental importância avaliar a eficácia da sitagliptina como fármaco no possível restabelecimento da função endotelial, em condições de hiperglicémia crónica, como ocorre na DMT1, por mecanismos extra-pancreáticos independentes do aumento de secreção de insulina.

É do conhecimento geral que uma melhoria dos valores de HbA1c com o tratamento com doses múltiplas diárias de insulina exógena reduz significativamente as complicações microvasculares da diabetes, no entanto a maioria dos adultos com DMT1 permanece acima dos limites estipulados (< 53 mmol/mol (7%)) (Ellis *et al.*, 2011). Posto isto, utilizou-se um modelo animal de DMT1, os ratos *Wistar* com diabetes induzida por STZ. Este modelo caracteriza-se pela sua hiperglicémia descontrolada, hipoinsulinémia e cetoacidose (Nemoto *et al.*, 2006). A STZ causa danos directos irreversíveis nas células β de ilhéus de Langerhans do pâncreas, resultando na forte redução da massa residual de células β e, conseqüentemente, deficiências na secreção de insulina (Kim *et al.*, 2008; Suen & Burn, 2012), sendo estes resultados observáveis 72 horas após a injeção de STZ (Hassan *et al.*, 2010). No nosso estudo não ocorreram alterações significativas nos níveis de glicémia, HbA1c e insulina nos animais controlo e diabéticos tratados com sitagliptina. Estes resultados são contraditórios aos observados num estudo piloto recentemente apresentado, que demonstrou que a sitagliptina foi capaz de reduzir a dose diária de insulina, glicémia e níveis de HbA1c em doentes com DMT1 (Foley *et al.*, 2008). Para além disso, uma vez que a sitagliptina aumenta os níveis endógenos de GLP-1, seria de esperar uma melhoria nos parâmetros glicémicos, já que o GLP-1 actua ao nível das células α reduzindo a secreção de *glucagon*, diminuindo o esvaziamento gástrico, suprimindo o apetite e promovendo ainda a

proliferação das células β , além de inibir a sua apoptose (Suen & Burn, 2012). A maior limitação do nosso estudo foi o tamanho reduzido da amostra e o facto do tratamento com sitagliptina ter sido avaliado por um curto período (2 semanas), o que pode não ter sido suficiente para produzir os efeitos desejados no controlo do perfil glicémico. É ainda fundamental referir que os resultados descritos na literatura foram obtidos de estudos em que foi administrada uma terapia insulínica conjuntamente com a sitagliptina, sugerindo que os inibidores da DPP-IV podem ser clinicamente úteis em indivíduos com deficiência total de insulina, desde que seja assegurada a toma de doses exógenas diárias de insulina em simultâneo (Kutoh, 2011; Kutoh & Hori, 2013).

O peso corporal dos ratos diabéticos foi significativamente mais baixo do que o dos ratos controlo, o que está de acordo com estudos de outros autores (Hassan *et al.*, 2011). Não houve alterações no peso corporal dos animais após a administração de sitagliptina, pois trata-se de um fármaco neutro a nível de alterações do peso dos indivíduos (Badyal & Kaur, 2008; Davidson *et al.*, 2011; Suen & Burn, 2012).

A enzima DPP-IV é uma protease serínica amplamente distribuída e que é enzimaticamente activa nas suas formas solúvel e ligada à membrana (Varga *et al.*, 2011), sendo que o modelo de DMT1 utilizado caracteriza-se por elevados níveis plasmáticos de DPP-IV (Bose *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Varga *et al.*, 2011). Na avaliação da actividade da DPP-IV presente no soro no nosso modelo animal, verificou-se um aumento em 30% da mesma, após 1 mês de indução de diabetes, à semelhança do que está descrito em alguns estudos (Gonçalves *et al.*, 2012; Suen & Burn, 2012). Por sua vez, o tratamento com sitagliptina produziu reduções significativas na actividade da DPP-IV de ratos controlo e diabético, em percentagens semelhantes às que foram observadas num estudo realizado por Bhansali e seus colaboradores, em que a administração de uma única dose de inibidor da DPP-IV originou 70-90 % de inibição da actividade da DPP-IV no plasma ao longo de um período de 24 h (Bhansali *et al.*, 2010).

A disfunção endotelial é um factor crítico e essencial no desenvolvimento de doença vascular no estado diabético. Anomalias na reactividade vascular têm sido envolvidas na patofisiologia de diferentes formas de DCV, incluindo hipertensão, doença cardíaca coronária, insuficiência cardíaca crónica, doença arterial periférica, diabetes e insuficiência renal crónica (Endemann & Schiffrin, 2004; Hassan *et al.*, 2011). Muitas das complicações em diabetes estão relacionados com o aumento da glicémia e da produção de ROS, o que conduz a disfunção endotelial (Sena *et al.*, 2011). Os resultados de estudos de reactividade vascular em modelos animais de diabetes crónica ou quimicamente induzida realizados até ao momento são alvo de alguma controvérsia. Muitos estudos com animais diabéticos revelaram aumentos na resposta contráctil da aorta torácica em resposta a agentes vasoconstritores, como a NA (Xavier *et al.*,

2003), enquanto outros revelaram deficiências na reactividade vascular aos mesmos. Não há explicação satisfatória para as variáveis de resposta dos vasos sanguíneos diabéticos a vasoconstritores e vasodilatadores. Evidências indicam que o efeito da diabetes na reactividade vascular difere entre diferentes tipos de vaso e em diferentes durações de diabetes, que pode variar de aguda (1 dia a 6 semanas) a crónica (10 semanas a um ano) (MacLeod & McNeill, 1985). Um estudo realizado por Lynn P. Weber e seus colaboradores (1996) demonstrou que as respostas contrácteis máximas à NA da aorta de ratos com diabetes induzida por STZ (duração de 12 a 14 semanas) aparecem aumentadas, em comparação com os seus homólogos controlo (Weber *et al.*, 1996). Neste estudo não foram observadas diferenças no número de receptores α_1 -adrenérgicos na aorta de ratos controlo e diabéticos. No entanto, houve uma diminuição do acoplamento de proteínas G ao receptor α_1 -adrenérgico na aorta de ratos diabéticos. Este e outros estudos, que também observaram aumentos nas respostas máximas contrácteis pela estimulação do receptor α_1 -adrenérgico (Brody & Dixon, 1964; Mulhern & Docherty, 1989) propõem, assim, que o aumento da contractilidade observada em resposta à NA em ratos diabéticos, não se deve a uma diminuição da libertação de factores relaxantes derivados do endotélio, causada por um endotélio disfuncional (Weber *et al.*, 1996), mas sim a um aumento da actividade de proteínas G que se ligam ao receptor α_1 -adrenérgico, mediando o aumento da resposta à estimulação destes receptores na diabetes (Brody & Dixon, 1964; Mulhern & Docherty, 1989). Ou seja, poderá estar a ocorrer uma grande melhoria na actividade dos elementos de transdução de sinal a jusante do receptor de forma a mediar a melhoria das respostas contrácteis máximas da aorta de ratos diabéticos (Weber & Macleod, 1997). De acordo com estas evidências, os resultados obtidos pelo nosso grupo de trabalho em anéis de aorta demonstraram um aumento significativo na resposta contráctil à NA em ratos *Wistar* com diabetes induzida por STZ, comparativamente aos seus homólogos controlos. Alguns autores sugerem ainda que este aumento da contracção vascular nos ratos com diabetes induzida por STZ pode ocorrer também devido a defeitos nos mecanismos de sinalização por Ca^{2+} (Hassan *et al.*, 2011), nomeadamente na actividade e/ou no número destes canais iónicos no músculo liso vascular (White & Carrier, 1990).

Relativamente aos efeitos do tratamento com sitagliptina na resposta contráctil da aorta de rato à NA em animais controlo e diabéticos verificou-se, no nosso estudo, uma tendência para a sitagliptina conferir uma capacidade de recuperação do relaxamento do vaso, uma vez que não há uma resposta tão acentuada à NA. Mais ainda, verificámos que no grupo de animais diabéticos tratados com sitagliptina há uma aproximação da situação controlo. Tal pode ser explicado pelo aumento dos níveis de GLP-1 activo capaz de activar os seus receptores na aorta, uma vez que ele

activa a AC, que por sua vez ao catalisar a formação de cAMP, promove o relaxamento do músculo liso vascular.

No que diz respeito à influência da sitagliptina na resposta vasorrelaxante da aorta isolada de rato à ACh, um estudo realizado em 1980 demonstrou que a ACh requer a presença de células endoteliais para induzir a vasodilatação (Furchgott, 1980), o que comprova a importância da camada endotelial para a homeostasia vascular. Assim sendo, a ACh induz o vasorrelaxamento por um mecanismo que é endotélio-dependente e a formação de NO é responsável por grande parte desse efeito. Um estudo realizado por Hansen & Olesen (1997) demonstrou que o vasorelaxamento induzido pela ACh em artérias mesentéricas de resistência de ratos deve-se à contribuição de dois mecanismos endotélio-dependentes distintos: um é mediado pelo NO e o outro envolve a activação de canais de Ca^{2+} , canais de K^+ e canais de K sensíveis à voltagem (K_v). Ainda nesse estudo, a adição de L-NAME apenas inibiu parcialmente o vasorrelaxamento induzido pela ACh, sugerindo a contribuição de efeitos independentes do NO (Hansen & Olesen, 1997). Está comprovado que a hiperglicémia, um dos marcadores essenciais da diabetes, causa danos nos tecidos através de diversos mecanismos, tais como formação de AGEs, aumento do fluxo da via dos polióis e aumento da apoptose e da produção de ROS (Ozyazgan *et al.*, 2000). A disfunção endotelial e o comprometimento do relaxamento endotélio-dependente aos vasodilatadores, tais como a ACh, é uma característica comum em diferentes tipos de vasos sanguíneos, e tem sido demonstrado em diversos modelos animais de DMT1 e DMT2 (Kamata *et al.*, 1989; De Vriese *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2005; Sena *et al.*, 2011). A grande maioria destes estudos foi realizada em artérias de condutância, como a artéria aorta, e a disfunção endotelial foi atribuída, na generalidade, à redução da produção do NO ou ao aumento da sua inactivação (Kamata *et al.*, 1989; Saleh *et al.*, 2013), mas também à destruição das células endoteliais e à produção exacerbada de agentes vasoconstritores derivados do endotélio em resposta ao *stress* oxidativo (Saleh *et al.*, 2013). Na diabetes, é provável que a alteração dos níveis plasmáticos de insulina desempenhe um papel fundamental na activação da via PI3K/Akt, na resistência à insulina e ainda na disfunção endotelial. Um estudo revelou que ratos com diabetes induzida por STZ apresentaram, após 8 semanas de diabetes, hiperglicémia e hipoinsulinémia, e exibiram reduções no relaxamento endotélio-dependente em resposta à ACh, comparativamente com o grupo controlo (Kobayashi *et al.*, 2009). Ainda nesse estudo, as respostas vasorrelaxantes à ACh foram abolidas com uma pré-incubação com L-NAME. No nosso estudo a ACh, testada em concentrações de 0,01 to 90 μM , induziu relaxamentos dependentes da concentração na aorta dos quatro grupos de animais, tendo também sido abolida com a pré-incubação com L-NAME, à semelhança do que está descrito na literatura (Sena *et al.*, 2011).

O comprometimento do relaxamento dependente do endotélio em ratos com diabetes induzida por STZ pode ser devido a vários factores: aumento dos níveis de glicose no sangue, diminuição do nível de insulina no sangue, diminuição do influxo de Ca^{2+} no endotélio ou diminuição de libertação de Ca^{2+} a partir de seus locais de armazenamento, diminuição da expressão da NOS ou a sua inactivação, diminuição da difusão de NO no músculo liso e ainda aumento do *stress* oxidativo e produção de ROS (Kamata & Nakajima, 1998). No nosso estudo, os resultados obtidos nos anéis de aorta não demonstraram alterações na resposta vasorrelaxante à ACh mediada pelo endotélio em ratos *Wistar* com diabetes induzida por STZ, comparativamente aos seus controlos homólogos, tendo ambos os grupos apresentado um relaxamento máximo de cerca de 60 % (traduzido em % de inibição da contracção obtida com 10 μM de NA). Estes resultados podem ser explicados pelo facto do tempo de diabetes induzida por STZ ter sido de apenas 4 semanas, o que pode não ser suficiente para provocar lesões funcionais irreversíveis nos vasos aórticos.

O relaxamento endotelial é mediado pelo NO, em consequência da fosforilação da eNOS através da via PI3K/Akt. Uma eNOS funcional oxida o seu substrato L-arginina, produzindo L-citrulina e NO. Esta reacção requer a dimerização da enzima, a presença do substrato L-arginina, e do co-factor essencial BH4. Factores de risco cardiovascular, como a hipertensão arterial, hipercolesterolemia e diabetes estimulam a produção de ROS na parede vascular. As espécies $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagem avidamente com o NO vascular, originando peroxinitrito (ONOO^-). O cofactor BH4 é altamente sensível à oxidação pelo ONOO^- . Níveis diminuídos de BH4 promovem a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela eNOS, ou seja conduzem ao desacoplamento da enzima (Förstermann & Münzel, 2006). Assim sendo, sob determinadas condições fisiopatológicas, nomeadamente sob aumento do *stress* oxidativo, a regulação positiva da expressão da eNOS está associada à redução da vasodilatação endotélio-dependente, um fenómeno conhecido por eNOS *uncoupling* (Kietadisorn *et al.*, 2012). A sitagliptina aumenta os níveis de GLP-1 endógenos, aumentando a activação dos receptores GLP-1R, estimulando a eNOS (Ussher & Drucker, 2012). Na situação controlo, um aumento da actividade da eNOS é benéfica, causando o relaxamento endotelial da aorta. Contudo, nos ratos diabéticos, o aumento da fosforilação da eNOS, que poderá estar já desacoplada em virtude do estado diabético, poderá ser prejudicial, verificando-se uma redução do vasorrelaxamento endotelial, que pode ser explicada pelo mecanismo da eNOS *uncoupling* (Förstermann & Münzel, 2006). De facto os nossos resultados podem ser explicados, em parte, à luz deste fenómeno, uma vez que no grupo dos animais controlo a sitagliptina não alterou significativamente a resposta máxima ($E_{\text{máx}}$) à ACh embora esta tenha sido mais potente ($p\text{EC}_{50}$) em induzir o vasorrelaxamento; e no grupo dos animais diabéticos, a sitagliptina parece comprometer o efeito

vasorrelaxante da ACh mediado pelo NO, com uma redução significativa da resposta máxima, sem alteração da potência. Mais ainda através da análise da expressão proteica por *Western blotting* verificou-se que o grupo diabético foi o que apresentou níveis tendencialmente mais aumentados de eNOS total entre os quatro grupos, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão de eNOS activa, determinados através da razão eNOS fosforilada/eNOS total, para além de um aumento no *stress* oxidativo nos anéis de aorta de ratos diabéticos, traduzido por um aumento da intensidade da fluorescência da sonda DHE, comparativamente aos respectivos animais controlo.

Vários são os grupos de investigadores que se têm debruçado sobre a via eNOS/NO pelo papel que desempenha no relaxamento endotélio-dependente de vasos sanguíneos, nomeadamente da aorta. Um estudo recente revelou também um aumento significativo dos níveis da proteína eNOS em homogeneizados de retina de ratos, após duas semanas da indução da diabetes com STZ (Leal et al., 2007). Também à semelhança do que foi verificado no nosso estudo, recentemente Kobayashi e colaboradores (2009), não observaram diferenças na fosforilação da eNOS em Ser1177 nos ratos controlo e diabéticos. Ainda nesse estudo, conclui-se que em ratos diabéticos, comparativamente à situação controlo, não houve diferenças dos níveis de fosforilação da eNOS induzidos pela ACh, embora tenham ocorrido deficiências no relaxamento induzido pela ACh (Kobayashi *et al.*, 2009). A sitagliptina potencia a fosforilação da eNOS em Ser1177 através da fosforilação da AMPK α , levando ao aumento dos níveis de NO (Liu *et al.*, 2012), contudo, nos resultados por nós obtidos, não foram observadas diferenças entre os grupos controlo e diabético tratados e não tratados com este fármaco. Embora não tenhamos avaliado a produção de NO na aorta, no estudo realizado por Kobayashi, não houve diferenças na produção de NO entre ratos controlo e ratos diabéticos, o que os leva a concluir que o comprometimento do relaxamento induzido pela ACh observado em aortas de ratos diabéticos pode ser devido à presença de um metabolismo oxidativo anormal de NO, ao invés de uma diminuição na actividade de eNOS e da produção de NO, tal como já tinha sugerido anteriormente (Kobayashi & Karnata, 2001).

A produção eficiente de NO é assegurada pela activação da eNOS, mediada pela Akt (Duda *et al.*, 2004). A activação de PI3K leva à fosforilação da Akt em resíduos de Thr308 e Ser473 (Stokoe *et al.*, 1997; Manning & Cantley, 2009). A fosforilação da Akt em Thr308 é mediada pela PDK-1 (Stokoe *et al.*, 1997; Manning & Cantley, 2009), enquanto a fosforilação em Ser473 é mediada pela PDK-2 (Sarbasov *et al.*, 2005). No entanto, ainda não é completamente compreendido a forma como, ou se, a regulação da fosforilação da PDK/Akt é alterada em situações de disfunção endotelial em modelos diabéticos. Uma vez que a principal via de sinalização da insulina é a PI3K/PDK/Akt/eNOS, é importante considerar a possibilidade da

alteração dos níveis de insulina no plasma em modelos diabéticos poder originar mudanças na activação desta via e à resistência à insulina (Kuboki *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2000). Desta forma, a falta de insulina na DMT1 experimental está associada a reduções nos valores basais da actividade da Akt cardíaca (Dobrzynski *et al.*, 2002), e, em ratos com diabetes induzida por STZ, a administração sistémica de insulina origina um aumento da actividade da maior parte dos componentes da via de sinalização PI3K/Akt no miocárdio, incluindo um aumento da fosforilação da Akt (Laviola *et al.*, 2001). A regulação deficiente da via Akt/eNOS pode ser um dos múltiplos factores que contribuem para a disfunção endotelial observada em associação, tanto com hiperinsulinémia, como com deficiência de insulina. No seguimento do nosso estudo, fomos avaliar a fosforilação da Akt em resíduos de Ser473, utilizando *Western blotting*. O anticorpo anti-fosfo-Akt (para fosforilação em Ser473) permitiu a detecção de uma proteína imunorreactiva com uma massa molecular de 60 kDa. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de Akt fosforilada e, conseqüentemente Akt activa, entre os grupos controlo e diabético, à semelhança do que foi descrito por Kobayashi e seus colaboradores, em aortas de ratos com diabetes induzida por STZ (Kobayashi *et al.*, 2009). O tratamento com sitagliptina aumentou a fosforilação da Akt em ambos os grupos, controlo e diabético, o que está de acordo com o esperado, uma vez que a administração de sitagliptina vai activar a via PI3K/Akt/eNOS. No que se refere aos níveis totais de Akt, não foram observadas alterações significativas entre os quatro grupos de animais analisados, de acordo com o que já foi descrito num estudo anterior, em corações de rato com diabetes induzida por STZ (Laviola *et al.*, 2001).

Diversos estudos relataram o aparecimento de complicações cardiovasculares na DM, tanto em seres humanos, como em modelos animais (Tradit *et al.*, 2012). Evidências da ocorrência de danos estruturais e metabólicos de cardiomiócitos no tecido cardíaco e aumento da proliferação das células do músculo liso nos vasos sanguíneos de grande calibre, como a aorta, foram demonstradas por alguns estudos (Tzikas *et al.*, 2005). Estima-se que aproximadamente 30% dos doentes com DMT1 podem desenvolver uma variedade de complicações (Soltani & Keshavarz, 2007). O rato com diabetes induzida por STZ utilizado neste estudo funciona como um excelente modelo experimental de DM, sendo adequado para o estudo dos mecanismos básicos das complicações cardiovasculares diabéticas (Pieper, 1999). No sentido de complementar a informação obtida com os estudos funcionais e moleculares era fundamental analisar a micro-anatomia da aorta nos quatro grupos de animais com o intuito de observar alterações histológicas na aorta dos ratos diabéticos induzidos por STZ e os possíveis benefícios da sitagliptina na sua reversão, através de coloração HE. No nosso estudo foi possível observar nos animais diabéticos, comparativamente aos animais controlo, uma perda de densidade da matriz constituída por

proteoglicanos ao nível da túnica média, embora sejam mantidas as camadas celulares. Foi ainda possível observar um desarranjo das fibras elásticas no grupo diabético, comparativamente ao grupo controlo. As alterações histológicas observadas no presente estudo demonstraram que a organização estrutural do tecido aórtico foi perturbada em ratos com diabetes induzida por STZ. Os resultados obtidos após o tratamento com a sitagliptina, em que se verificou um aumento da densidade da matriz numa tentativa de aproximação da situação controlo, permitem afirmar que este fármaco exerceu um papel protector sobre as lesões vasculares.

Estudos epidemiológicos demonstram uma elevada incidência de DM em doentes com insuficiência cardíaca crónica (Kengne *et al.*, 2010), sugerindo que a DM origina e/ou promove directamente a disfunção ventricular esquerda (Devereux *et al.*, 2000) e/ou indirectamente através de doença aterosclerótica arterial coronária (Natali *et al.*, 2000). Estudos realizados no âmbito das anomalias morfológicas e/ou da função ventricular esquerda em animais diabéticos têm sugerido que a DM, por si só, induz uma disfunção sistólica do ventrículo esquerdo latente, o que resulta numa maior susceptibilidade de ocorrência de falha cardíaca (Hoit *et al.*, 1999). Recentemente, também foi demonstrado que se o estado diabético persistir por um tempo suficientemente longo, induz cardiomiopatia, sendo que após cinco ou seis semanas após o tratamento com STZ, é facilmente detectável a presença de disfunção ventricular esquerda (Mihm *et al.*, 2001). Num modelo animal de diabetes induzida por STZ foi detectada uma ligeira disfunção sistólica do ventrículo esquerdo no estado basal, bem como uma redução da capacidade de resposta à estimulação adrenérgica (Nemoto *et al.*, 2006). Neste contexto o GLP-1 é uma hormona incretina libertada a partir do intestino em resposta a nutrientes, que exerce um efeito potente na libertação de insulina pelas células β pancreáticas (Grieve *et al.*, 2009) mas que apresenta um efeito cardioprotector (Hattori *et al.*, 2013). Estudos demonstram que a estimulação dos receptores de GLP-1 protege o coração contra as lesões de isquémia e reperfusão em animais (Bose *et al.*, 2005; Ban *et al.*, 2008) e em humanos (Nikolaidis *et al.*, 2004; Lønborg *et al.*, 2012). Um estudo recente revela que os níveis plasmáticos de GLP-1 aumentaram significativamente em doentes com insuficiência na função ventricular esquerda, em comparação com aqueles com função ventricular esquerda preservada (Hattori *et al.*, 2013). A expressão de GLP-1R foi também significativamente reforçada nestes doentes com função ventricular esquerda diminuída (Hattori *et al.*, 2013). Estudos anteriores em animais também demonstraram que a expressão dos receptores de GLP-1 no ventrículo esquerdo surgiu aumentada num modelo de coelho com enfarte do miocárdio (Iwasa *et al.*, 2010, 2011), tendo ainda sido detectado um aumento na expressão dos receptores cardíacos de GLP-1 num modelo canino de insuficiência cardíaca (Bhashyam *et al.*, 2010). Estas evidências podem suportar a ideia de que o sistema GLP-1/GLP-1R pode actuar como um mecanismo

compensatório para disfunção ventricular esquerda. No estudo por nós realizado verificou-se um aumento da expressão do GLP-1R nos anéis aórticos de ratos com diabetes induzida por STZ em comparação com os animais controlo, o que está de acordo com o que foi dito anteriormente, uma vez que, 4 semanas de diabetes poderão ter causado pequenas alterações funcionais conduzindo a um estado patológico semelhante ao da disfunção ventricular esquerda, pelo que há um aumento da expressão destes receptores ao nível da aorta numa tentativa de recuperar o estado funcional do sistema.

A sitagliptina, como inibidor da enzima DPP-IV, vai aumentar os níveis de GLP-1 activo, que estão geralmente diminuídos em situações de diabetes. Está descrito que, *in vivo*, o tratamento com sitagliptina aumenta os níveis de GLP-1 e do seu receptor, activando o cAMP e consequentemente a PKA e a enzima NOS, em artérias renais de ratos hipertensos (Liu *et al.*, 2012). Isto está de acordo com o que se verifica na situação controlo, onde parece haver uma tendência para a sitagliptina aumentar a expressão do GLP-1R. Por outro lado, na situação diabética houve um decréscimo da expressão do receptor, o que contraria os resultados obtidos nos ratos controlo. Em doentes com função do ventrículo esquerdo diminuída, maiores níveis plasmáticos de GLP-1 podem estimular mais fortemente os receptores de GLP-1, e, portanto, mais fortemente estimular a transdução de sinal a jusante de vias de sobrevivências, tais como a via de PI3K/Akt/eNOS, melhorando a disfunção ventricular esquerda (Iwasa *et al.*, 2010, 2011), pelo que podemos estar perante uma tentativa de reversão da situação patológica, havendo assim uma menor expressão do GLP-1R e tendência para aproximação da situação controlo.

O NO é um regulador endógeno importante do tónus vascular, uma vez que é responsável pela sua vasodilatação. Uma utilização ineficiente do substrato L-arginina pela enzima e a diminuição da disponibilidade de NO devido à presença de AGEs em condições de hiperglicémia foram propostos como factores que comprometem a função endotelial normal (Peppas *et al.*, 2003). A relação entre o *stress* oxidativo e a DM está, actualmente, bem definida. Estudos anteriores concluíram que o aumento do *stress* oxidativo é encontrado em ambos os tipo 1 e tipo 2 de diabetes. O *stress* oxidativo resulta num aumento da formação de radicais livres e de diminuição do potencial antioxidante (Naziroğlu, & Butterworth, 2005). Há evidências consideráveis de que o *stress* oxidativo resultante de um aumento da produção e/ou da remoção inadequada de radicais livres, como as ROS, desempenham um papel fundamental na patogénese das complicações diabéticas (Niedowicz & Daleke, 2005). Estudos revelam que, em situações de diabetes não controlada, os níveis de antioxidantes endógenos, tais como a SOD, vitamina E e ácido lipóico estão fortemente diminuídos (Evans *et al.*, 2002). Existe uma estreita relação entre processos inflamatórios e o *stress* oxidativo, sendo que este pode despoletar e regular a inflamação vascular,

enquanto que as células inflamatórias podem estimular a produção de ROS (Libby, 2007). Os resultados obtidos com a sonda DHE evidenciam a relação anterior, pois como já referido, verifica-se um aumento dos níveis de $O_2^{\cdot-}$ na aorta de ratos diabéticos, comparativamente aos controlos, tal como foi observado em estudos anteriores (Sena *et al.*, 2011). A administração de sitagliptina reduziu os níveis de $O_2^{\cdot-}$ em ambos os grupos de animais, sugerindo que este fármaco poderá ter propriedades antioxidantes.

Em suma, a compreensão da fisiopatologia e dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na disfunção endotelial na diabetes, poderá ter um forte impacto na sua prevenção e tratamento. A escassez de informação sobre os efeitos da sitagliptina e dos inibidores da enzima DPP-IV nas complicações macrovasculares realça a importância destes estudos que poderão ser cruciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, na tentativa de diminuir ou eliminar o efeito nocivo da hiperglicémia nas células endoteliais, o que teria um forte impacto na melhoria da qualidade de vida e prognóstico dos doentes diabéticos.

CAPÍTULO 6

Conclusões e Perspectivas Futuras

6. Conclusões e Perspectivas Futuras

A possibilidade de utilização de um inibidor da DPP-IV, a sitagliptina, no tratamento de doentes com DMT1 constituiu a base para a realização deste estudo. Postulou-se, como objectivo principal, avaliar o efeito da sitagliptina na reversão/atenuação da disfunção endotelial, por um mecanismo independente do aumento de secreção de insulina. Para tal, utilizou-se como modelo animal de DMT1, o rato *Wistar* com diabetes induzida por STZ.

A ACh induziu vasorrelaxamento de forma dependente da concentração na aorta de ratos *Wistar* controlo e diabéticos tratados e não tratados com sitagliptina, tendo este sido abolido com a pré-incubação com L-NAME, confirmando a produção de NO induzida pela ACh. Na presença da patologia não se observaram alterações no relaxamento da aorta, comparativamente com a situação controlo, sugerindo que o tempo de indução de diabetes pode não ter sido suficiente para provocar lesões funcionais irreversíveis nos vasos aórticos passíveis de causar um comprometimento do relaxamento. Por sua vez, a ACh foi mais potente em induzir o relaxamento da aorta em ratos controlo na presença de sitagliptina, confirmando a estimulação da eNOS pelo aumento dos níveis de GLP-1 endógenos como resultado da inibição da DPP-IV. Inesperadamente, em ratos diabéticos, o tratamento com sitagliptina parece comprometer o efeito vasorrelaxante à ACh mediado pelo NO em comparação com ratos diabéticos não tratados, o que pode ser explicado à luz do mecanismo da eNOS *uncoupling*. Embora a técnica de *Western blotting* tenha revelado uma tendência para o aumento dos níveis da proteína eNOS total na aorta de ratos diabéticos, não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de expressão de eNOS activa nos quatro grupos de animais, corroborando a semelhança dos perfis de relaxamento obtidos para os grupos controlo e diabético não sujeitos a tratamento com o fármaco. A sitagliptina não exerceu, portanto, melhorias na fosforilação da eNOS.

Também nos níveis totais de Akt não ocorreram alterações significativas entre os quatro grupos de animais analisados, nem nos níveis de Akt activa entre os grupos controlo e diabético, dado tratar-se de uma via de sobrevivência. O tratamento com sitagliptina aumentou tendencialmente a fosforilação da Akt em ambos os grupos, controlo e diabético, o que nos leva a concluir que este fármaco desencadeou a activação da via PI3K/Akt/eNOS, embora no caso do grupo diabético possamos estar perante uma situação de desacoplamento da eNOS.

O aumento significativo da expressão do GLP-1R em anéis aórticos de ratos diabéticos em comparação com os animais controlo pode ser explicado pela existência de um estado patológico semelhante ao da disfunção ventricular esquerda, havendo um aumento da expressão destes

receptores ao nível da aorta numa tentativa de recuperar o estado funcional do sistema. A sitagliptina reduziu a expressão do receptor na situação diabética, contrariamente ao observado na situação controlo, suportando a ideia de que o sistema GLP-1/GLP-1R pode actuar como um mecanismo compensatório na disfunção ventricular esquerda.

As alterações histológicas observadas no presente estudo demonstraram que a organização estrutural do tecido aórtico foi perturbada em ratos com diabetes induzida por STZ, tendo a administração de sitagliptina nestes animais conduzido a um aumento da densidade da matriz numa tentativa de aproximação da situação controlo. Por outro lado, tendo-se primariamente observado um aumento no *stress* oxidativo nos anéis de aorta de ratos diabéticos, através do aumento dos níveis de $O_2^{\cdot-}$, comparativamente aos respectivos animais controlo, evidenciando a estreita relação entre o *stress* oxidativo e a patogenia da doença, a administração de sitagliptina reduziu a produção de $O_2^{\cdot-}$, exibindo propriedades antioxidantes.

Concluindo, os resultados obtidos permitem inferir que, na presença de diabetes, pode ocorrer um comprometimento da via de sinalização PI3K/Akt/eNOS, conduzindo ao desenvolvimento de disfunção endotelial diabética, caracterizada maioritariamente por anomalias na vasodilatação mediada pelo NO, associadas ao *stress* oxidativo. De facto, os efeitos benéficos da sitagliptina na função vascular, observados no grupo controlo deste estudo e que são independentes da secreção de insulina, não foram observados na presença da patologia, podendo estar subjacente fenómenos que comprometem a via de sinalização comum e que não são revertidos pelo fármaco, pelo menos ao fim do curto período de tratamento a que os animais foram sujeitos.

No futuro, no sentido de compreender melhor o efeito da diabetes na disfunção endotelial diabética e o possível efeito da sitagliptina na sua reversão, será imperativo realizar estudos com o mesmo modelo animal de DMT1, mas com um período mais longo de diabetes, assim como com um período mais alargado de tratamento, de forma a permitir, por um lado, a ocorrência de alterações funcionais significativas a nível vascular e, por outro, observar o possível efeito benéfico da sitagliptina. Tal estudo aproximar-se-ia mais da prática clínica.

CAPÍTULO 7

Bibliografía

7. Bibliografía

Aiello, L. P., Gardner, T. W., King, G. L., Blankenship, G., Cavallerano, J. D., Ferris, F. L., Klein, R. (1998). Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, **21**: 143–156.

Alberti KG., & Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, **15**(7): 539–53.

Alexander, R. W. (1995). Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis Oxidative Stress and the Mediation of Arterial Inflammatory Response: A New Perspective. *Hypertension*, **25**: 155–161.

Alonso, L. C., Yokoe, T., Zhang, P., Scott, D. K., Kim, S. K., Donnell, C. P. O., & Garcia-ocan, A. (2007). Glucose Infusion in Mice: A New Model to Induce beta-Cell Replication. *Diabetes*, **56**(7): 1792–801.

American Diabetes Association (2010, 2011). Diagnosis and classification of diabetes *Mellitus*. *Diabetes care*: **33** (Suppl 1): S62–9.

American Diabetes Association (2011). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes care*: **34** (Suppl 1): pp.S11–61.

António, N., Fernandes, R., Ribeiro, C. F., & Providência, L. a. (2010a). Challenges in vascular repair by endothelial progenitor cells in diabetic patients. *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, **10**(3):161-6.

António, N., Fernandes, R., Rodriguez-Losada, N., Jiménez-Navarro, M. F., Paiva, A., de Teresa Galván, E., ... & Providência, L. A. (2010b). Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative effect of several cardiovascular drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **66**(3): 219–30.

Arakawa, M., Mita, T., Azuma, K., Ebato, C., Goto, H., Nomiya, T., Fujitani, Y., Kawamori & R., Watada, H. (2010). Inhibition of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Attenuation of Atherosclerotic Lesion by a Glucagon-like. *Diabetes*, **59**(4): 1030–7.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., & Isner, JM. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, **275**(5302): 964–7.

- Atkinson, MA., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, **358**(9277): 221–9.
- Badyal, D. K. & Kaur, J. (2008). Sitagliptin : a New Class of Oral Drug for Type 2 Diabetes. *JK Science*, **10**(2): 97–98.
- Baggio, L. L., & Drucker, D. J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, **132**(6): 2131–57.
- Ban, K., Hui, S., Drucker, D. J., & Husain, M. (2009). Cardiovascular consequences of drugs used for the treatment of diabetes: potential promise of incretin-based therapies. *Journal of the American Society of Hypertension*, **3**(4): 245–59.
- Ban, K., Kim, K.H., Cho, C.K., Sauvé, M., Diamandis, E. P., Backx, P. H., Drucker, D.J., & Husain, M. (2010). Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology*, **151**(4): 1520–31.
- Ban, K., Noyan-Ashraf, M. H., Hoefler, J., Bolz, S.S., Drucker, D. J., & Husain, M. (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*, **117**(18): 2340–50.
- Bano, K. A., & Batool, A. (2007). Metabolic syndrome, cardiovascular disease and type-2 diabetes. *J Pak Med Assoc.*, **57**(10): 511–5.
- Barre, L. (1932). Sur les possibilites d'un traitement du diabete par l'incrépine. *Bull Acad R Med Belg.*, **12**: 620–634.
- Baumgartner-Parzer, S.M., Wagner L, Pettermann, M., Grillari J., Gessl A. , & Waldhäusl, W. (1995). High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes*, **44**(11): 1323–1327.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.*, **271**(5 Pt 1): C1424–37.
- Belle, Van T.L., Coppieters, K.T., & Von, H. M. (2011). Type 1 Diabetes : Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev.*, **91**(1): 79–118.

- Bendall J.K., Alp, N.J., Warrick, N., Cai, S., Adlam, D., Rockett, K., Yokoyama, M., Kawashima, S., & Channon, K.M. (2005). Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS Overexpression. *Circ Res.*, **97**(9): 864–871.
- Berillis, P. (2013). The Role of Collagen in the Aorta's Structure. *The Open Circulation and Vascular Journal*, **6**(1): 1–8.
- Bevan, P. (2001). Insulin signalling. *Journal of Cell Science*, **114**(Pt 8): 1429–30.
- Bhansali, A., Maji, D., Rao, P. V., Banerjee, S., & Kumar, H. (2010). Historical Overview of Incretin Based Therapies The Discovery of Incretin Hormones. **58**(June): 10–14.
- Bhashyam, S., Fields, A. V., Patterson, B., Testani, J. M., Chen, L., Shen, Y., & Shannon, R. P. (2010). GLP-1 Increases Myocardial Glucose Uptake via p38 α MAP Kinase Mediated, Nitric Oxide Dependent Mechanisms in Conscious Dogs with Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*, **3**(4): 512–521.
- Blandino-Rosano, M., Perez-Arana, G., Mellado-Gil, J. M., Segundo, C., & Aguilar-Diosdado, M. (2008). Anti-proliferative effect of pro-inflammatory cytokines in cultured beta cells is associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibition: protective role of glucagon-like peptide -1. *Journal of Molecular Endocrinology*, **41**(1): 35–44.
- Blaschke, F., Caglayan E, H. W. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: their role as vasoprotective agents in diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, **35**(3): 561–74.
- Blaschke, F., Caglayan E., & Hsueh, W.A. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: their role as vasoprotective agents in diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, **35**(3): 561–74.
- Bose, A. K., Mocanu, M. M., Carr, R. D., Brand, C. L., & Yellon, D. M. (2005). Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes*, **54**(1): 146–51.
- Bosi, E. (2010). Time for testing incretin therapies in early type 1 diabetes? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **95**(6): 2607–9.

- Bottino, R., Balamurugan, A.N., Tse, H., Thirunavukkarasu, C., Ge, X., Profozich, J., Milton, M., Ziegenfuss, A., Trucco, M., Piganelli, J. D. (2004). Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*, **53**(10): 2559–68.
- Brody, M. J., & Dixon, R. L. (1964). Vascular Reactivity in Experimental Diabetes Mellitus. *Circulation Research*, **14**(6): 494–501.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**(6): 1615–25.
- Bucala, R., Tracey K.J., & A Cerami (1991). Advanced glycosylation produces quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, **87**(2): 432–438.
- Buteau, J. (2006). Transcription Factor FoxO1 Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Effects on Pancreatic Beta-Cell Mass. *Diabetes*, **55**(5): 1190–1196.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, **6**(4): 389–95.
- Chang, L., Chiang, S.H., & Saltiel, A. R. (2005). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine*, **10**(7-12): 65–71.
- Channon, K.M. (2004). Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, **14**(8): 323–327.
- Chrysant, S. G., & Chrysant, G. S. (2012). Clinical implications of cardiovascular preventing pleiotropic effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *The American Journal of Cardiology*, **109**(11): 1681–5.
- Chyan, Y.J., & Chuang, L.M. (2007). Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors: An Evolving Treatment for Type 2 Diabetes from the Incretin Concept. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, **1**(1): 15–24.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.C., Jörns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D.L. (2005). Mechanisms of Pancreatic beta-Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. *Diabetes*, **54**(8): 97–107.
- Cohen, R.A. (1995). The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*, **38**: 105–128.

- Commission, E. (2007). Europe in figures - Eurostat yearbook.
- Conarello, S. L., Li, Z., Ronan, J., Roy, R. S., Zhu, L., Jiang, G., Liu, F., Woods, J., Zycband, E., Moller, D.E., Thornberry, N.A., Zhang, B. B. (2003). Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(11): 6825–30.
- Davidson, E. P., Coppey, L. J., Dake, B., & Yorek, M. A. (2011). Treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with alogliptin: effect on vascular and neural complications. *Experimental Diabetes Research*, **2011**: 810469.
- Davidson, J. A. (2013). Incretin-based therapies: focus on effects beyond glycemic control alone. *Diabetes Therapy: Research, Treatment and Education of Diabetes and Related Disorders*, **4**(2): 221–38.
- Davidson, J.A. (2010). Incorporating incretin-based therapies into clinical practice: differences between glucagon-like Peptide 1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase 4 inhibitors. *Mayo Clinic Proceedings*, **85**(12 Suppl): S27–37.
- Davis, H. R., Mullins, D. E., Pines, J. M., Hoos, L. M., France, C. F., Compton, D. S., Graziano, M.P., Sybertz, E.J., Strader, C.D., Van Heek, M. (1998). Effect of chronic central administration of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on food consumption and body weight in normal and obese rats. *Obesity Research*, **6**(2): 147–56.
- De León, D. D., Crutchlow, M. F., Ham, J.Y. N., & Stoffers, D. A. (2006). Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **38**(5-6): 845–59.
- De Vriese, A.S., Van, de Voorde J., Blom, H.J., Vanhoutte, P.M., Verbeke, M., Lameire, N.H. (2000). The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin--induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*, **43**(9): 1116–25.
- Deacon, C. F., & Holst, J. J. (2006). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: a promising new therapeutic approach for the management of type 2 diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **38**(5-6): 831–44.
- Deanfield, J., Donald, A., Ferri, C., Giannattasio, C., Halcox, J., Halligan, S., ... & Webb, D. J. (2005). Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the

- different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*, **23**(1): 7–17.
- Demers, A., McNicoll, N., Febbraio, M., Servant, M., Marleau, S., Silverstein, R., & Ong, H. (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *The Biochemical Journal*, **382**(Pt 2): 417–24.
- Devereux, R. B., Roman, M. J., Paranicas, M., O’Grady, M. J., Lee, E. T., Welty, T. K., ... & Howard, B. V. (2000). Impact of Diabetes on Cardiac Structure and Function : The Strong Heart Study. *Circulation*, **101**(19): 2271–2276.
- Ding, L., Gysemans, C., & Mathieu, C. (2013). β -Cell differentiation and regeneration in type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, **15**(Sup 3): 98–104.
- Ding, X., Saxena, N.K., Lin, S., Gupta, N.A., & Anania, F. (2006). Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology*, **43**(1): 173–81.
- Dobrzynski, E., Montanari, D., Agata, J., Zhu, J., Chao, J., & Chao, L. (2002). Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **283**(6): E1291–8.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., & Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, **429**(6987): 41–6.
- Drucker, D.J. (2003). Enhancing Incretin Action for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, **26**(10):2929-40.
- Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*, **3**(3): 153–65.
- Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., & Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.*, **108**(9): 1341–1348.
- Duda, D. G., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2004). Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends in Molecular Medicine*, **10**(4): 143–5.
- Dupré, J., Behme, M. T., & McDonald, T. J. (2004). Exendin-4 normalized postcibal glyceimic excursions in type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**(7): 3469–73.

- Edelman, S. (2010). Saxagliptin: the evidence for its place in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Core Evidence*, **5**: 23–3
- Editors, G., Richter, C., & Schweizer, M. (2002). Serial Review: Nitric Oxide in Mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, **33**(11): 1465–1474.
- Ellis, S. L., Moser, E. G., Snell-Bergeon, J. K., Rodionova, A. S., Hazenfield, R. M., & Garg, S. K. (2011). Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, **28**(10): 1176–81.
- Endemann, D. H., & Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, **15**(8): 1983–92.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, **23**(5): 599–622.
- Fadini, G.P., Miorin, M., Facco, M., Bonamico, S., Baesso, I., Grego, F., Menegolo, M., De Kreutzenberg, S.V., Tiengo, A., & Agostini C, A. A. (2005). Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, 2005 May, **45**(9): 1449–57.
- Fadini, G. P., Agostini, C., Sartore, S., & Avogaro, A. (2007). Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **194**(1): 46–54.
- Fadini, G.P., Boscaro, E., Albiero, M., Menegazzo, L., Frison, V., De Kreutzenberg, S., Agostini, C., & Tiengo, A. A. (2010). The Oral Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Sitagliptin Increases Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, **33**(7): 33–35.
- Farilla, L., Bulotta, A., Hirshberg, B., Li, Calzi S., Khoury, N., Noushmehr, H., Bertolotto, C., Di Mario, U., Harlan, D.M., & Perfetti, R. (2003). Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*, **144**(12): 5149–58.
- Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U., & Perfetti, R. (2002). Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*, **143**(11): 4397–408.

- Foley, J.E., Ligueros-Saylan, M., He, Y.L., Holst, J.J., Deacon, C.F., Dunning, B.E., Leone-Jones, A., Yu, T., & Kelley, D. (2008). Effect of vildagliptin on glucagon concentration during meals in patients with type 1 diabetes. *Horm Metab Res.*, **40**(10): 727–30.
- Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, **113**(13): 1708–14.
- Fortin, J., Schroeder, J. C., Zhu, Y., Beinborn, M., & Kopin, A. S. (2010). Pharmacological Characterization of Human Incretin Receptor Missense Variants. *J Pharmacol Exp Ther*, **332**(1): 274–280.
- Friedrichsen, B. N., Neubauer, N., Lee, Y. C., Gram, V. K., Blume, N., Petersen, J. S., ... & Møldrup, A. (2006). Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *The Journal of Endocrinology*, **188**(3): 481–92.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**(5789): 373–6.
- Gallwitz, B. (2007). Review of sitagliptin phosphate: a novel treatment for type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, **3**(2): 203–10.
- Gangemi, A., Salehi, P., Hatipoglu, B., Martellotto, J., Barbaro, B., Kuechle, J. B., ... & Oberholzer, J. (2008). Islet transplantation for brittle type 1 diabetes: the UIC protocol. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, **8**(6): 1250–61.
- Georgia, S., & Bhushan, A. (2004). β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass. *J Clin Invest.*, **114**(7): 963–968.
- Gonçalves, A., Leal, E., Paiva, A., Teixeira Lemos, E., Teixeira, F., Ribeiro, C.F., Reis, F., Ambrósio, A.F., F. R. (2012). Protective effects of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin in the blood-retinal barrier in a type 2 diabetes animal model. *Diabetes Obes Metab.*, **14**(5): 454–63.
- Green, B. D., Hand, K. V, Dougan, J. E., McDonnell, B. M., Cassidy, R. S., & Grieve, D. J. (2008). GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **478**(2): 136–42.

- Grieve, D. J., Cassidy, R. S., & Green, B. D. (2009). Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *British Journal of Pharmacology*, **157**(8): 1340–51.
- Grundy, S. M., Benjamin, I. J., Burke, G. L., Chait, a., Eckel, R. H., Howard, B. V., ... & Sowers, J. R. (1999). Diabetes and Cardiovascular Disease : A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*, **100**(10): 1134–1146.
- Gupta, V. (2012). Pleiotropic effects of incretins. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, **16**(Suppl 1): S47–56.
- Hadjiyanni, I., Baggio, L. L., Poussier, P., & Drucker, D. J. (2008). Exendin-4 modulates diabetes onset in nonobese diabetic mice. *Endocrinology*, **149**(3): 1338–49.
- Hadjiyanni, I., Siminovitch, K. A., Danska, J. S., & Drucker, D. J. (2010). Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. *Diabetologia*, **53**(4): 730–740.
- Hansen, P. R., & Olesen, S. P. (1997). Relaxation of rat resistance arteries by acetylcholine involves a dual mechanism: activation of K⁺ channels and formation of nitric oxide. *Pharmacology & Toxicology*, **80**(6): 280–5.
- Hari Kumar, K.V., & Shaikh A, P. P. (2013). Addition of exenatide or sitagliptin to insulin in new onset type 1 diabetes: a randomized, open label study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **100**(2): E55–8.
- Hassan, Z., Dewa, A., Asmawi, M., & Sattar, M. (2011). Assessment of vascular reactivity at different time-course on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, **1**(3): 175.
- Hassan, Z., Dewa, A., Asmawi, M., & Sattar, M. (2011). Assessment of vascular reactivity at different time-course on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, **1**(3): 175.
- Hassan, Z., Yam, M. F., Ahmad, M., & Yusof, A. P. M. (2010). Antidiabetic properties and mechanism of action of *Gynura procumbens* water extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **15**(12): 9008–23.

- Hattori, A., Kawamura, I., Yamada, Y., Kanamori, H., Aoyama, T., Ushikoshi, H., ... & Minatoguchi, S. (2013). Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors as markers of left ventricular systolic dysfunction: a cross-sectional study. *BMJ Open*, **3**(9): E003201.
- Hattori, Y., Kawasaki, H., Abe K, K. M. (1991). Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.*, **261**(4 Pt 2): H1086–94.
- Heiss, C., Keymel, S., Niesler, U., Ziemann, J., Kelm, M., & Kalka, C. (2005). Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, **45**(9): 1441–8.
- Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., ... & Munzel, T. (2001). Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circulation Research*, **88**(2): E14–e22.
- Hinnen, D., & Nielsen, L. L. (2006). Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, **19**(6): 12–14.
- Hoit, B.D., Castro, C., Bultron, G., & Knight S, M. M. (1999). Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Card Fail.*, **5**(4): 324–33.
- Holst, J. J., & Gromada, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **287**(2): E199–206.
- Horbinski, C., & Chu, C. T. (2005). Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radical Biology & Medicine*, **38**(1): 2–11.
- Hossain, P., Kavar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world: A growing challenge. *The New England Journal of Medicine*, **356**(3): 213–5.
- Ichinose, K., Kawasaki, E., & Eguchi, K. (2007). Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. *American Journal of Nephrology*, **27**(6): 554–64.
- International Diabetes Federation (IDF). (2012) “Diabetes Atlas”. 5th ed. Update.

- International Diabetes Federation (IDF). (2013) “Diabetes Atlas”. 6th ed. Update.
- Iwasa, M., Kobayashi, H., Yasuda, S., Kawamura, I., Sumi, S., Yamada, Y., Shiraki, T., Yamaki, T., Ushikoshi, H., Aoyama, T., Nishigaki, K., Takemura, G., Fujiwara, T., Fujiwara, H., & Minatoguchi, S. (2010). Antidiabetic drug voglibose is protective against ischemia-reperfusion injury through glucagon-like peptide 1 receptors and the phosphoinositide 3-kinase-Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **55**(6): 625–34.
- Iwasa, M., Yamada, Y., Kobayashi, H., Yasuda, S., Kawamura, I., Sumi, S., ... & Minatoguchi, S. (2011). Both stimulation of GLP-1 receptors and inhibition of glycogenolysis additively contribute to a protective effect of oral miglitol against ischaemia-reperfusion injury in rabbits. *British Journal of Pharmacology*, **164**(1): 119–31.
- Jakus, V., & Rietbrock, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, **53**(2): 131–42.
- James, S. L. (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev.*, **59**(4): 533–47.
- Januvia. *Merk*. Disponível em: <<http://www.januvia.com/sitagliptin/januvia/consumer/index.jsp>>. Acesso em 10 de Setembro de 2013.
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2005). Modulation of insulin signalling by insulin sensitizers. *Biochemical Society Transactions*, **33**(Pt 2): 358–61.
- Johnstone, M. T., Creager, S. J., Scales, K. M., Cusco, J. A., Lee, B. K., & Creager, M. A. (1993). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*, **88**(6): 2510–2516.
- Jose, T., & Inzucchi, S. E. (2012). Cardiovascular effects of the DPP-4 inhibitors. *Diabetes & Vascular Disease Research: Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, **9**(2): 109–16.
- Joshua, I. G., Zhang, Q., Falcone, J. C., Bratcher, A. P., Rodriguez, W. E., & Tyagi, S. C. (2005). Mechanisms of endothelial dysfunction with development of type 1 diabetes mellitus: role of insulin and C-peptide. *Journal of Cellular Biochemistry*, **96**(6): 1149–56.

- Junod, Alain, Lambert, André E., Stauffacher, Werner, & A. E. R. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation*, **48**(11): 2129–39.
- Kamata, K., & Nakajima, M. (1998). Ca^{2+} mobilization in the aortic endothelium in streptozotocin-induced diabetic and cholesterol-fed mice. *British Journal of Pharmacology*, **123**(8): 1509–16.
- Kamata, K., Miyata, N., & Kasuya, Y. (1989). Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, **97**(2): 614–8.
- Kamata, K., Miyata, N., Abiru T, K. Y. (1992). Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. *Life Sciences*, **50**(19): 1379–87.
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., & Matsuoka, T. (2010). Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, **2010**, 1–11.
- Kar P, H. R. (2008). The effect of sulphonylureas on the microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, **22**(3): 207–13.
- Kawashima, S., Yamashita, T., Ozaki, M., Ohashi, Y., Azumi, H., Inoue, N., Hirata, K., Hayashi, Y., Itoh, H., Yokoyama, M. (2001). Endothelial NO synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**(2): 201–207.
- Kengne, A. P., Turnbull, F., & MacMahon, S. (2010). The Framingham Study, diabetes mellitus and cardiovascular disease: turning back the clock. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **53**(1): 45–51.
- Kieffer, T.J., McIntosh, C.H., P. R. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, **136**(8): 3585–96.
- Kietadisorn, R., Juni, R. P., & Moens, A. L. (2012). Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **302**(5): E481–95.

- Kim, S., Nian, C., Doudet, D. J., & Mcintosh, C. H. S. (2008). Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV With Sitagliptin (MK0431) Prolongs Islet Graft Survival in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Diabetes*, **57**(May): 1331–1339.
- Kim, Y. K., Lee, M.S., Son, S. M., Kim, I. J., Lee, W. S., Rhim, B. Y., Hong, K.W., Kim, C. D. (2002). Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, **51**(2): 522–7.
- Kobayashi, T., & Karnata, K. (2001). Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats. *Atherosclerosis*, **155**(2): 313–20.
- Kobayashi, T., Taguchi, K., Nemoto, S., Nogami, T., Matsumoto, T., Kamata, K. (2009). Activation of the PDK-1/Akt /eNOS pathway involved in aortic endothelial function differs between hyperinsulinemic and insulin-deficient diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **297**(5): H1767–1775.
- Kolluru, G. K., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2012). Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International Journal of Vascular Medicine*, **2012** (Figure 1): 918267.
- Komatsu, R., Matsuyama, T., Namba, M., Watanabe, N., Itoh, H., Kono, N., & Tarui, S. (1989). Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide. *Diabetes*, **38**(7): 902–5.
- Kränkel, N., Adams, V., Linke, A., Gielen, S., Erbs, S., Lenk, K., ... & Hambrecht, R. (2005). Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **25**(4): 698–703.
- Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, **65**(3): 385–411.
- Krieg, L., Theiss, H. D., Assmann, G., & Franz, W. (2012). Positive impact of sitagliptin on cardiac function and survival after acute myocardial infarction. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, **8**(2).
- Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., ... & King, G. L. (2000). Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in

Endothelial Cells and In Vivo : A Specific Vascular Action of Insulin. *Circulation*, **101**(6): 676–681.

Kutoh, E. (2011). Sitagliptin is effective and safe as add-on to insulin in patients with absolute insulin deficiency: a case series. *Journal of Medical Case Reports*, **5**(1): 117.

Kutoh, E., & Hori, T. (2013). Effect of Sitagliptin in Type 1 or Type 2 Diabetic Patients with Absolute Insulin Deficiency : A 48 Weeks Observational Study. *British Journal of Medicine and Medical Research*, **3**(4): 1910–1917.

Laing, S. P., Swerdlow, A. J., Slater, S. D., Burden, A. C., Morris, A., Waugh, N. R., ... & Patterson, C. C. (2003). Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*, **46**(6): 760–5.

Laviola, L., Belsanti, G., Davalli, A. M., Napoli, R., Perrini, S., Weir, G. C., ... & Giorgino, F. (2001). Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes*, **50**(12): 2709–20.

Leal, E. C., Manivannan, A., Hosoya, K.I., Terasaki, T., Cunha-Vaz, J., Ambrósio, A. F., & Forrester, J. V. (2007). Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **48**(11): 5257–65.

Lee, S.A.; Kim, Y.R.; Yang, E.J.; Kwon, E.J.; Kim, S.H.; Kang, S.H.; Park, D.B.; ... & Lee, D.H. (2013). CD26/DPP4 Levels in Peripheral Blood and T Cells in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.*, **98**(6): 2553–61.

Lenski, M., Kazakov, A., Marx, N., Böhm, M., & Laufs, U. (2011). Effects of DPP-4 inhibition on cardiac metabolism and function in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **51**(6): 906–18.

Levitt, H. E., Cyphert, T. J., Pascoe, J. L., Hollern, D. A, Abraham, N., Lundell, R. J., ... Alonso, L. C. (2011). Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Diabetologia*, **54**(3): 572–82.

Li, Y., Hansotia, T., Yusta, B., Ris, F., Halban, P. A, & Drucker, D. J. (2003). Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(1): 471–8.

- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.*, **65**(12 Pt 2): S140–6.
- Liu, L., Liu, J., Wong, W. T., Tian, X. Y., Lau, C. W., Wang, Y.X., ... & Huang, Y. (2012). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension*, **60**(3): 833–41.
- Lønborg, J., Vejlsstrup, N., Kelbæk, H., Bøtker, H. E., Kim, W. Y., Mathiasen, A. B., ... & Engstrøm, T. (2012). Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *European Heart Journal*, **33**(12): 1491–9.
- Lovshin, J. A, & Drucker, D. J. (2009). Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, **5**(5): 262–9.
- MacDonald, P. E., El-Kholy, W., Riedel, M. J., Salapatek, A. M. F., Light, P. E., & Wheeler, M. B. (2002). The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, **51** Suppl 3(December): S434–42.
- MacLeod KM, McNeill, J.H. (1985). The influence of chronic experimental diabetes on contractile responses of rat isolated blood vessels. *Can J Physiol Pharmacol*, **63**(1): 52–7.
- MacLeod, K. M. (1985). The effect of insulin treatment on changes in vascular reactivity in chronic, experimental diabetes. *Diabetes*, **34**(11): 1160–7.
- Manning, B.D., Cantley, L.C. (2009). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, **129**(7): 1261–1274.
- Meier, J. J. (2008). Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? *Diabetologia*, **51**(5): 703–13.
- Meier, J. J., Bhushan, a, Butler, a E., Rizza, R. a, & Butler, P. C. (2005). Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia*, **48**(11): 2221–8.
- Meier, J. J., Gallwitz, B., Salmen, S., Goetze, O., Holst, J. J., Schmidt, W. E., & Nauck, M. A. (2003). Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**(6): 2719–25.

- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides*, **85**(1): 9–24.
- Mihm, M.J., Seifert, J.L., Coyle CM, B. J. (2001). Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Scii*, **69**(5): 527–42.
- Moncada, S., Higgs, E. A., Hodson, H. F., Knowles, R. G., Lopez-Jaramillo, P., McCall, T., Palmer, R. M. J., Radomski, M. W., Rees, D. D., & Schulz, R. (1991). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **17**(sup. 3): vii–vii.
- Monteiro, P., Gonçalves, L., & Providência, L. A. (2005). Diabetes and cardiovascular disease: the road to cardioprotection. *Heart (British Cardiac Society)*, **91**(12): 1621–5.
- Mudaliar, S., & Henry, R. R. (2010). Effects of incretin hormones on beta-cell mass and function, body weight, and hepatic and myocardial function. *The American Journal of Medicine*, **123**(3 Suppl): S19–27.
- Mulhern, M., & Docherty, J. R. (1989). Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, **97**(4): 1007–12.
- Natali, A., Vichi, S., Landi, P., Severi, S., Abbate, A. L., & Ferrannini, E. (2000). Coronary atherosclerosis in Type II diabetes : angiographic findings and clinical outcome. *Diabetologia*, **43**(5): 632–641.
- Naziroğlu, M., & Butterworth, P. (2005). Protective effects of moderated exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can. J. Appl. Physiol.*, **30**(2): 172–185.
- Nemoto, O., Kawaguchi, M., Yaoita, H., Miyake, K., Maehara, K., & Maruyama, Y. (2006). Left ventricular dysfunction and remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, **70**(3): 327–34.
- Niedowicz, D. M., & Daleke, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **43**(2): 289–330.
- Nikolaidis, L. A., Elahi, D., Hentosz, T., Doverspike, A., Huerbin, R., Zourelas, L., ... & Shannon, R. P. (2004). Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **110**(8): 955–61.

- Nir, T., Melton, D. A., & Dor, Y. (2007). Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration. *J Clin Invest*, **117**(9): 2553–2561.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., ... & Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, **404**(6779): 787–90.
- Nyström, T., Gutniak, M.K., Zhang, Q., Zhang, F., Holst, J.J., Ahrén, B., Sjöholm, A. (2004). Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **287**(6): 1209–15.
- Okerson, T., & Chilton, R. J. (2012). The cardiovascular effects of GLP-1 receptor agonists. *Cardiovascular Therapeutics*, **30**(3): E146–55.
- Owu, D. U., Orié, N. N., Nwokocha, C. R., Clapp, L. H., & Osim, E. E. (2013). Comparative Effect of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus on Vascular Responses of Rat Thoracic Aorta to Potassium Ion Channel Openers. *British Journal of Medicine and Medical Research*, **3**(3): 748–759.
- Oyadomari, S., Gotoh, T., Aoyagi, K., Araki, E., Shichiri, M., & Mori, M. (2001). Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*, **5**(3): 252–60.
- Ozyazgan, S., Unlucerci, Y., Bekpinar, S., & Akkan, a G. (2000). Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment. *International Journal of Experimental Diabetes Research*, **1**(2): 145–53.
- Pacher, L., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*, **87**: 315–424.
- Pala, L., Cresci, B., Manuelli, C., Maggi, E., Yamaguchi, Y. F., Cappugi, P., ... & Giannini, S. (2005). Vascular endothelial growth factor receptor-2 and low affinity VEGF binding sites on human glomerular endothelial cells: Biological effects and advanced glycosilation end products modulation. *Microvascular Research*, **70**(3): 179–88.
- Paris, M., Turrel-Cuzin, C., Plachot, C., & Ktorza, A. (2004). Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited. *Experimental Diabetes Research*, **5**(2): 111–21.

- Peppas, M., Uribarri, J., & Vlassara, H. (2003). Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. *Clinical Diabetes*, **21**(4): 186–187.
- Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). Insulin resistance Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.*, **106**(2): 165–169.
- Pettus, J., Hirsch, I., & Edelman, S. (2013). GLP-1 agonists in type 1 diabetes. *Clinical Immunology*, **149**(3): 317–23.
- Pieper, G. M. (1999). Enhanced, unaltered and impaired nitric oxidemediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia*, **42**(2): 204–213.
- Pirola, L., Johnston, A. M., & Van Obberghen, E. (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia*, **47**(2): 170–84.
- Pospisilik, J. A., Martin, J., Doty, T., Eheses, J. A., Pamir, N., Lynn, F. C., ... & Pederson, R. A. (2003). Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Treatment Stimulates Beta Cell Survival and Islet Neogenesis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetes*, **52**(3): 741–750.
- Poston, L., & Taylor, P. D. (1995). Endothelium-Mediated Vascular Function in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Clinical Science*, **88**: 245–255.
- Pratley, R. E., & Gilbert, M. (2008). Targeting Incretins in Type 2 Diabetes: Role of GLP-1 Receptor Agonists and DPP-4 Inhibitors. *The Review of Diabetic Studies*, **5**(2): 73–94.
- Read, P. A., Khan, F. Z., Heck, P. M., Hoole, S. P., & Dutka, D. P. (2010). DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease. *Circulation Cardiovascular Imaging*, **3**(2): 195–201.
- Reimann, M., Bonifacio, E., Solimena, M., Schwarz, P. E. H., Ludwig, B., Hanefeld, M., & Bornstein, S. R. (2009). An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacology & Therapeutics*, **121**(3): 317–31.
- Retnakaran, R., & Zinman, B. (2008). Type 1 diabetes, hyperglycaemia, and the heart. *Lancet*, **371**(9626): 1790–9.
- Richard, K. R., Shelburne, J. S., & Kirk, J. K. (2011). Tolerability of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a review. *Clinical Therapeutics*, **33**(11): 1609–29.

- Ritz, E., & Orth, S. R. (1999). Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *New Eng J Med*, **341**: 1127–1133.
- Roep, B. O. (2003). The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, **46**(3): 305–21.
- Russell-Jones, D., Cuddihy, R.M., Hanefeld, M., Kumar, A., González, J.G., Chan, M., Wolka, A.M., Boardman, M.K. (2012). Efficacy and Safety of Exenatide Once Weekly Versus Metformin, Pioglitazone, and Sitagliptin Used as Monotherapy in Drug-Naive Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, **35**(2): 252–8.
- Saenz, de Tejada, Goldstein, I., Azadzi, K., Krane, R.J., Cohen, & Richard A. (1989). Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med*, **320**: 1025–1030.
- Saleh, D. O., Bayoumi, A. R., El-Eraky, W. I., & El-Khatib, A. S. (2013). Streptozotocin-induced vascular and biochemical changes in rats: Effects of rosiglitazone vs. metformin. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **51**(2): 131–138.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**(December): 799–806.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**(5712): 1098–101.
- Scheen, A. J. (2012). Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) inhibitors are favourable to glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists: yes. *European Journal of Internal Medicine*, **23**(2): 126–31.
- Sen, S., McDonald, S. P., Coates, P. T. H., & Bonder, C. S. (2011). Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clinical Science*, **120**(7): 263–83.
- Sena, C. M., Matafome, P., Louro, T., Nunes, E., Fernandes, R., & Seica, R. M. (2011). Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol.*, **163**(2): 424–37.
- Shah, Z., Pineda, C., Kampfrath, T., Maiseyeu, A., Ying, Z., Racoma, I., ... & Rajagopalan, S. (2011). Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascular Pharmacology*, **55**(1-3): 2–9.

- Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Rajotte, Ray V. (2000). Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *The New England Journal of Medicine*, **343**(4): 230–238.
- Shehata, M. M. A., El-kader, Z. Y. A., Abd, E., & Al, E. (2013). Comparison of effect of stiagliptin and glimepiride on glycemic control and potential cardiovascular complications in diabetic albino rats. *Clinical Pharmacology*, **19**(4): 625–636.
- Sherry, N. A., Chen, W., Kushner, J. A., Glandt, M., Tang, Q., Tsai, S., ... & Herold, K. C. (2007). Exendin-4 improves reversal of diabetes in NOD mice treated with anti-CD3 monoclonal antibody by enhancing recovery of beta-cells. *Endocrinology*, **148**(11): 5136–44.
- Silva, S. A, Marques, F. B., & Fontes Ribeiro, C. A. (2007). Characterization of the human basilar artery contractile response to 5-HT and triptans. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **21**(3): 265–72.
- Sokos, G. G., Bolukoglu, H., German, J., Hentosz, T., Magovern, G. J., Maher, T. D., ... & Shannon, R. P. (2007). Effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) on glycemic control and left ventricular function in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *The American Journal of Cardiology*, **100**(5): 824–9.
- Soltani, N., Keshavarz, M., Dehpour, A.R. (2007). Effect of oral magnesium sulfate administration on blood pressure and lipid profile in streptozocin diabetic rat. *Eur J Pharmacol.*, **560**(2-3): 201–5.
- Sonne, D. P., Engstrøm, T., & Treiman, M. (2008). Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regulatory Peptides*, **146**(1-3): 243–9.
- Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., ... & Hawkins, P. T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* (New York, N.Y.), **277**(5325): 567–70.
- Stolar, M. W., & Chilton, R. J. (2003). Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance. *Clinical Therapeutics*, **25**(Suppl B): B4–31.
- Suen, C. S., & Burn, P. (2012). The potential of incretin-based therapies in type 1 diabetes. *Drug Discovery Today*, **17**(1-2): 89–95.

- Takeda, J., Seino, Y., Tanaka, K., Fukumoto, H., Kayano, T., Takahashi, H., ... & Tobe, T. (1987). Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(20): 7005–8.
- Thorens, B., & Drucker, D. J. (2003). International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family. *Pharmacol Rev*, **55**(1): 167–194.
- Thornberry, N. A, & Gallwitz, B. (2009). Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, **23**(4): 479–86.
- Thum, T., Fraccarollo, D., Schultheiss, M., Froese, S., Galuppo, P., Widder, J. D., ... & Bauersachs, J. (2007). Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*, **56**(3): 666–74.
- Tomas, E., & Habener, J. F. (2010). Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, **21**(2): 59–67.
- Toracic aortic disease program: The Aorta and Its Structure. *Division of Cardiothoracic Surgery, Virginia Commonwealth University*, Disponível em: <<http://www.hearts.vcu.edu/clinical/aortic/index2.html>>. Acesso em 28 de Março de 2014.
- Tradit, A. J., Altern, C., Aziz, A., Lumpur, K., Medicine, F., Raja, J., & Abd, M. (2012). Histological changes in the heart and the proximal aorta in experimental diabetic rats fed with piper sarmentsoum. *Complement Altern Med.*, **9**(3): 396–404.
- Triplitt, C., Wright, A., & Chiquette, E. (2006). Incretin mimetics and dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: potential new therapies for type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*, **26**(3): 360–74.
- Tzikas, D. N., Chalikias, G. K., & Kaskj, J. C. (2005). Epidemiology of the diabetic heart. *Coron. Artery Dis.*, **16**(Suppl 1): S3–S10.
- Unger, R.H.; Eisentraut, A.M. (1969). Entero-insular axis. *Arch Intern Med*, **123**(3): 261–6.
- Ussher, J. R., & Drucker, D. J. (2012). Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocrine Reviews*, **33**(2), 187–215.
- Van Craenenbroeck, E. M., & Conraads, V. M. (2010). Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvascular Research*, **79**(3): 184–92.

- Vanhoutte, P.M. (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, **13**(6 Pt 2): 658–667.
- Varga, T., Somogyi, A., Barna, G., Wichmann, B., Nagy, G., Rácz, K., ... & Firneisz, G. (2011). Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathology Oncology Research*, **17**(4): 925–30.
- Verma, Subodh & Anderson, Todd J. (2002). Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation*, **105**(5): 546–549.
- Versari, D., Daghini, E., Virdis, A., Ghiadoni, L., & Taddei, S. (2009). Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British Journal of Pharmacology*, **157**(4): 527–36.
- Vilsbøll, T., Krarup, T., Deacon, C. F., Madsbad, S., & Holst, J. J. (2001). Reduced Postprandial Concentrations of Intact Biologically Active Glucagon-Like Peptide 1 in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*, **50**(3): 609–613.
- Virally, M., Blicklé, J.-F., Girard, J., Halimi, S., Simon, D., & Guillausseau, P.J. (2007). Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*, **33**(4): 231–44.
- Vitek, M. P., Bhattacharya, K., Glendening, J. M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., ... & Cerami, A. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(11): 4766–70.
- Wang, X., C. M. Cahill, C.M., Piñeyro, M.A., Zhou, J., Doyle, M.E., & Egan, J.M. (1999). Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*, **140**(10): 4904–4907.
- Weber, L. P., & Macleod, K. M. (1997). Influence of streptozotocin diabetes on the alpha-1 adrenoceptor and associated G proteins in rat arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **283**(3): 1469–78.
- Weber, L. P., Chow, W. L., Abebe, W., & MacLeod, K. M. (1996). Enhanced contractile responses of arteries from streptozotocin diabetic rats to sodium fluoride. *British Journal of Pharmacology*, **118**(1): 115–22.

What is type 1 Diabetes? *Diabetes Education Online*. Disponível em: <<http://dtc.ucsf.edu/types-of-diabetes/type1/understanding-type-1-diabetes/what-is-type-1-diabetes/>>. Acesso em 20 de Março de 2014.

What is type 2 Diabetes? *Diabetes Education Online*. Disponível em: <<http://dtc.ucsf.edu/types-of-diabetes/type2/understanding-type-2-diabetes/what-is-type-2-diabetes/>>. Acesso em 20 de Março de 2014.

White, R.E., & Carrier, G.O. (1990). Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin-diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, **253**(3): 1057–1062.

Xavier, F. E., Davel, A. P. C., Rossoni, L. V., & Vassallo, D. V. (2003). Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vascular Pharmacology*, **40**(1): 67–76.

Zeng, G., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Cong, L.-N., Kirby, M., Mostowski, H., & Quon, M. J. (2000). Roles for Insulin Receptor, PI3-Kinase, and Akt in Insulin-Signaling Pathways Related to Production of Nitric Oxide in Human Vascular Endothelial Cells. *Circulation*, **101**(13): 1539–1545.

Zhang, J., Tokui, Y., Yamagata, K., Kozawa, J., Sayama, K., Iwahashi, H., ... & Miyagawa, J. (2007). Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia*, **50**(9): 1900–9.

Zhao, Y., Yang, L., & Zhou, Z. (2014). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: Multitarget drugs, not only antidiabetes drugs. *Journal of Diabetes*, **6**(1): 21–9.

Zóka, A., Múzes, G., Somogyi, A., Varga, T., Szémán, B., Al-Aissa, Z., ... & Firneisz, G. (2013). Altered immune regulation in type 1 diabetes. *Clinical & Developmental Immunology*, **2013**: 254874.