



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



AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE UM NOVO CANDIDATO A  
FÁRMACO NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2

GIZELE CABRAL COSTA

Dissertação de mestrado

Rio de Janeiro

2019

Gizele Cabral Costa

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE UM NOVO CANDIDATO A  
FÁRMACO NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2

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

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

Rio de Janeiro

2019

Ca Cabral Costa, Gizele  
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE UM NOVO  
CANDIDATO A FÁRMACO NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM MODELO  
ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 / Gizele Cabral  
Costa. -- Rio de Janeiro, 2013.  
76 f.

Orientadora: Gisele Zapata Sudo.  
Coorientadora: Roberto Takashi Sudo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Cardiologia, 2013.

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. Cardiomiopatia  
Diabética. 3. IDPP-4. 4. Zucker Diabetic Fat. I.  
Zapata Sudo, Gisele, orient. II. Takashi Sudo,  
Roberto, coorient. III. Título.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE UM NOVO CANDIDATO A  
FÁRMACO NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2

Gizele Cabral Costa

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

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

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

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2019

Aprovada por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Glaucia Maria Moraes de Oliveira

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vania Maria Correa da Costa

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Zapata Sudo (orientadora)

---

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (Co-orientador)

Rio de Janeiro  
2019

A Deus, os meus pais, Luzinete e Gilberto, meus irmãos, Rodrigo e Ricardo, e à toda  
minha família e amigos pelo apoio e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Zapata Sudo e Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo por terem me acompanhado desde a minha iniciação científica até o mestrado. Graças a eles pude crescer pessoalmente e profissionalmente. Sou eternamente grata!

A Prof<sup>a</sup> Dra Margarete Trachez por ter me recebido no laboratório e ter me apresentado aos meus orientadores.

Ao meu tutor e amigo, Allan Kardec por ter me ensinado tanto durante esses 4 anos de laboratório, pelos conselhos profissionais e pessoais, por ter revisado a minha dissertação e ter me ajudado no artigo. Você realmente é uma pessoa iluminada e merece todo o sucesso do mundo!

Aos meus colegas dos Laboratórios de Farmacologia do Acoplamento Excitação-Contração Muscular e de Farmacologia Cardiovascular pelo apoio e troca de experiências durante esta jornada.

Aos membros do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), especialmente a Prof<sup>a</sup>. Lidia Lima, por ter gentilmente cedido a substância utilizada neste trabalho. E ao Dr. Eduardo Reina, por ter sintetizado a substância.

Aos amigos queridos que eu tive o prazer de conhecer e vou sempre lembrar com muito carinho Ananssa Silva, Bryelle Eccard, Bismarck Rezende, Guilherme Monteiro, Josenildo Segundo, Grazielle Fernandes. Obrigada por toda experiencia, pelos almoços, risadas, apoio, por me acompanharem nos experimentos até tarde e aos finais de semana. Vocês tornaram a minha iniciação científica e mestrado mais leves. Amo vocês!

Aos membros da banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaucia Maria Moraes de Oliveira , Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Maria Correa da Costa.

Ao CNPQ, FAPERJ, CAPES, INCT/INOFAR, CRISTÁLIA pelo apoio financeiro.

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE UM NOVO CANDIDATO A FÁRMACO NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Gizele Cabral Costa

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Gizele Zapata-Sudo  
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Cardiologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Cardiologia.

**Introdução:** O presente trabalho investigou o efeito farmacológico de um novo inibidor da enzima dipeptidil dipeptidase 4 com ação hipoglicemiante e anti-inflamatória, na disfunção cardíaca em modelo animal de DM2. **Metodologia:** Foram utilizados ratos Zucker Lean (ZL), e Zucker Diabetic Fat (ZDF) com 24 a 32 semanas de idade. Foram divididos em 3 grupos: ZL + DMSO (100 µmol/kg v.i.p); ZDF + DMSO (100 µmol/kg v.i.p) e ZDF + LASSBio-2090 (100 µmol/kg v.i.p). Receberam tratamento por 14 dias consecutivos. **Resultados:** Após o tratamento com LASSBio-2090 foi observado uma melhora no perfil metabólico através da análise da glicemia em jejum (mg/dL) e insulina sérica (ng/mL) nos animais diabéticos. Além disso, houve uma melhora do quadro de dislipidemia através da redução dos níveis de colesterol total (mg/dL) e triglicerídeos (mg/dL). A averiguação do perfil cardiovascular, se deu por meio de análises ecocardiográficas, hemodinâmica invasiva e reatividade vascular. Onde nos dados ecocardiográficos foi notado uma melhora da hipertrofia do VE nos ZDF + LASSBio-2090, através da redução da espessura relativa da parede do VE (mm). Assim como a melhora da disfunção sistólica e diastólica presente nesses animais. Por meio do teste de hemodinâmica invasiva, foi possível analisar a pressão arterial, onde foi constatado um quadro de hipertensão arterial nos animais diabéticos, com uma melhora após o tratamento com LASSBio-2090. Ademais, por meio da análise da pressão intraventricular esquerda dos animais, foi confirmado a melhora do quadro de disfunção sistólica e diastólica após o tratamento com LASSBio-2090. O LASSBio-2090 normalizou o relaxamento vascular induzido por ACh

sugerindo recuperação da lesão endotelial nos animais diabéticos. Aumento no depósito de colágeno e células intersticiais foi observado no VE dos animais ZDF + DMSO, comparado aos animais ZL + DMSO ( $p < 0,05$ ), sendo reduzido após tratamento com LASSBio-2090. A maior expressão de TNF- $\alpha$ , RAGE, iNOS e c-Fos foi detectada em corações do grupo ZDF + DMSO e recuperada com LASSBio-2090 ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** O LASSBio-2090 melhorou a função metabólica, cardiovascular e o perfil inflamatório dos animais com DM2, representando uma possível estratégia terapêutica no tratamento da progressão de DC.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus tipo 2, iDPP-4, cardiomiopatia diabética, zucker diabetic fat.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF A NEW CANDIDATE TO DRUG IN CARDIAC DYSFUNCTION IN DIABETES MELLITUS TYPE 2 ANIMAL MODEL

Gizele Cabral Costa

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.

Gisele Zapata-Sudo

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Summary of the master's dissertation submitted to the Postgraduate Program in Cardiology of the Department of Medical Clinics of the Faculty of Medicine and the Edson Saad Heart Institute of the Federal University of Rio de Janeiro as part of the requirements for obtaining the title of Master in Cardiology.

**Introduction:** The present work investigated the pharmacological effect of a new inhibitor of dipeptidyl dipeptidase 4 enzyme with hypoglycemic and anti-inflammatory action on cardiac dysfunction in an animal model of T2DM. **Method:** Zucker Lean (ZL) and Zucker Diabetic Fat (ZDF) rats were used at 24 to 32 weeks of age. They were divided into 3 groups: ZL + DMSO (100  $\mu$ mol / kg v i.p); ZDF + DMSO (100  $\mu$ mol / kg v.i.p) and ZDF + LASSBio-2090 (100  $\mu$ mol / kg v.i.p). They received treatment for 14 consecutive days. **Results:** After treatment with LASSBio-2090, an improvement in metabolic profile was observed by fasting glucose analysis (mg / dL) and serum insulin (ng / mL) in diabetic animals. In addition, there was an improvement in dyslipidemia by reducing total cholesterol (mg / dL) and triglyceride (mg / dL) levels. The cardiovascular profile was investigated by means of echocardiographic analysis, invasive hemodynamics and vascular reactivity. Where echocardiographic data showed an improvement in LV hypertrophy in ZDF + LASSBio-2090 by reducing the relative LV wall thickness (mm). As well as the improvement of systolic and diastolic dysfunction present in these animals. Through the invasive hemodynamic test, it was possible to analyze blood pressure, which showed a picture of hypertension in diabetic animals, with an improvement after LASSBio-2090 treatment. Moreover, by analyzing the left intraventricular pressure of the animals, the improvement of the

systolic and diastolic dysfunction after treatment with LASSBio-2090 was confirmed. LASSBio-2090 normalized ACh-induced vascular relaxation suggesting endothelial lesion recovery in diabetic animals. Increased collagen deposition and interstitial cells were observed in LV of ZDF + DMSO animals compared to ZL + DMSO animals ( $p < 0.05$ ), being reduced after treatment with LASSBio-2090. The highest expression of TNF- $\alpha$ , RAGE, iNOS and c-Fos was detected in hearts of the ZDF + DMSO group and recovered with LASSBio-2090 ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** LASSBio-2090 improved the metabolic, cardiovascular and inflammatory profile of DM2 animals, representing a possible therapeutic strategy in the treatment of the progression of CD.

**Key words:** Diabetes mellitus type 2, iDPP-4, diabetic cardiomyopathy, zucker diabetic fat.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos fisiopatológicos da cardiomiopatia diabética. ....	23
<b>Figura 2.</b> Mecanismos moleculares implicados no desenvolvimento da cardiomiopatia diabética.....	25
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação dos hormônios incretinomiméticos .....	28
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos inibidores reversíveis de DPP4 e do LASSBio-2090 .....	30
<b>Figura 5.</b> Estudo de Ancoragem entre a sitagliptina e o LASSBio- 2090. ....	31
<b>Figura 6.</b> Modelo Zucker Diabetic Fat.....	37
<b>Figura 7.</b> Desenho experimental.....	38
<b>Figura 8.</b> Espessura da parede do VE após 14 dias de tratamento com LASSBio - 2090.....	47
<b>Figura 9.</b> Função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090 .....	48
<b>Figura 10.</b> Medidas de pressão arterial 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090.....	49
<b>Figura 11.</b> Medidas de pressão ventricular esquerda 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090. ....	50
<b>Figura 12.</b> Medida de relaxamento máximo induzido por ACh em anéis de aorta 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090.....	51
<b>Figura 13.</b> Análise histológica do ventrículo esquerdo após 14 dias de tratamento com LASSBio-2090. ....	52
<b>Figura 14.</b> Análise da expressão de proteínas em tecido cardíaco após 14 dias de tratamento com LASSBio-2090. ....	53

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Perfil metabólico dos grupos experimentais antes do tratamento de 14 dias com LASSBio 2090.....	44
<b>Tabela 2.</b> Perfil metabólico dos grupos experimentais após o tratamento de 14 dias com LASSBio 2090.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- dP/dt – Variação da velocidade de relaxamento

+ dP/dt – Variação da velocidade de contração

ACh – Acetilcolina, do inglês *achetilcoline*

AG – Ácidos graxos

AGEs – Produtos final de glicação avançada, do inglês *advanced glycosylation end products*

AKT – Proteína cinase B, do inglês *protein kinase B*

CD – Cardiomiopatia diabética

cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina, do inglês *cyclic guanosine monophosphate*

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPP4 – Dipeptidil peptidase, do inglês

E/e' – Pressão de enchimento do VE

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EPM – Erro padrão da média

ERK ½ - Quinase regulada por sinal extracelular

EROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

GAPDH – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GIP – Peptídeo inibidor gástrico 1,

GLP 1 – Peptídeo semelhante a glucagon 1

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

HDL – Lipoproteína de alta densidade, do inglês *high-density lipoprotein*

HE – Hematoxilina eosina

I.P – Intraperitoneal

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IRS – Substrato do receptor de insulina 1

JAK – Janus cinase

LASSBio – Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos, do inglês *mitogen activated protein kinase*

MEC – Matrix extracelular

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NAH – N acilhidrazona

NO – Óxido nítrico

O-GlcNAc - *O-linked N-acetylglucosamine*

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Tampão fosfato salino

PDFVE – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

Phe – Fenilefrina, do inglês *phenylefrine*

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase, do inglês *phosphatidylinositol 3 kinase*

PKA – Proteína quinas A

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPAR- $\alpha$  – Receptor ativado proliferador de peroxisoma, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$*

PSR – Picrosirus vermelho, do inglês *picrosirus red*

PSVE – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

RAGE – Receptor dos produtos finais de glicação avançada

S6K1 – Serina cinase 1

SDS/PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

Ser – Serina quinase

SGLT2 – Inibidores do cotransportador de sódio/glicose 2

SM – Síndrome metabólica

SRAA – Sistema renina angiotensina aldosterona

TGF  $\beta$  – Fator transformador de crescimento  $\beta$ , do inglês *transforming growth factor beta*

TNF  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor*

TRIS/HCL – Trisaminometano hidrocloreto

VE – Ventrículo esquerdo

ZDF – *Zucker Diabetic Fat*

ZL – *Zucker lean*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 DIABETES MELLITUS .....	19
1.2 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA .....	20
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGIA DA CD .....	21
1.4 FATORES DE RISCO E ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS QUE CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO DA CD .....	21
1.5 TRATAMENTO DA DM2 E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS .....	26
1.5.1 Inibidor da DPP4. ....	28
1.5.2 Planejamento da síntese de um novo inibidor da DPP4 .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivo geral .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	36
4.1 LOCAL DE PESQUISA .....	37
4.2 COMITÊ DE ÉTICA .....	37
4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DM2.....	37
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	38
4.5 PERFIL METABÓLICO .....	39
4.6 PERFIL CARDIOVASCULAR.....	39
4.6.1 Ecocardiografia transtorácica .....	39
4.6.2 Medida invasiva parâmetros hemodinâmicos.....	40
4.6.3 Reatividade vascular .....	40
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	41
4.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	41
4.8.1 Preparação do homogenato de tecido cardíaco.....	41
4.8.2 Imunodeteção de proteínas .....	41
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	43
5.1 PERFIL METABÓLICO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	44

5.2 MELHORA DA HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090 .....	46
5.3 MELHORA DA DISFUNÇÃO SISTÓLICA E DIASTÓLICA VENTRICULAR ESQUERDA APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090 .....	47
5.4 MELHORA DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090.....	49
5.5 MELHORA DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090 .....	50
5.6 MELHORA DO REMODELAMENTO E FIBROSE CARDÍACA APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090.....	51
5.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO CARDÍACO .....	52
6. DISCUSSÃO .....	54
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	63



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (CHO et al, 2018), cerca de 378 milhões de pessoas da população mundial com idade entre 20 a 64 anos apresentam Diabetes mellitus (DM), com estimativa de incremento para 438 milhões em 2045. Atualmente, no Brasil, 14,3 milhões de pessoas tem o diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), com previsão de alcançar 23,2 milhões em 2040. Os gastos na saúde com o DM geram em torno de US\$ 21,8 bilhões (CHO et al, 2018; DIRETRIZES-SBD, 2018).

DM é uma doença caracterizada por uma combinação de distúrbios metabólicos que têm em comum a hiperglicemia, devido a uma desregulação na produção/liberação ou ação da insulina (BAENA-DIEZ et al, 2016). A hiperglicemia crônica provoca o surgimento de sintomas, tais como, poliúria, polidipsia, perda de peso e, em alguns casos, polifagia e visão turva. A classificação do DM é baseada na etiologia e na apresentação clínica, sendo Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), DM2 e gestacional (AMERICAN DIABETES, 2019).

O DM1 acomete 5 a 10% dos pacientes com diagnóstico de DM, sendo mais frequente em crianças e adolescentes e é caracterizado pela destruição autoimune das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Como resultado, há deficiência relativa ou absoluta de insulina, o que leva à necessidade de injeções diárias de insulina exógena, a fim de manter os níveis de glicose estáveis (AMERICAN DIABETES, 2019).

Cerca de 90% das pessoas com diabetes têm o tipo 2, atingindo indivíduos obesos, com idade em torno de 40 anos de idade, que apresentam síndrome metabólica (CHO et al, 2018). A síndrome metabólica está diretamente associada com a obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL), fatores que podem ocasionar comorbidades, a exemplo de doenças cardiovasculares (KAHN et al, 2016).

No caso do DM gestacional, que acomete mulheres entre as 24<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas de gravidez, os hormônios maternos sofrem uma série de adaptações para permitir o desenvolvimento do bebê. A placenta se torna um mediador importante para as ações de diversos hormônios, tais como o hormônio lactogênio placentário, responsável por promover um efeito antagonista à ação da insulina, que é

responsável pela captação e utilização de glicose em diversos tecidos. Conseqüentemente, o pâncreas materno aumenta a produção de insulina, com o objetivo de compensar o quadro de resistência à mesma. Entretanto, esse processo não ocorre em algumas gestantes, estimulando, assim, o aumento dos níveis de glicose plasmática e, conseqüentemente, configurando o quadro clínico de diabetes gestacional (GUARIGUATA et al, 2014; HOD et al, 2015).

As doenças cardiovasculares, incluindo doença arterial periférica, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial sistêmica e a cardiomiopatia diabética (CD) são as principais complicações que levam aos altos índices de morbidade e mortalidade em indivíduos com DM (LEON e MADDOX, 2015). Os pacientes com DM apresentam risco 3 a 4 vezes maior de sofrerem algum episódio cardiovascular e o dobro do risco de terem morte súbita, quando comparados aos indivíduos sem essa doença. Alguns fatores, como, hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, obesidade e um estado inflamatório crônico, favorecem o surgimento de doenças cardiovasculares induzidas pelo DM (LEON e MADDOX, 2015).

## 1.2 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA

A CD é definida pela existência de função e estrutura anormais do coração, (ANEJA et al, 2008). Os primeiros relatos abordando a vertente clínica da CD foram publicados em 1972, por pesquisadores que mostraram observações em autópsias de quatro pacientes portadores de microangiopatia renal diabética e dilatação ventricular esquerda, na ausência de causas comuns (RUBLER et al, 1972). Em 2013, o *American College of Cardiology*, a *American Heart Association* (YANCY et al, 2013) e a *European Society of Cardiology*, em colaboração com a Sociedade Europeia para o Estudo do Diabetes (AUTHORS/TASK FORCE et al, 2013) definiram a CD como uma condição clínica na qual a disfunção ventricular ocorre, em pacientes portadores de DM. Durante os seus estágios iniciais, a CD inclui um período subclínico caracterizado por anormalidades estruturais e funcionais, como hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), fibrose miocárdial, além de anormalidades na sinalização intracelular dos cardiomiócitos. Essas mudanças fisiopatológicas estão intrinsecamente relacionadas à fibrose e enrijecimento do músculo cardíaco, fenômenos que indu-

zem disfunção diastólica e frequentemente evoluem para insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada, todavia com alguns casos que também apresentam evolução para disfunção sistólica e subsequente insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (JIA et al, 2018).

### 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGIA DA CD

Estudo clínicos recentes mostram que a prevalência da insuficiência cardíaca em pacientes diabéticos varia de 19% a 26% (SHINDLER et al, 1996; RYDEN et al, 2000; THRAINSDOTTIR et al, 2005). O *Framingham Heart Study* demonstrou que a incidência de insuficiência cardíaca foi maior em pacientes diabéticos de ambos os gêneros, quando comparado com indivíduos da mesma idade, não portadores de DM (YANCY et al, 2013). Adicionalmente, foi relatado que no DM1, cada 1% de aumento nos níveis plasmáticos de hemoglobina glicada A1c estaria ligado a 30% de aumento no risco de desenvolver insuficiência cardíaca (LIND et al, 2011), enquanto que, em pacientes portadores de DM2, a cada 1% de aumento nos níveis de hemoglobina glicada A1c esse risco aumentaria 8% (STRATTON et al, 2000), evidências essas que sugerem um papel significativo do aumento gradativo na glicemia, como um importante fator preditivo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em pacientes diabéticos.

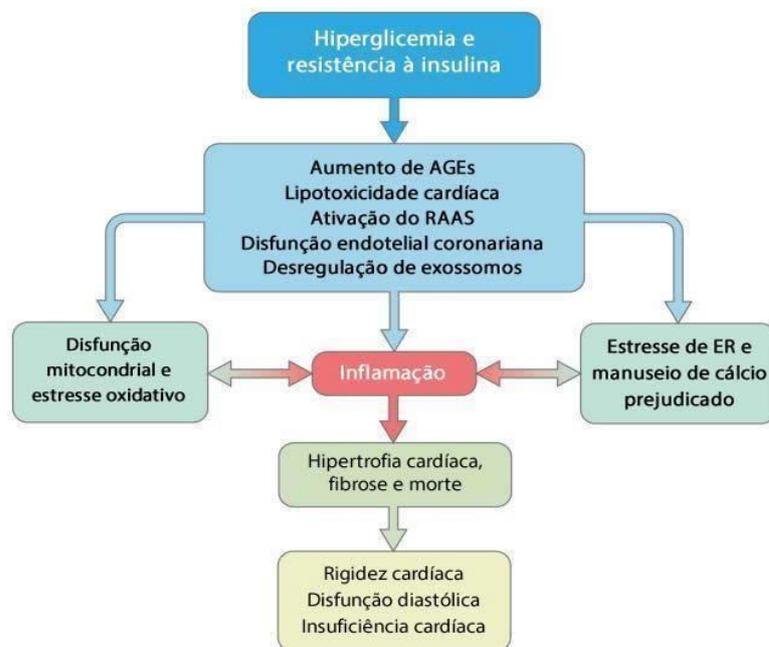
### 1.4 FATORES DE RISCO E ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS QUE CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO DA CD

A hiperglicemia, resistência sistêmica à insulina, além da sinalização metabólica dependente desse hormônio pancreático, comprometida, nas células cardíacas, são atualmente considerados como as principais anormalidades clínicas no DM e todos esses eventos estão envolvidos na patogênese da CD (JIA et al, 2016). Existe uma relação linear entre os níveis plasmáticos de glicose e a mortalidade em longo prazo na insuficiência cardíaca, mesmo em pacientes sem diagnóstico de DM. No entanto, o aumento do risco de mortalidade, fato comprovado em estudo clínico, foi visto apenas em diabéticos com glicose acima de 200 mg/dL (ITZHAKI BEN ZADOK et al, 2017). Adicionalmente, dados da literatura demonstraram que uma redução de

1% nos níveis plasmáticos de hemoglobina glicada A1c foi associada com uma diminuição no risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em 16% (STRATTON et al, 2000), sugerindo que há uma relação importante entre o controle em longo-prazo dos níveis glicêmicos e a redução do risco para o desenvolvimento e progressão da CD.

Numa vertente fisiopatológica molecular, é importante comentar que diversos distúrbios metabólicos oriundos, principalmente, da responsividade reduzida dos receptores de insulina nas células cardíacas e, conseqüentemente, da captação celular comprometida de glicose induzem mudanças deletérias no coração, como, por exemplo, autofagia desregulada dos cardiomiócitos, ativação exacerbada do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), além de estresse oxidativo e repostas imunológicas que contribuem para o remodelamento, fibrose substancial, enrijecimento e hipertrofia do miocárdio (FANG, et al, 2004; ADEGHATE e SINGH, 2014).

Achados recentes também mostram que uma dieta rica em gorduras e carboidratos de alto índice glicêmico induzem uma desregulação cardíaca no metabolismo dependente da insulina, inflamação, estresse oxidativo, disfunção endotelial responsável pela diminuição na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), além do aumento anormal de tecido conectivo e fibrose (JIA et al, 2015). Essas alterações resultam em disfunção diastólica, caracterizada por enchimento ventricular lento e sob altas pressões (JIA et al, 2015). Durante estágios avançados da CD, as alterações na estrutura cardíaca são mais evidentes e pronunciadas, incluindo necrose de cardiomiócitos, acúmulo adicional de colágeno, fibrose intersticial, esclerose de pequenos vasos coronarianos e microaneurismas capilares (WANG et al, 2006; MYTAS et al, 2009). Essas alterações mais avançadas podem desencadear, além da disfunção diastólica, o comprometimento da função sistólica cardíaca (JIA et al, 2018). A figura 1 representa a sinalização metabólica alterada no coração, anormalidades cruciais associadas com a fisiopatologia da CD.

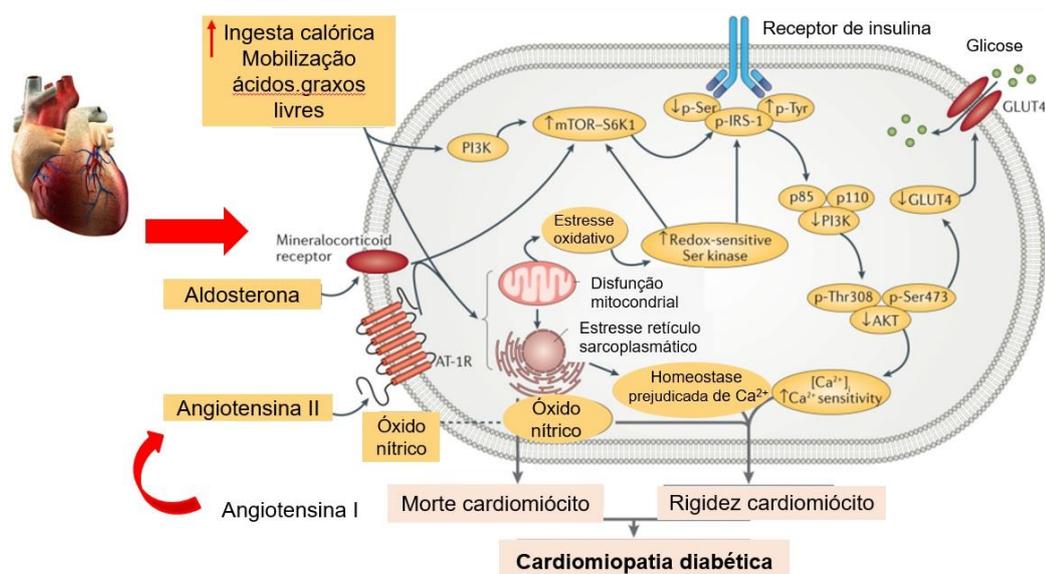


**Figura 1:** Mecanismos fisiopatológicos da cardiomiopatia diabética (Adaptado de JIA et al, 2018). A hiperglicemia e a resistência à insulina induzem aumentos de AGEs, lipotoxicidade cardíaca, ativação do SRAA, disfunção endotelial coronariana e desregulação de exossomos, que, por sua vez, resultam em disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, estresse de ER e comprometimento da homeostase de cálcio. Essas anormalidades fisiopatológicas estão associadas à hipertrofia cardíaca, fibrose, morte, rigidez, disfunção diastólica e insuficiência cardíaca. AGEs, produtos finais de glicação avançada; SRAA, sistema renina angiotensina aldosterona; ER, retículo endoplasmático.

Outro mecanismo fisiopatológico envolvido na sinalização comprometida da insulina é o da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR)-S6 cinase (S6k1) (JIA et al, 2016). Essa via de sinalização atua significativamente como um sensor de nutrientes altamente conservado e modula a função metabólica da insulina, através da fosforilação aumentada da S6k1, uma serina-cinase evolutivamente conservada (JIA et al, 2016). Há evidências que a S6K1 pode ser cronicamente ativada pela ingestão excessiva de nutrientes, gerando ativação inapropriada do SRAA (KIM et al, 2012), fenômenos que auxiliam no desenvolvimento da resistência à insulina nas células do coração, tecido adiposo, fígado e músculo esquelético, através da fosforilação aumentada dos resíduos de serina de uma molécula pertencente à família de substratos do receptor da insulina, a proteína (IRS-1). Essa hiperfosforilação da IRS-1 compromete a ativação das proteínas fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e da cinase B (Akt) (JIA et al, 2015; JIA et al, 2016). Sob condições fisiológicas normais,

nos cardiomiócitos, a sinalização das cinases PI3K/Akt estimula a migração do transportador de glicose (GLUT4), armazenado em vesículas citosólicas, para a membrana plasmática, resultando na captação de glicose pelos miócitos cardíacos (JIA et al, 2016). Assim, a redução da captação de glicose consequente à sinalização desregulada da via PI3K/Akt promove uma subsequente sinalização anormal do  $Ca^{2+}$  intracelular, ou seja, um aumento fisiopatológico desse íon no interior dos cardiomiócitos (JIA et al, 2016). Adicionalmente, o comprometimento da sinalização metabólica da insulina no coração inibe a atividade da óxido nítrico sintase endotelial coronariana (eNOS) e do produto de sua atividade catalítica, ou seja, do óxido nítrico, o que potencializa ainda mais o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular e a sensibilização a esse íon nos cardiomiócitos (JIA et al, 2016). Essas anormalidades causam enrijecimento cardíaco e disfunção diastólica (KIM et al, 2012) (figura 2).

Além disso, a hiperglicemia crônica e glicotoxicidade promovem aumento na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs), os quais são produzidos a partir da glicosilação não enzimática de lipídios, lipoproteínas e aminoácidos (JIA et al, 2018). A deposição miocárdial desses produtos de glicação contribui para a alteração de matriz extracelular, deposição de colágeno, enrijecimento do músculo cardíaco, comprometendo, assim o lusitropismo e, conseqüentemente, a diástole (JIA et al, 2016). Um exemplo a ser citado é o de que elevados níveis plasmáticos de AGEs estão associados com o prolongamento do tempo de relaxamento do VE durante o estágio inicial da insuficiência cardíaca em indivíduos diabéticos (VAN HEEREBEEK et al, 2008). De fato, a participação de AGEs como promotores de modificações nas propriedades da matriz extracelular, através do aumento na resistência de tecidos conectivos à proteólise enzimática é uma das principais causas da redução na complacência cardíaca, fibrose e disfunção diastólica do VE em corações de pacientes diabéticos (LAZO et al, 2015). Os AGEs produzem seus efeitos deletérios ao ativarem seu receptor (RAGE), estimulando, assim, a transcrição gênica anormal, processo que leva ao aumento de proteínas na matriz extracelular, mecanismos que também envolvem a participação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e Janus cinases (JAK) nos tecidos cardíaco e vascular (JIA et al, 2016). Além disso, AGEs também estão envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais potencializam o processo inflamatório e fibrose cardíacos (JIA et al, 2016).



**Figura 2:** Mecanismos moleculares implicados no desenvolvimento da cardiomiopatia diabética (Adaptado de JIA et al, 2016). Fatores como dieta rica em carboidratos, aumento da mobilização de ácidos graxos livres (AG) e ativação do sistema renina angiotensina aldosterona podem causar disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo. Resultando o comprometimento da sinalização da insulina, anormalidade na manipulação de  $Ca^{2+}$ , aumento da sensibilização intracelular de  $Ca^{2+}$  intracelular e morte dos cardiomiócitos. Os pacientes eventualmente desenvolvem rigidez dos cardiomiócitos e cardiomiopatia diabética.  $Ca^{2+}$ ,  $i$ , influxo de  $Ca^{2+}$ ; IRS-1, substrato do receptor de insulina 1; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR); P, fosforilação; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; Redox, estado de oxidação-redução; S6K1, S6 cinase 1; Ser, serina; Thr, treonina; Tyr, tirosina.

O metabolismo lipídico anormal frequentemente acentua a progressão da CD. Níveis plasmáticos aumentados de triglicerídeos ocasiona o aumento da distribuição de AG para os cardiomiócitos e, assim, aumenta o processo de  $\beta$ -oxidação, comprometendo a sinalização metabólica da insulina nos corações de pacientes diabéticos (JIA et al, 2018). Adicionalmente, a expressão de transportadores de AG, a exemplo do CD36, é aumentada durante o processo de progressão da CD (LEE et al, 2017). Esse transportador CD36 é envolvido na captação de AG e está presente na membrana plasmática e em membranas de organelas intracelulares (LEE et al, 2017). Em corações de indivíduos diabéticos ocorre aumento da expressão do CD36 (JIA et al, 2016; LEE et al, 2017). Além disso, no DM2, os corações frequentemente apresentam expressão aumentada do *peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$*

(PPAR- $\alpha$ ), este que é associado com o aumento da captação de AG, acúmulo de triglicerídeos e redução na utilização da glicose (FINCK et al, 2002).

Em virtude dos fatos mencionados, entende-se que a disfunção cardíaca em pacientes diabéticos pode progredir de anormalidades cardíacas subclínicas, tais como fibrose do VE, para disfunção diastólica e, eventualmente, disfunção sistólica, acompanhada por uma redução da fração de ejeção. Inúmeras técnicas não-invasivas, incluindo ecocardiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética são, atualmente, utilizadas para detectar modificações na estrutura e função cardíacas de pacientes diabéticos (JIA et al, 2016). Adicionalmente, níveis plasmáticos aumentados de peptídeos natriuréticos, *O-linked N-acetylglucosamine* (O-GlcNAc), entre outros, servem como marcadores para o diagnóstico da CD e insuficiência cardíaca (JIA et al, 2016).

## 1.5 TRATAMENTO DA DM2 E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

O tratamento da DM2 consiste na normalização da glicemia nos pacientes (jejum < 100 mg/dL e pós-prandial < 140 mg/dL), utilizando-se as principais classes de hipoglicemiantes orais presentes no mercado: biguanidas, sulfoniluréias, glinidas (ou meglitinidas), tiazolidinediona (ou glitazona), inibidores da  $\alpha$ -glicosidase, inibidores do cotransportador de sódio/glicose 2 (SGLT2), incretinomiméticos e inibidor dipeptidil peptidase-4 (DDP4) (DIRETRIZES-SBD, 2018).

A classe de fármacos mais utilizada como monoterapia inclui as biguanidas, que são indicadas como tratamento de primeira linha em pacientes com DM2. A metformina é um exemplo dessa classe, que diminui a produção hepática de glicose, além de discreta ação sensibilizadora periférica. Apesar de ser amplamente utilizada clinicamente, é contraindicada em pacientes com quadro de insuficiência renal, podendo levar a deficiência de vitamina B12 após uso prolongado (SJOSTROM et al, 2004; MULHERIN et al, 2011; WRIGHT e TYLEE, 2016).

As sulfoniluréias, utilizadas como segunda linha no tratamento de DM2, tem como principal medicamento a glibenclamida, que promove o aumento da secreção pancreática de insulina prolongando assim o tempo de ação hipoglicemiante. A principal desvantagem do seu uso, é o ganho de peso ponderal e a hipoglicemia. (BUCHWALD, 1964; BUCHWALD et al, 1990; SINGH, 2014).

Assim como as sulfoniluréias, as glinidas também são secretagogas de insulina. A nateglinida e repaglinida são os medicamentos que compõem essa classe, que pelo fato de necessitar de mais de uma administração diária não tem completa aderência dos pacientes (BUCHWALD, 1964; BUCHWALD et al, 1990, HORNICK e ARON, 2008; DIRETRIZES-SBD, 2015).

As tiazolidinedionas tem ação sensibilizadora de insulina e atuam aumentando a captação de glicose no músculo esquelético, tecido adiposo e no fígado. Os principais medicamentos dessa classe são: pioglitazona, rosiglitazona e troglitazone. Os efeitos adversos são ganho de peso, retenção hídrica, aumento do risco de insuficiência cardíaca e fraturas. Atualmente, a rosiglitazona foi retirada do mercado na Europa e no Brasil e apresenta restrição de indicação nos Estados Unidos da América devido ao risco aumentado de doenças cardiovasculares (BUCHWALD, 1964; JARVINEN, 2004; HORNICK e ARON, 2008; NG et al, 2013).

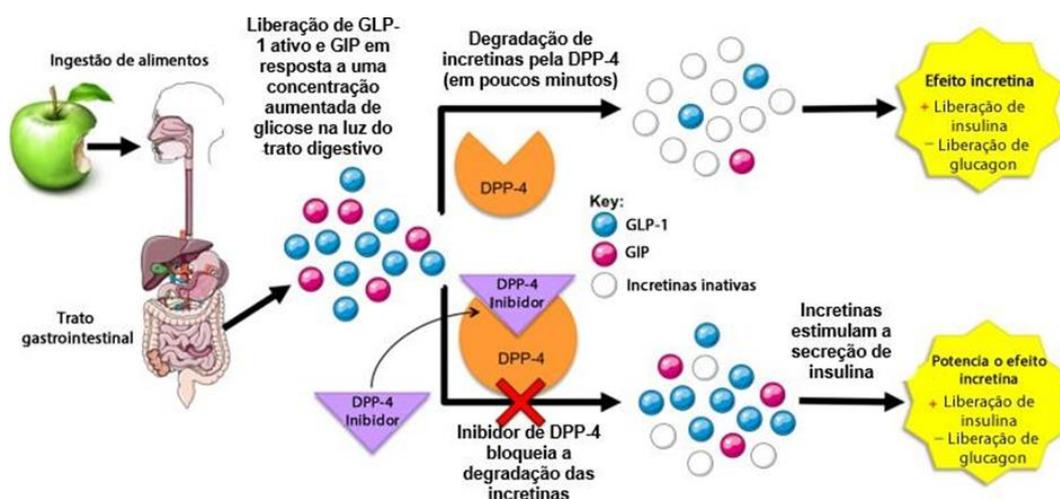
A  $\alpha$  glicosidase é uma enzima presente na mucosa intestinal, e atua reduzindo a velocidade de absorção da glicose no intestino, logo os inibidores desta enzima (acarbose, voglibose e miglitol) são extremamente eficazes na hiperglicemia pós-prandial. Os pacientes podem apresentar efeitos adversos gastrointestinais, como diarreia, flatulência e distensão abdominal (BUCHWALD, 1964; HORNICK e ARON, 2008; CHIASSON et al, 2003; KAWAMORI et al, 2009; MALTA et al, 2012).

Uma nova classe de fármacos foi disponibilizada para uso clínico como os inibidores de SGLT2, canagliflozina, dapagliflozina, empagliflozina e ertugliflozina. Eles atuam impedindo a reabsorção de glicose através da inibição das proteínas SGLT2 presentes nos túbulos proximais dos rins. Com isso, promove um quadro de glicosúria e menor chance de risco de hipoglicemia. Essa classe de medicamentos é contraindicada em pacientes com insuficiência renal e podem provocar uma propensão maior a infecções genitais e de trato urinário (SJOSTROM et al, 2004; NORRIS et al, 2005; LIPSCOMBE e HUX, 2007)

Novas abordagens terapêuticas são desenvolvidas para o tratamento de DM2, devido à ausência de terapêutica atual que evite a evolução da doença e consequentemente o surgimento de complicações crônicas. Além disso, existe a busca de novos medicamentos com menor custo, reações adversas e contraindicações.

### 1.5.1 Inibidor da DPP4

As incretinas são hormônios gastrointestinais, importantes na homeostasia da glicose. Existem dois tipos de incretinas: peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1), que é sintetizado pelas células L presentes no íleo e no cólon e o peptídeo inibidor gástrico 1 (GIP), que é sintetizado pelas células K localizadas no duodeno e na primeira porção do jejuno (JORSALI et al, 2017). Após a ingestão de nutrientes, ocorre a liberação de GLP-1 e GIP na luz do trato digestivo em resposta à concentração aumentada dos níveis de glicose plasmática. Devido a isso, GLP-1 e GIP promovem o aumento da secreção de insulina, e impedem a liberação de glucagon pelas células  $\alpha$  pancreáticas em condições de hiperglicemia. No entanto, a meia-vida desses hormônios dura cerca de 1 a 2 minutos devido a imediata degradação via ação da enzima DPP4. Entretanto, a inibição da ação de DPP4 prolonga a meia-vida de GLP-1 e GIP, aumentando assim a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, e consequentemente aumento da captação de glicose nos tecidos (figura 3) (WETTERGREN et al, 1993; NAUCK et al, 1997; SONNE et al, 2014). Tanto os incretinomiméticos, quanto os inibidores de DPP4 são responsáveis pela liberação de insulina, redução da velocidade de esvaziamento gástrico e inibição da secreção de glucagon (SOLUN et al, 2013; WRIGHT e TYLEE, 2016).



**Figura 3:** Mecanismo de ação dos hormônios incretinomiméticos (Adaptado de SARAIVA e SPOSITO, 2014).

O GLP-1 exerce as suas ações através do seu receptor GLP1R, que está expresso em numerosos tecidos, incluindo pâncreas (promovendo o aumento da se-

creção dos hormônios de insulina e somastatina), estômago (diminuindo o esvaziamento gástrico e a secreção ácida), intestino (diminuindo a motilidade e a secreção de lipoproteínas), fígado (diminuindo a esteatose e a secreção de glicose), tecido adiposo (aumentando a perfusão, lipólise e absorção de glicose), músculo esquelético (aumentando a perfusão e absorção de glicose), rins ( aumento da diurese e natriurese), cérebro (diminuindo a ingestão de alimentos, água, aumento da neuroproteção e neurogênese), e por fim, no coração e vasos (aumentando a utilização de glicose, cardioproteção, débito cardíaco, vasodilatação e diminuição do metabolismo de ácidos graxos) (SARAIVA e SPOSITO, 2014).

Os inibidores de DPP4 presentes no mercado apresentam diversas vantagens como aumento da massa de células  $\beta$ , maior segurança e tolerabilidade, efeito neutro no peso corporal e raros casos de hipoglicemia. Em contrapartida, podem causar angioedema, urticária e possibilidade de pancreatite aguda. A contraindicação é apenas para pacientes com hipersensibilidade aos componentes do medicamento (DIRETRIZES-SBD,2018).

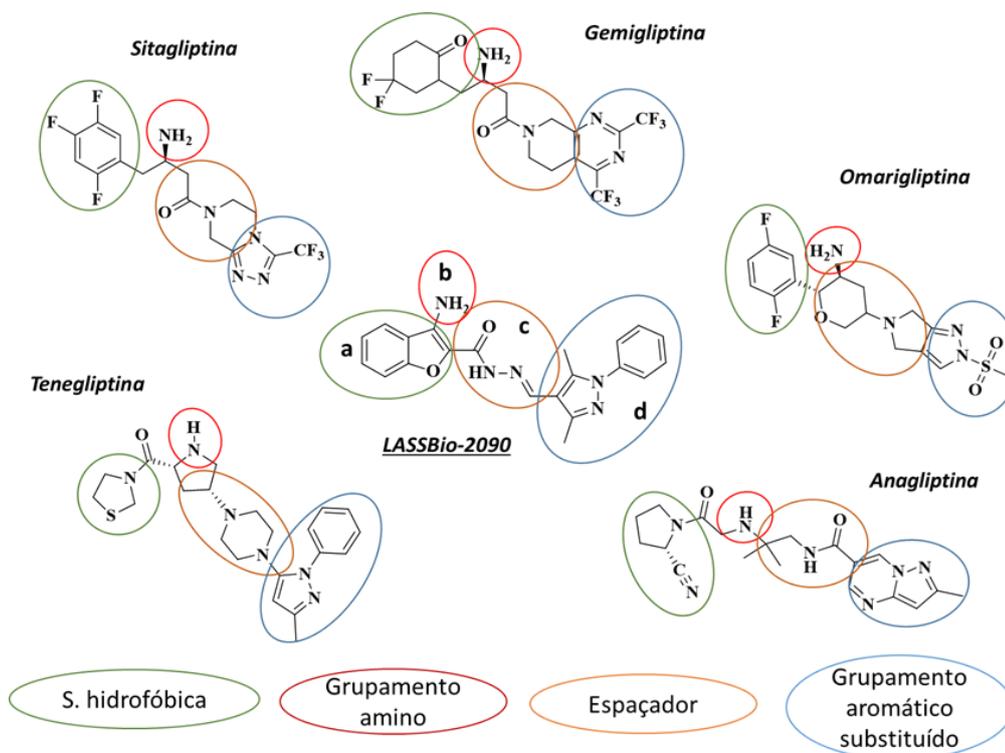
Sendo assim, as propriedades fisiológicas do GLP-1 indicam ser um alvo promissor para o tratamento da DM2, uma vez que a inibição da liberação de glucagon mediada por GLP-1 e GIP parece ser responsável pela ação dos inibidores da DPP- 4.

#### 1.5.2 Planejamento da síntese de um novo inibidor da DPP4

Tendo em vista a busca de novas estratégias terapêuticas a fim de combater a instalação e progressão de CD associadas à DM2, o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular em colaboração com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), desenvolveram um projeto com intuito de sintetizar e avaliar os efeitos farmacológicos do LASSBio-2090. O composto LASSBio-2090 foi estruturalmente planejado considerando os requisitos estruturais necessários a inibição da enzima DPP4, presentes nas estruturas dos inibidores competitivos reversíveis de DPP4, tais como: Sitagliptina, Omarigliptina, Gemigliptina, Tenegliptina e Anagliptina (figura 4). A análise cuidadosa das estruturas destes inibidores, permitiu a identificação dos seguintes requisitos estruturais de características farmacofórica ou auxofórica: 1) subunidade hidrofóbica (em verde); 2) grupamento amina primária

ou secundária (em vermelho); 3) espaçador (em laranja); 4) e anel aromático substituído (em azul). Desta forma, o desenho molecular de LASSBio-2090, considerou a necessidade de respeitar a existência dos 4 requisitos estruturais supracitados, utilizando como espaçador a função *N*-acilidrazona (NAH). A escolha da NAH ampara-se em diversos trabalhos que relatam seu comportamento de estrutura privilegiada. De fato, esta subunidade está presente na estrutura de diversos compostos bioativos, muito dos quais providos de propriedade anti-inflamatória (ALENCAR et al, 2014; FREITAS et al, 2017; THOTAA et al, 2018).

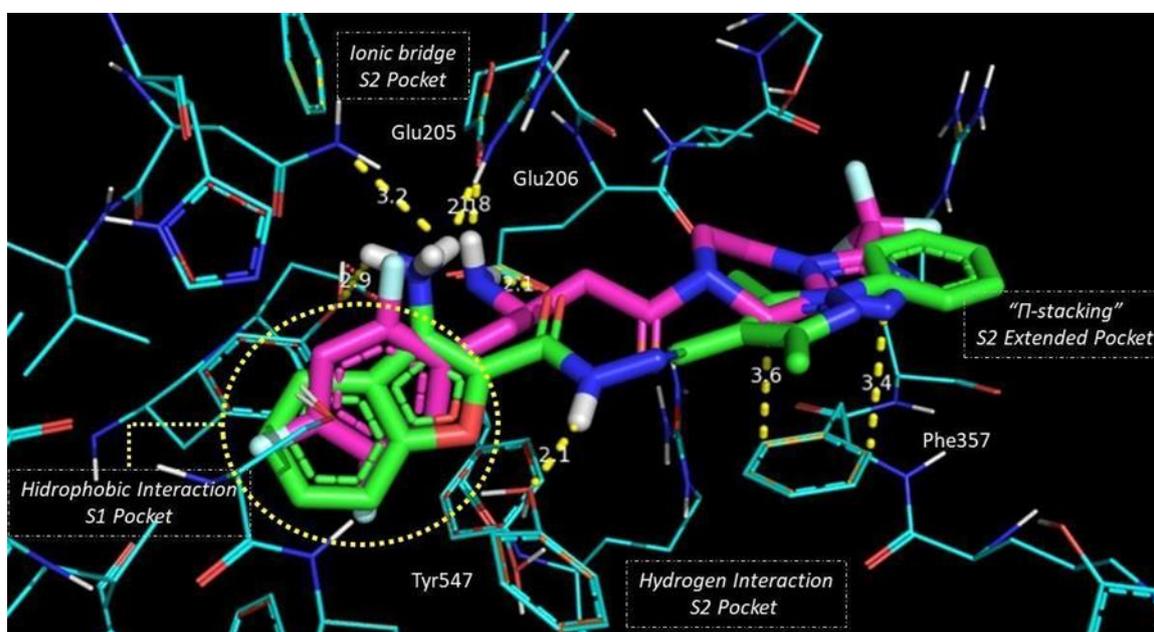
Desta maneira, para o novo inibidor de DPP4 proposto (*i.e.* LASSBio-2090) o anel benzofurano (**a**) foi proposto como subunidade hidrofóbica, a amina primária (**b**) foi adicionada na posição 3 do benzofurano, obtendo-se um derivado do tipo anilina aquiral; a *N*-acilidrazona (**c**) foi introduzida como espaçador entre os anéis aromáticos; e por fim, a anel fenil-pirazol (**d**) foi adicionado como segunda unidade hidrofóbica. A eleição desta subunidade visou obter interações hidrofóbicas mediante o anel fenílico, a fim de permitir interações adicionais com o *pocket* estendido S2 do sítio ativo da DPP4 (figura 4).



**Figura 4:** Estrutura dos inibidores reversíveis de DPP4 e do LASSBio-2090. Assinalando os requisitos estruturais comuns, necessários a atividade inibitória da DPP4, e sua relação com a estrutura de LASSBio-2090, desenhado como novo inibidor de DPP4.

O provável perfil de LASSBio-2090 em se ligar a enzima DPP4 foi investigado através da análise de acoplamento molecular em sílico. Este estudo foi realizado utilizando o software GOLD 5.1 (CCDC), e a estrutura cristalizada de DPP4 obtida de RCSB Protein Data Bank (código PDB: 1x70). Após a validação pela abordagem de ancoramento, a função de Pontuação ChemPLP (sem água) demonstrou o melhor valor desvio médio quadrático das posições atômicas, o que reproduziu a orientação da sitagliptina cristalizada no sítio ativo da DPP-4. De acordo com os dados obtidos para LASSBio-2090, observou-se uma orientação espacial semelhante a sitagliptina (Figura 6), com interações hidrofóbicas com o anel benzofurano em S1 que por sua vez interage com TYR547 através do oxigênio presente na porção do furano.

Além disso, a amina primária do LASSBio-2090 interagiu com Glu 205/206 (S2) fazendo uma ponte iônica e o anel pirazol interagiu com PHE357. Desta forma, foi demonstrado que existem ligações favoráveis do LASSBio-2090 ao DDP4, assim como a sitagliptina. Deste modo, o novo derivado-NAH ligante da enzima DPP4, é responsável por produzir a inibição como a sitagliptina e contribuir para o controle hiperglicêmico e anti-inflamatório.



**Figure 5.** Estudo de Ancoragem entre a sitagliptina e o LASSBio- 2090. A sobreposição de LASSBio- 2190 (verde) e Sitagliptina (magenta) colocada dentro do local ativo do DPP-4. Interações de ligação em amarelo. Estudos de ancoragem foram realizados com o programa GOLD 5.1. Átomos de hidrogênio apolares foram omitidos para melhorar a clareza. As imagens foram geradas com o software PyMol.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A DM2 leva o acometimento de doenças secundárias, como por exemplo, a CD. Muitos pacientes com DM apresentam diversas anormalidades desde um leve comprometimento diastólico até a manifestação de insuficiência cardíaca, e o grau de prevalência pode ser superior a 50% entre pacientes em estágios pré-clínicos e clínicos (POIRIER et al, 2001; KIENCKE et al, 2010) desencadeado pela ineficiência de insulina, hiperglicemia e dislipidemia. O CD traz danos ao miocárdio devido a hipertrofia celular, esteatose, apoptose, estresse oxidativo, inflamação, fibrose e desarranjo microtubular (BUGGER e ABEL, 2014). Apesar de alguns progressos na prevenção e tratamento de CD, principalmente por meio de estratégias de controle da pressão arterial e dislipidemia, o impacto da doença metabólica nos resultados cardiovasculares ainda é um grande desafio e persiste em proporção às epidemias de obesidade e DM. Existem abundantes evidências pré-clínicas e clínicas que implicam o eixo da inibição de DPP4 nas CD, porém o mecanismo de ação para tal benefício não se encontra elucidado.

A este respeito, esta dissertação apresenta como meta avaliar o efeito de um novo candidato a fármaco, o LASSBio-2090, um inibidor DPP4 com carácter hipoglicemiante e anti-inflamatório em modelo experimental de DM2.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos farmacológicos da substância LASSBio-2090, um inibidor de DPP4 com possível ação hipoglicemiante e anti-inflamatória em modelo animal de DM2.

### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal da substância LASSBio-2090 através da observação dos seguintes parâmetros:

- I. Perfil metabólico (análise do peso corporal, glicemia em jejum, insulina plasmática e perfil lipídico)
- II. Função cardíaca (ecocardiografia transtorácica e medida invasiva)
- III. Função vascular (reatividade vascular)
- IV. Remodelamento cardíaco (histologia)
- V. Expressão de marcadores moleculares, tais como, RAGE, c-Fos, iNOS, TNF $\alpha$  relacionados ao DM2 (western blot)

## **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 LOCAL DE PESQUISA

Este projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular sob orientação dos professores Gisele Zapata-Sudo e Roberto Takashi Sudo, em colaboração com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®). Ambos laboratórios compõem o Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, do Instituto de Ciências Biomédicas, localizados no Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

#### 4.2 COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas de Boas Práticas de Uso em Experimentação Animal, com devida aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo 005/18.

#### 4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DM2

Neste projeto foram utilizados ratos Zucker Diabetic Fat (ZDF) (figura 6), como modelo de DM2. Estes apresentam uma mutação homozigótica no alelo *fa* do gene do receptor da leptina, resultando assim em uma interação ineficaz entre a leptina e o seu receptor. A leptina é um hormônio peptídico responsável por proporcionar saciedade, cuja a diminuição da sensibilização do receptor desse hormônio nos animais ZDF faz com que estes se tornem obesos (TOKUYAMA et al, 1995).



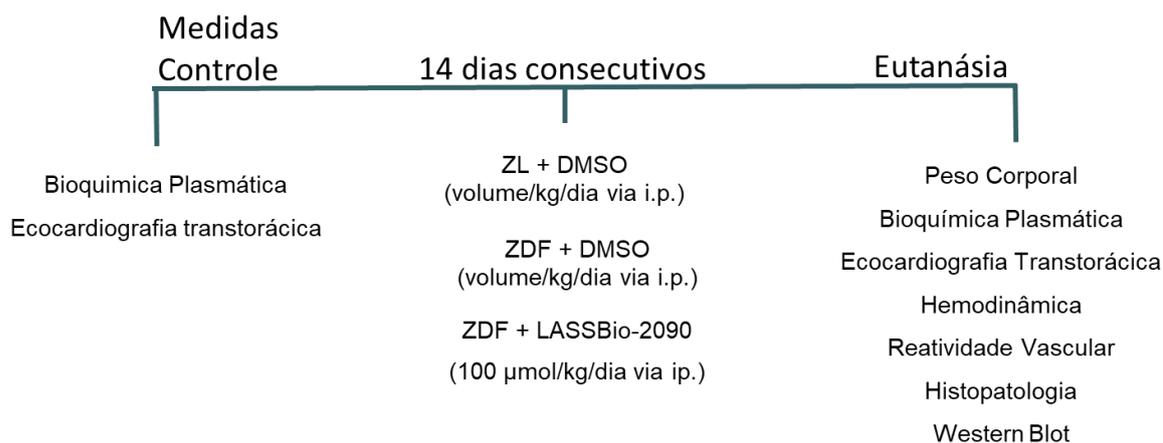
**Figura 6:** Modelo Zucker Diabetic Fat (Site Charles River, acesso 21 de março)

Os animais ZDF mantêm o estado normoglicêmico até a sétima semana de idade, e começam a desenvolver obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina em torno da décima semana de idade. O DM2 se estabelece após 20 semanas de idade (YOKOI et al, 2013) sendo utilizado como modelo animal de DM2 associada a obesidade, SM, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina (BRAY, 1977; CHANTEMELE et al, 2009).

Foram utilizados ratos ZDF e Zucker Lean (ZL) machos com 24 a 32 semanas de idade (200 a 400g), esses foram mantidos em gaiolas coletivas, com livre acesso a água e ração, em ambiente com temperatura a 22°C e ciclo de luz claro/escuro alternados a cada 12 horas no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: 1. ZL tratados com veículo (dimetilsulfóxido, DMSO); 2. ZDF tratados com veículo; 3. ZDF tratados com LASSBio-2090, 100 µmol/kg/dia via intraperitoneal (i.p) (figura 7). O peso dos animais foi averiguado semanalmente para ajuste da dose, escolhida segundo um recente estudo (ALVES et al, 2019).



**Figura 7:** Desenho experimental.

## 4.5 PERFIL METABÓLICO

Durante o protocolo experimental foi analisado o perfil de peso corporal com medida semanal dos pesos dos animais. Além disso, foram coletadas amostras sanguíneas através da veia caudal dos animais após um jejum de 12h para análise da glicemia em jejum e parâmetros bioquímicos.

No teste do nível sérico de glicose, os animais foram privados de ração por um período de 12 horas e ao final do jejum, uma amostra de sangue foi coletada da veia caudal dos animais para mensuração da glicemia através do uso do kit Accu-Check®. Entretanto, a análise do nível sérico de insulina foi realizada por meio do kit ELISA (Insulin Ultrasensitive ELISA, Alemanha), e os níveis de colesterol total e triglicerídeos foram determinados usando kits colorimétricos (Bioclin, MG, Brasil).

## 4.6 PERFIL CARDIOVASCULAR

### 4.6.1 Ecocardiografia transtorácica

A ecocardiografia transtorácica foi realizada antes e após o início do tratamento utilizando-se o ecocardiógrafo Vevo 770 High-Resolution In Vivo Micro-Imaging System (FUJIFILM Visual Sonic, Inc., Toronto, Ontario, Canada) equipado com transdutor mecânico de 10 MHz. Os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano a 3% e mantidos a 1,5% para a avaliação da função cardíaca numa temperatura ambiente mantida a aproximadamente 25°C para evitar hipotermia. Cortes paraesternais bidimensionais de eixo longo e curto de ventrículo esquerdo (VE) foram obtidos para a aquisição da imagem no modo M proporcionando a análise dos seguintes parâmetros: espessura das paredes e diâmetro da via de saída do VE. Cortes bidimensionais de eixo curto do ventrículo esquerdo ao nível dos músculos papilares foram obtidos para a aquisição da área ventricular esquerda. Foram utilizadas as medidas de fluxo mitral e doppler tecidual da velocidade de enchimento transmital máxima (E) e velocidade anular mitral precoce (e'), respectivamente, para calcular a relação de pressão de enchimento (E/e'), a fim de avaliar a função diastólica do ventrículo esquerdo (VE) (URBONIENE et al, 2010). Todas as medidas foram obtidas de acordo com os manuais da Sociedade Americana de Eco-

cardiografia e da Associação Europeia de Imagem Cardiovascular (LANG et al, 2015).

#### **4.6.2 Medida invasiva parâmetros hemodinâmicos**

Após 14 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (15 mg/kg, i.p.) a fim de se realizar a dissecação da artéria carótida direita do animal para introdução de cateter heparinizado conectado a um transdutor de pressão/volume (PowerLab MLT884, ADInstruments, Sydney, Austrália). Inicialmente foi medida a pressão arterial e após sua estabilização, o cateter foi então inserido no VE para o registro da pressão intracavitária esquerda (ALENCAR et al, 2018). Os seguintes parâmetros hemodinâmicos foram avaliados: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (mmHg), variação da velocidade de contração (+ dP/dt), pressão diastólica do ventrículo esquerdo (mmHg) e variação da velocidade de relaxamento (- dP/dt) (ALENCAR et al, 2014). Todos os parâmetros foram automaticamente calculados com o sistema de aquisição de dados do programa Lab-Chart 7.0 (ADInstruments, EUA).

#### **4.6.3 Reatividade vascular**

A porção torácica da aorta dos animais dos diferentes grupos experimentais foi dissecada e seccionada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Os anéis foram preparados para registro de tensão isométrica através da fixação em hastes acopladas a transdutor de tensão (Grass, FT03, Quincy, MA, USA) e mantidos em solução Tyrode modificada constituída de (mM): NaCl (123); KCl, (4,7); MgCl<sub>2</sub>, (1,2); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (1,2); dextrose, (11,5); NaHCO<sub>3</sub>, (15,5); CaCl<sub>2</sub>, (1,2). A solução foi continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantida a 37°C e pH 7,4. Após o período de estabilização (120 min), a aorta foi exposta a concentrações crescentes de fenilefrina (Phe, 1 nM - 10 µM), seguida de adição de concentrações crescentes de acetilcolina (ACh, 1 nM - 10 µM), a fim de avaliar a função endotelial através da observação do relaxamento vascular em resposta a ACh (ALENCAR et al, 2016). Os dados foram armazenados em computador para posterior análise utilizando o programa AxoScope 8.1 (Axon Instruments, Inc).

## 4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Ao final do protocolo experimental, os corações dos animais foram retirados, e armazenados em solução de formolzinco. Após isso, as amostras foram processadas em banhos em concentrações progressivas de álcool etílico, e em seguida xilol, emblocadas com parafina a 60°C e seccionadas a 5 µm de espessura através de um micrótomo (Lupe modelo MRP03). Os cortes foram fixados em lâminas e corados com solução de picosirus red (PSR), a fim de analisar fibras de colágeno no tecido marcadas de vermelho. E hematoxilina e eosina (HE), para análise de infiltrado celular. Foram analisados 5 a 20 campos com aumento de 400x através do microscópio óptico (Zeiss – AXIOSTAR- plus) e a quantificação realizada pelo programa ImageJ.

## 4.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

### 4.8.1 Preparação do homogenato de tecido cardíaco

Após a coleta do tecido cardíaco, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido, e posteriormente no freezer a -80°C. Os tecidos foram homogeneizados em solução de tampão de lise contendo em mM: sacarose (250); HEPES-Tris (10); fluoreto de fenilmetilsulfonil (1); aminobenzamidina (1); aprotinina (1); pepstatina (1); leupeptina (1), inibidores da tripsina (1); iodocetamina (20); EGTA (100) Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 8000 rpm, a 4°C por 15 minutos (centrifuga SCR20B, rotor RPR12-2, Hitachi). Após a centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante coletado e estocado a -80°C para futura dosagem de proteína total através de um espectrofotômetro seguindo o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### 4.8.2 Imunodeteção de proteínas

Os homogenatos das amostras foram solubilizados em tampão de amostra para eletroforese contendo glicerol, 10%; azul de bromofenol, 0,02%; 100 mM de TRIS/HCl; SDS 5%, após foi adicionado no gel uma solução de SDS-PAGE a 9%. A transferência das proteínas para as membranas de nitrocelulose foi realizada no sis-

tema de transferência semi-seco (Trans-Blot, Bio-Rad). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com tampão PBS (15 min) e tampão PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T, 15 min). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5 %, e lavadas novamente com PBS e PBS-T. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo primário diluído em PBS (1:1000) durante toda a noite. Após esse processo, as membranas foram lavadas com PBS e PBS-T, e foi adicionado o anticorpo secundário diluído em PBS-T (1:10000) por um período de 1h. As membranas foram lavadas e relevadas através do uso de kit de quimioluminescência (Super Signal West Pico, Rockford, IL, EUA). As proteínas específicas utilizadas foram: 1. Mediadora de estresse oxidativo, Receptor de AGE, RAGE (Abcam); 2. Citocina inflamatória, TNF $\alpha$ ; 3. Óxido nítrico sintase induzível, iNOS, 4. Marcador proliferativo, c-Fos, 5. Padrão, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para a quantificação da densidade da banda de proteínas foi usado o programa ImageJ.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. O teste de análise de variância (*One Way* - ANOVA) seguido do teste de Turkey foi utilizado, para as comparações entre o grupo controle e os demais grupos, considerando significância estatística  $P < 0,05$ . Os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism® 6 para representar os dados obtidos.

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 PERFIL METABÓLICO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Uma semana antes do início do tratamento com LASSBio-2090, o perfil metabólico dos animais foi averiguado a fim de obter a confirmação do modelo experimental de DM2 (tabela 1). O ganho ponderal dos animais ZDF ( $481,8 \pm 15,1$  g) foi maior quando comparado aos animais ZL ( $268,6 \pm 8,4$  g), respectivamente configurando a obesidade nos animais ZDF. Outro parâmetro analisado foi o nível de glicose plasmática em jejum, aumentado nos animais ZDF ( $121,7 \pm 5,7$  mg/dL), em relação aos animais ZL ( $73,6 \pm 2,9$  mg/dL). Semelhante foi observado nos níveis de insulina sérica nos animais do grupo ZDF ( $1,4 \pm 0,1$  ng/mL), quando comparado aos animais ZL ( $1,0 \pm 0,1$  ng/mL). Para análise do perfil lipídico, foram determinados os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos, onde os animais do grupo ZDF apresentaram valores de  $166,6 \pm 16,8$  mg/dL e  $155,4 \pm 7,8$  mg/dL, respectivamente. No entanto, os animais ZL apresentaram padrão lipídico normal com  $52,4 \pm 1,3$  e  $26,4 \pm 1,6$  mg/dL de colesterol total e triglicerídeos.

**Tabela 1.** Perfil metabólico dos grupos experimentais antes do tratamento de 14 dias com LASSBio 2090. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 6 ratos por grupo, exceto ZDF n = 12 ratos por grupo). \*P <0,05 vs ZL.

Grupos experimentais	Controle	
	ZL (n = 6)	ZDF (n = 12)
Peso corporal (g)	$268,6 \pm 8,4$	$481,8 \pm 15,1^*$
Glicose (mg/dL)	$73,6 \pm 2,9$	$121,7 \pm 5,7^*$
Insulina (ng/mL)	$1,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1^*$
Colesterol total (mg/dL)	$52,4 \pm 1,3$	$166,6 \pm 16,8^*$
Triglicerídeos (mg/dL)	$26,4 \pm 1,6$	$155,4 \pm 7,8^*$

**Tabela 2.** Perfil metabólico dos grupos experimentais após o tratamento de 14 dias com LASSBio 2090. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 6 ratos por grupo). \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO.

Grupos experimentais	Após tratamento		
	ZL + DMSO (n = 6)	ZDF + DMSO (n = 6)	ZDF + LASSBio2090 (n = 6)
Peso corporal (g)	275,8 $\pm$ 5,2	525,0 $\pm$ 14,6*	467,7 $\pm$ 5,2#
Glicose (mg/dL)	77,5 $\pm$ 3,0	122,8 $\pm$ 6,2*	85,0 $\pm$ 1,7#
Insulina (ng/mL)	1,5 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1*	1,4 $\pm$ 0,1#
Colesterol total (mg/dL)	84,0 $\pm$ 11,7	177,8 $\pm$ 31,2*	104,8 $\pm$ 5,3#
Triglicerídeos (mg/dL)	32,78 $\pm$ 4,2	123,0 $\pm$ 11,4*	90,9 $\pm$ 4,8#

Após 14 dias de tratamento com LASSBio 2090, os parâmetros metabólicos foram avaliados novamente (tabela 2). Os animais ZL tratados com DMSO apresentaram peso corporal (275,8  $\pm$  5,2 g), entretanto os animais ZDF tratados com LASSBio-2090 (467,7  $\pm$  5,2 g) apresentaram uma redução quando comparados aos animais ZDF tratados com DMSO (525,0  $\pm$  14,6 g). Além disso, o quadro de hiperglicemia observado nos animais ZDF tratados com DMSO (122,8  $\pm$  6,2 mg/dL) apresentou uma melhora nos animais do grupo ZDF tratados com LASSBio 2090 (85,0  $\pm$  1,7 mg/dL), valores semelhantes aos animais ZL tratados com DMSO (77,5  $\pm$  3,0 mg/dL). O mesmo foi notado no quadro de hiperinsulinemia presente nos animais ZDF tratados com DMSO sendo revertida após o tratamento com LASSBio-2090 reduzindo a insulina sérica de 2,4  $\pm$  0,1 para 1,4  $\pm$  0,1 ng/mL, nível semelhante aos animais ZL tratados com DMSO de 1,5  $\pm$  0,1 ng/mL.

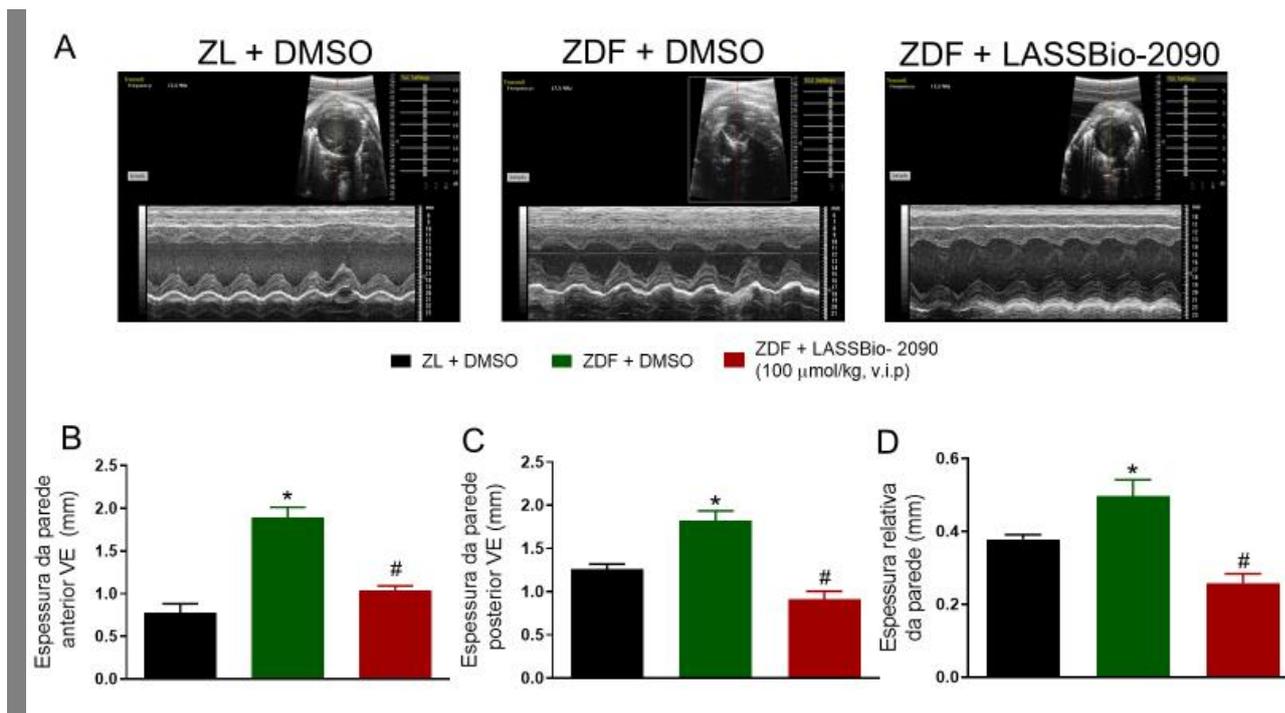
A análise do perfil lipídico, foi realizada através das medidas de colesterol total e triglicerídeos. Foi observado uma redução da hipercolesterolemia nos animais

ZDF tratados com DMSO comparado aos animais ZDF tratados com LASSBio-2090, de  $177,8 \pm 31,2$  para  $104,8 \pm 5,3$  mg/dL, nível semelhante aos animais ZL tratados com DMSO de  $84,0 \pm 11,7$  mg/dL. O mesmo foi observado nos níveis de triglicérides, onde os animais ZL e ZDF tratados com DMSO apresentaram aumento de  $32,7 \pm 4,2$  para  $123,0 \pm 11,4$  mg/dL, tal parâmetro foi reestabelecido nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 ( $90,9 \pm 4,8$  mg/dL). Sendo assim, o LASSBio-2090 promoveu a normalização do perfil lipídico dos animais ZDF, devido a redução dos níveis de colesterol total e triglicérides.

## 5.2 MELHORA DA HIPERTROFIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090

Inicialmente, a hipertrofia do ventrículo esquerdo foi detectada nos animais ZDF tratados com DMSO através da mensuração da espessura da parede anterior do VE (Figura 8B), onde foi possível observar um aumento deste parâmetro com valor de  $1,9 \pm 0,12$  mm. O tratamento com LASSBio-2090 proporcionou a redução desta espessura para  $1,0 \pm 0,5$  mm, semelhante à observada nos animais ZL tratados com DMSO ( $0,78 \pm 0,1$  mm). Além disso, foi averiguado a relação da parede posterior do VE (Figura 8C), onde os animais do grupo ZDF e ZL tratados com DMSO apresentaram espessura de  $1,8 \pm 0,1$  e  $1,3 \pm 0,6$  mm, respectivamente. Tal parâmetro foi restabelecido no grupo de animais ZDF tratados com LASSBio-2090 com  $0,95 \pm 0,1$  mm. Através da determinação destes parâmetros, foi analisada a espessura relativa de VE (Figura 8D) dos grupos experimentais, podendo demonstrar que os animais ZDF tratados com DMSO apresentaram padrão aumentado com  $0,50 \pm 0,4$  mm quando comparado aos animais ZL tratado com DMSO  $0,38 \pm 0,1$  mm. A melhora desse parâmetro para  $0,26 \pm 0,2$  mm foi observada após tratamento com LASSBio-2090. É importante ressaltar que o tratamento de ratos ZDF com LASSBio-2090 reverteu de forma benéfica todos esses efeitos deletérios da hipertrofia da parede do VE induzida pelo

diabetes.

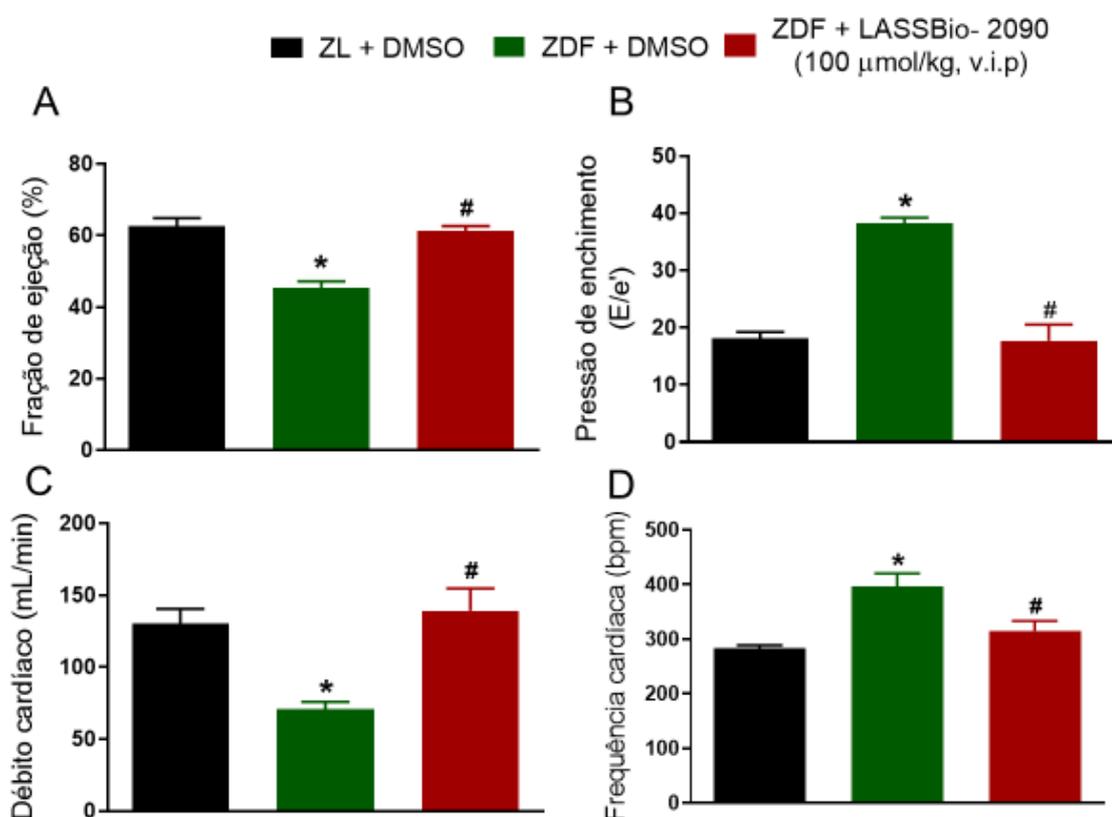


**Figura 8.** Espessura da parede do VE após 14 dias de tratamento com LASSBio - 2090. Dado qualitativo da espessura da parede do VE (A), Espessura da parede anterior de VE (B), Espessura da parede posterior de VE (C), Espessura relativa da cavidade do VE (D). \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO. VE, Ventrículo esquerdo. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 6 ratos por grupo).

### 5.3 MELHORA DA DISFUNÇÃO SISTÓLICA E DIASTÓLICA VENTRICULAR ESQUERDA APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090

A fim de averiguar a função sistólica do VE foi medida a fração de ejeção (%), apresentada na figura 9A, onde os animais ZDF tratados com DMSO apresentaram valores reduzidos  $45,4 \pm 1,8$  %, comparado aos animais ZL tratados com DMSO ( $65,6 \pm 2,2$  %). Por outro lado, a reversão completa da fração de ejeção foi observada nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 ( $61,2 \pm 1,4$  %). Já a função diastólica do VE foi avaliada por meio da medida da pressão de enchimento (E/e') (figura 9B). Os animais ZDF tratados com DMSO apresentaram aumento de  $38,2 \pm 0,1$ , comparado a  $18,0 \pm 1,1$  dos animais ZL tratados com DMSO. Tal parâmetro foi reestabelecido nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090, apresentando  $17,7 \pm 2,8$  de pressão de enchimento. Além disso, foi avaliado o débito cardíaco (figura 9C), onde houve uma redução nos animais ZL e ZDF tratados com DMSO de  $130,0 \pm$

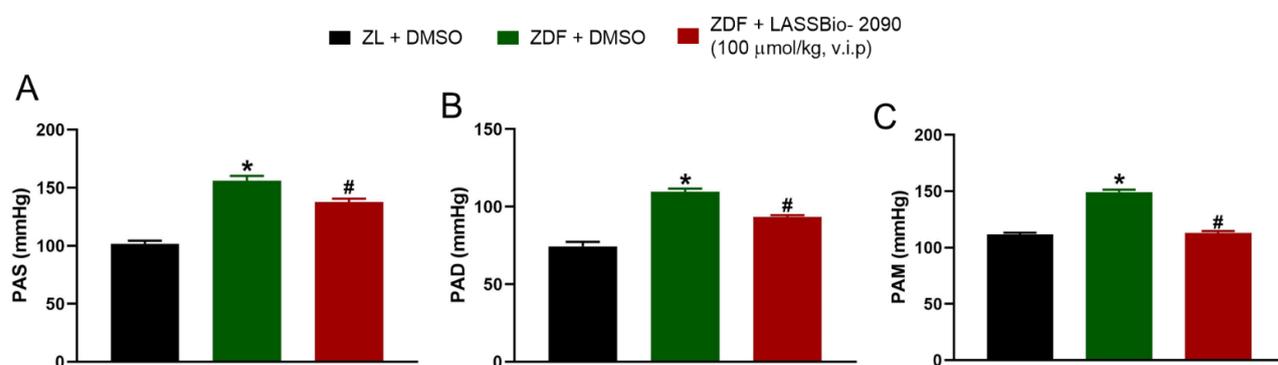
10,4 para  $70,6 \pm 5,2$  mL/min. E uma recuperação deste parâmetro nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 de  $139,1 \pm 15,5$  mL/min, respectivamente. A figura 9D, avaliou a medida de frequência cardíaca dos animais, onde os animais ZL e ZDF tratados com DMSO apresentaram aumento deste parâmetro de  $282,6 \pm 6,0$  para  $395,6 \pm 24,7$  bpm, e uma reversão total nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 de  $315,0 \pm 18,0$  bpm, respectivamente. Configurando que o tratamento com LASSBio-2090 promoveu uma melhora da função diastólica e sistólica nos animais diabéticos.



**Figura 9.** Função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090. Fração de ejeção (%) (A), Pressão de enchimento (E/e') (B), Débito cardíaco (mL/min) (C), Frequência cardíaca (bpm) (D). \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 6).

## 5.4 MELHORA DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090

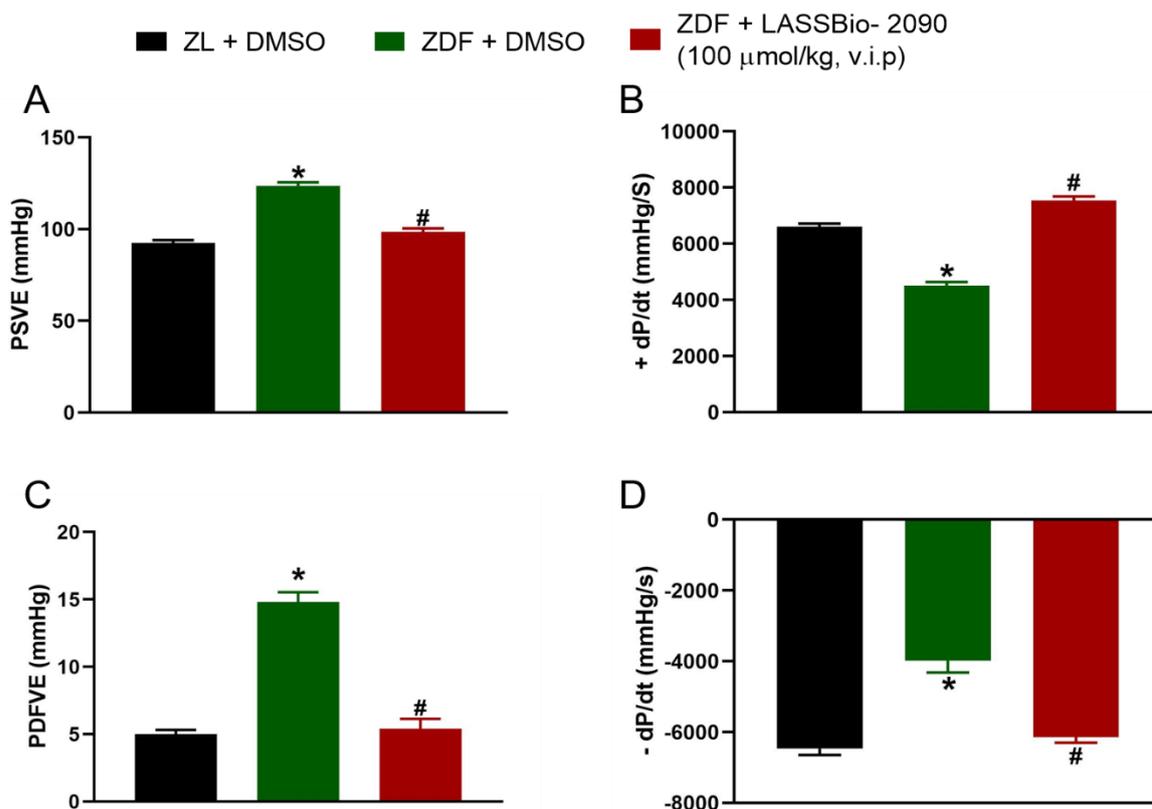
Ao final do protocolo, os parâmetros hemodinâmicos foram obtidos através de medida invasiva nos diferentes grupos experimentais. Os animais ZDF tratados com DMSO apresentaram pressão sistólica, diastólica e média aumentada com  $156,0 \pm 10,3$ ;  $109,8 \pm 5,0$  e  $149,9 \pm 5,3$  mmHg, respectivamente (Figura 10). A hipertensão arterial observada nos animais ZDF foi diminuída com LASSBio-2090 reduzindo a pressão média para  $112,9 \pm 4,6$  mmHg, valor similar ao registrado para os ZL tratados com DMSO de  $111,6 \pm 4,1$  mmHg.



**Figura 10:** Medidas de pressão arterial 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090. PAS (mmHg) (A), PAD (mmHg) (B), PAM (mmHg) (C), \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO. PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 6).

Posteriormente foi avaliada a pressão ventricular esquerda dos grupos experimentais, figura 11. Onde a PSVE (figura 11A) se encontra aumentada nos animais ZDF tratados com DMSO,  $123,6 \pm 4,7$  mmHg quando comparada aos animais ZL tratados com DMSO  $92,4 \pm 4,1$  mmHg. Os animais ZDF tratados com LASSBio-2090 tiveram pressão de  $98,6 \pm 4,4$  mmHg o que indicou melhora da disfunção pelo LASSBio-2090. A velocidade de contração (figura 11B) nos animais ZL e ZDF tratados com DMSO foi de  $6614,0 \pm 270,2$  e  $4506,0 \pm 329,5$  mmHg/s, respectivamente. A redução induzida pelo DM2 foi recuperada com tratamento de LASSBio-2090 para  $7536,0 \pm 380,0$  mmHg/s. De forma similar, a PDFVE (figura 11C), também estava elevada nos animais ZDF tratados com DMSO com  $14,8 \pm 1,8$  mmHg comparado ao grupo ZL tratados com DMSO com  $5,0 \pm 0,8$  mmHg, que foi

normalizada para  $5,4 \pm 1,8$  mmHg nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090. Por último, foi realizada a medida da velocidade de relaxamento que estava reduzida nos animais ZDF tratados com DMSO com  $-3983 \pm 810,2$  mmHg/s. O tratamento com LASSBio-2090 levou a  $-6135,0 \pm 389,7$ , valor semelhante ao observado nos animais ZL com  $-6465 \pm 432,6$  mmHg/s (Figura 11D).

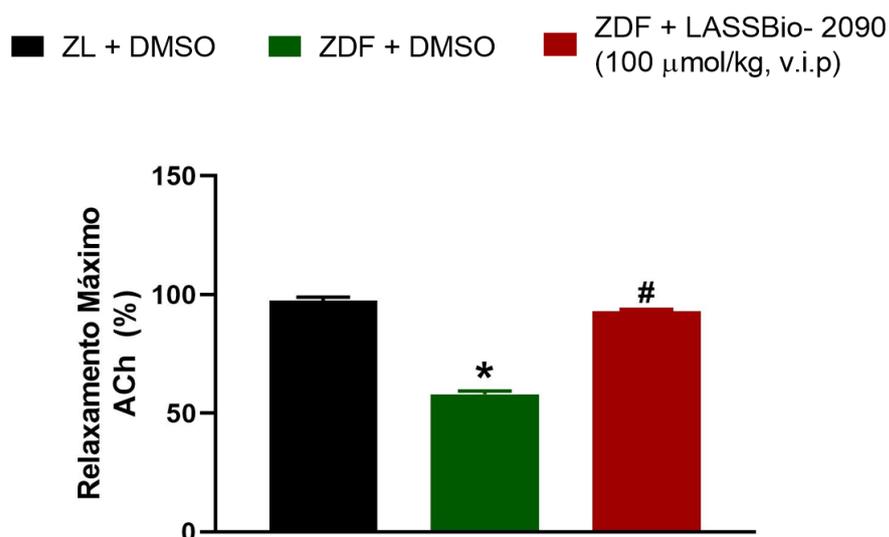


**Figura 11.** Medidas de pressão ventricular esquerda 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090. PSVE (mmHg) (A), + dP/dt (mmHg/s) (B), PDFVE (mmHg) (C), - dP/dt (mmHg/s) (D). \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO. PSVE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo; + dP/dt, variação da velocidade de contração; PDFVE, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; -dP/dt, variação de velocidade de relaxamento. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 6).

## 5.5 MELHORA DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090

A figura 12, ilustra a curva concentração resposta de relaxamento vascular induzida pela ACh em anéis de aorta provenientes dos grupos experimentais.

É possível observar uma diminuição no relaxamento máximo dos animais ZDF tratados com DMSO ( $58,0 \pm 3,5$  %) comparado aos animais ZL tratados com DMSO,  $97,5 \pm 3,4$ , promovendo assim o deslocamento da curva para a direita. Porém, os animais ZDF tratados com LASSBio-2090 apresentaram uma melhora da disfunção endotelial devido ao aumento do relaxamento máximo ( $93,1 \pm 1,7$  %).

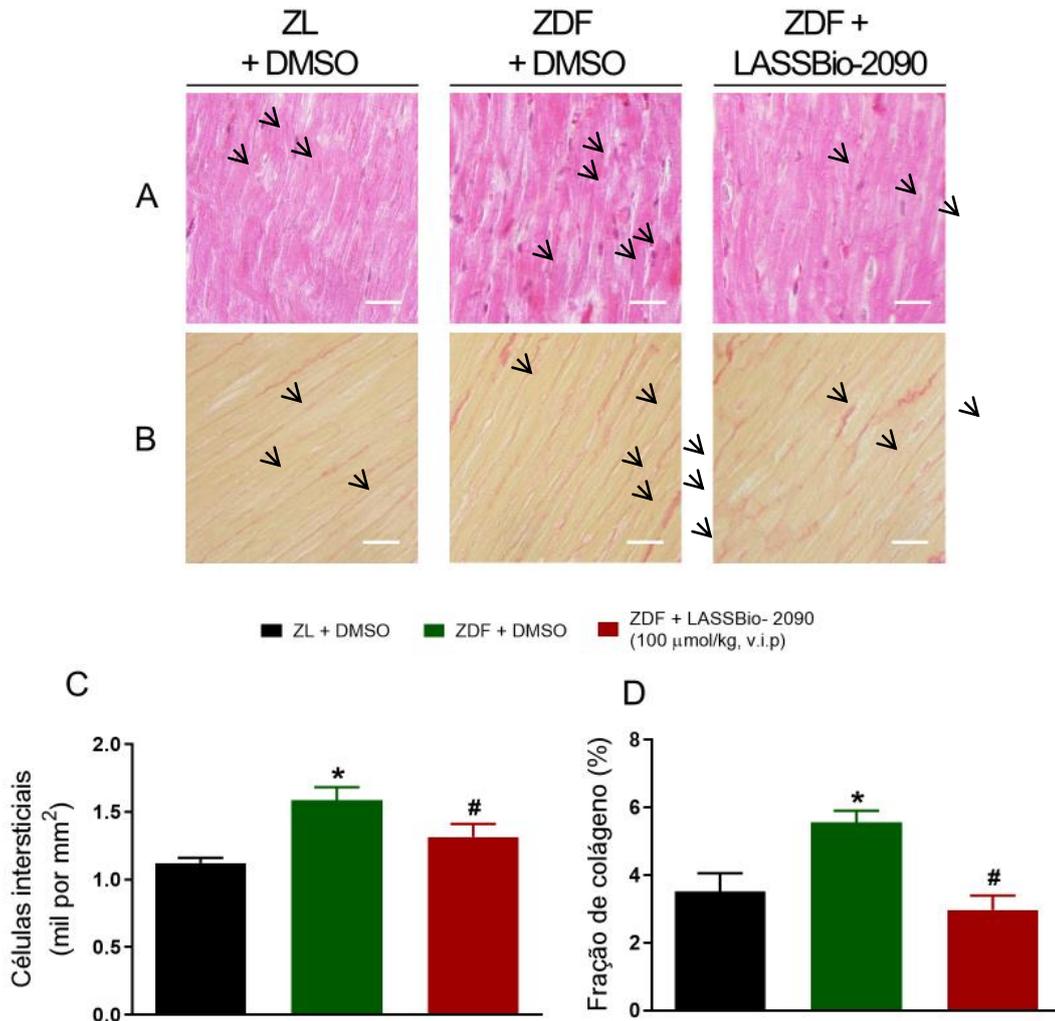


**Figura 12:** Medida de relaxamento máximo induzido por ACh em anéis de aorta 14 dias após o tratamento com LASSBio-2090. \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO. ACh, acetilcolina. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 6).

## 5.6 MELHORA DO REMODELAMENTO E FIBROSE CARDÍACA APÓS O TRATAMENTO COM LASSBio-2090

Foi realizada uma análise histopatológica de amostras do VE dos animais, a fim de averiguar o remodelamento cardíaco (figuras 13A e 13C), por meio da contagem de células intersticiais presentes no VE dos animais. Foi possível observar um aumento desse parâmetro nos animais ZDF tratados com DMSO  $1,6 \pm 0,1$  (mil/mm<sup>2</sup>), comparado aos animais ZL tratados com DMSO  $1,1 \pm 0,1$  (mil/mm<sup>2</sup>). Entretanto, os animais ZDF tratados com LASSBio-2090  $1,3 \pm 0,1$  (mil/mm<sup>2</sup>), apresentaram normalização deste parâmetro. Valores semelhantes, foram notados na medida de área de colágeno fracionada, figuras 13B e 13D. Os animais ZL e ZDF tratados com DMSO apresentaram aumento da fração de colágeno de  $3,5 \pm 0,5$  para  $5,6 \pm 0,3$  (%). Tal parâmetro foi revertido nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 ( $3,0 \pm 0,4$  %), respectivamente. Ressaltando que o tratamento com LASSBio-

2090 reduziu significativamente o remodelamento e a fibrose tecidual do VE conforme representado pelo número reduzido de células intersticiais e pelo teor de colágeno em corações de animais ZDF tratados com DMSO (figura 16;  $P < 0,05$ ).

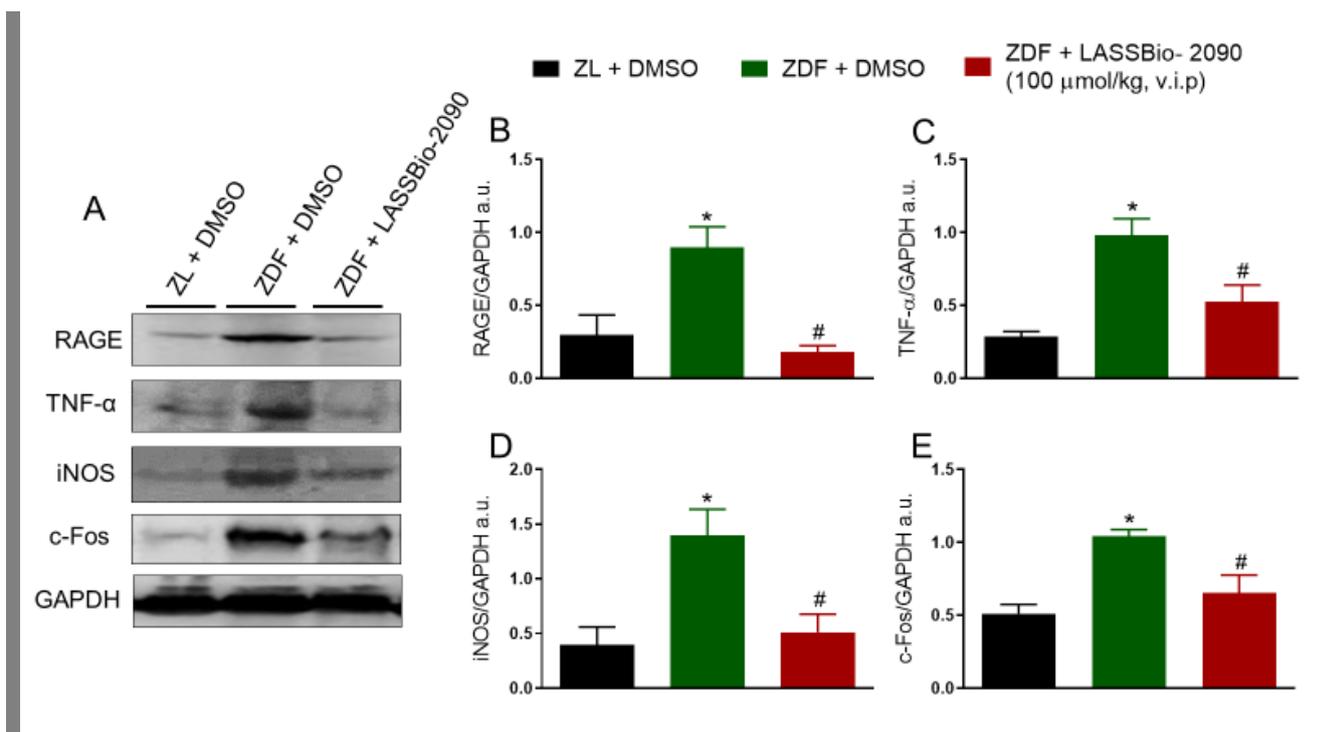


**Figura 13.** Análise histológica do ventrículo esquerdo após 14 dias de tratamento com LASSBio-2090. Resultado qualitativo das células intersticiais em prancha de HE (A) Resultado qualitativo fração de colágeno em prancha de PSR (B), Células intersticiais (mil/mm<sup>2</sup>) (C), Fração de colágeno (%) (D). \* $P < 0,05$  vs ZL + DMSO. #  $P < 0,05$  vs ZDF + DMSO. HE, hematoxilina eosina; PSR, picosirus red. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n= 6$ ).

## 5.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO CARDÍACO

A expressão de proteínas no tecido cardíaco foi determinada através da técnica de western blot (Figura 14A) para diferentes marcadores inflamatórios. Foi

determinada a expressão de RAGE (figura 14B), um receptor de produtos finais de glicação avançada correlacionado ao aumento de estresse oxidativo e deposição de MEC no tecido cardíaco. Foi evidenciado o aumento da expressão de RAGE (figura 14B) nos animais do grupo ZDF tratados com DMSO com ( $0,90 \pm 0,1$ ) e normalização nos animais ZDF após o tratamento com LASSBio-2090 ( $0,18 \pm 0,04$ ). Além disso foi observada a expressão de TNF $\alpha$  (figura 14C), uma citocina pró inflamatória. Neste estudo os animais ZDF tratados com DMSO apresentaram aumento da expressão deste marcador ( $0,98 \pm 0,1$ ), e uma redução parcial de tal parâmetro nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 ( $0,52 \pm 0,1$ ). A figura 14D ilustra iNOS altamente expresso nos animais ZDF tratados com DMSO ( $1,4 \pm 0,2$ ), e uma reversão total nos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 ( $0,51 \pm 0,1$ ). O marcador da via proliferativa, c-Fos, também foi investigado nos animais ZDF tratados que se apresentou altamente expresso havendo uma redução após o tratamento com LASSBio-2090 (Figura 14E).



**Figura 14.** Análise da expressão de proteínas em tecido cardíaco após 14 dias de tratamento com LASSBio-2090. Resultado qualitativo da expressão de proteínas moleculares (A), Expressão de RAGE/GAPDH (B), Expressão de TNF  $\alpha$ /GAPDH (C), Expressão de iNOS/GAPDH (D), Expressão de c-Fos/GAPDH (E). \*P <0,05 vs ZL + DMSO. # P <0,05 vs ZDF + DMSO. GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 6).

## **6 DISCUSSÃO**

A síndrome metabólica (SM) provoca a manifestação de diversas doenças tais como DM2, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia, que conferem aumento do risco de eventos cardiovasculares (HALPERN et al, 2010). Segundo os critérios da Federação Internacional de Diabetes (2018), a caracterização do quadro de SM se deve a presença de três ou mais fatores de risco dentre eles: obesidade; glicemia > 100 mg/dL; triglicerídeos > 150 mg/dL; HDL < 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres; e pressão arterial sistólica  $\geq$  130 mmHg ou diastólica  $\geq$  85 mmHg (IDF, 2018). Com base nesses dados, este trabalho teve como proposta inicial a caracterização da SM nos animais ZDF que foram utilizados para a avaliação farmacológica de um novo composto iDPP4, LASSBio-2090. Os animais ZDF apresentaram sobrepeso, hiperglicemia, hipertensão arterial e dislipidemia devido aos altos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos, confirmando assim a SM nestes animais.

A enzima DPP4 regula a glicemia pós-prandial e sua inibição provoca a estimulação da secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon de forma dependente da glicose (MULVIHILL e DRUCKER, 2014). Segundo Gupta (2012), os iDPP4 apresentam um efeito modesto na resistência à insulina e ação neutra em relação a mudança do peso corporal (GUPTA, 2012). A semelhança dos iDPP4 disponíveis para uso clínico, LASSBio-2090 reduziu os níveis de glicose e insulina plasmática. Apesar de ter sido observado uma melhora no perfil lipídico dos animais ZDF tratados com LASSBio-2090, este iDPP4 reduziu parcialmente os níveis de triglicerídeos, o que também é descrito para os iDPP4 em uso em alguns ensaios clínicos controlados randomizados (NEUMILLER e SETTER, 2012). No diabetes, o nível elevado de lipídios séricos provoca o risco de doença cardíaca coronariana (LEITE et al, 2007) e desempenha um papel importante na patogênese do dano cardiovascular e renal progressivo (KASISKE et al, 1990; DOMINGUEZ et al, 2000; VISCONTI et al, 2016)

Além do efeito metabólico, a enzima DPP4 induz efeitos pleiotrópicos, e sua inibição poderia ter um papel fundamental no tratamento de doenças que apresentam condição inflamatória associada. Existindo assim, a possibilidade da inibição de DPP4 participar na melhora de CD (ZHONG et al, 2013), pois esta ação aumenta os níveis de GLP-1 que ao ativar seus receptores promovem efeitos anti-inflamatório, anti-aterosclerótico e antioxidante (ZERILLI e PYON, 2007; SCHEEN,

2015). Esta seria a proposta desta dissertação em identificar um novo iDPP4 que interferisse com a evolução da complicação cardiovascular em modelo animal de DM2.

O curso clínico da disfunção cardíaca em DM progride de anormalidades cardíacas subclínicas, como disfunção diastólica do VE, para insuficiência cardíaca diastólica grave com fração de ejeção normal e, eventualmente, disfunção sistólica seguida de insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (JIA et al, 2018). O preenchimento diastólico comprometido pode estar associado à obesidade e ao DM2 e esses fatores são caracterizados por distúrbios metabólicos e estruturais que levam a uma redução na complacência da parede ventricular e, posteriormente, um dano no preenchimento passivo do VE (JIA, et al 2016). Na fase tardia da CD, inúmeras alterações no metabolismo, hiperativação neuro-humoral e fibrose cardíaca prejudicam a circulação coronária e a função sistólica (BATTIPROLU et al, 2010; ADEGHATE e SINGH, 2014). No modelo animal de DM2 utilizado, foi observado através de medidas ecocardiográficas e pressão intracavitária esquerda importantes alterações estruturais e funcionais do VE. Os ratos diabéticos ZDF apresentaram fração de ejeção reduzida e aumento da pressão de enchimento ( $E/e'$ ). Consequentemente, o débito cardíaco do VE foi prejudicado nesses animais, podendo ser justificado devido ao aumento compensatório da frequência cardíaca. O tratamento de duas semanas com LASSBio-2090 proporcionou a melhora significativa das funções sistólicas e diastólicas, juntamente com um aumento do débito cardíaco e normalização da frequência cardíaca. Esses dados corroboram que o controle glicêmico no DM2 é um mecanismo crítico para a prevenção da disfunção e insuficiência cardíaca. Além disso, observou-se a melhora da morfologia cardíaca após o tratamento com LASSBio-2090 em ratos ZDF, pois a hipertrofia da parede do VE foi totalmente revertida. A PSVE e a PDFVE foram maiores em animais ZDF tratados com DMSO do que em animais ZL tratados com DMSO. Entretanto as velocidades de contração ( $+dP/dt$  positivas) e relaxamento ( $-dP/dt$ ) do VE se encontraram reduzidas nos animais ZDF, indicando função sistólica e diastólica do VE significativamente prejudicada, um achado que corrobora com os dados ecocardiográficos. O tratamento com LASSBio-2090 conseguiu promover a melhora destes distúrbios hemodinâmicos.

Neste trabalho, a disfunção endotelial foi confirmada através da redução do

relaxamento máximo induzido por ACh em anéis de aorta dos animais ZDF. Os fatores como hiperglicemia, hiperinsulinemia e dislipidemia são responsáveis pela disfunção endotelial, devido ao estresse oxidativo promovendo assim a morte das células endoteliais. Além disso, os animais ZDF apresentaram aumento significativo da PAS, PAD e PAM, configurando um quadro de hipertensão arterial sistêmica. A disfunção endotelial presente em condição de obesidade e DM2 pode ser consequente a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (KUBOTA et al, 2012; BOER et al, 2017, DELL'ORO et al, 2017; SHIGIYAMA et al, 2017). O NO desempenha uma função importante para a homeostase cardiovascular, pois funciona como um modulador de respostas vasculares, imunes e inflamatórias (LUNDERBERG et al, 2015). Maior disponibilidade de NO mediada pela ativação da via eNOS/Akt, NO/GMPc pode ser induzida através da inibição de DPP4, e, portanto, exercer papel protetor cardiovascular (SHAH et al, 2011; KROLLER et al, 2012; AROOR et al, 2013; MANRIQUE et al, 2016) e redução da hipertensão arterial sistêmica. As grandes quantidades de NO no tecido cardíaco são consequência do aumento da expressão de iNOS (WILLIAMSON et al, 1993; IDO et al, 1997). Ratos ZDF tratados com LASSBio-2090 tiveram uma normalização dos níveis de iNOS no tecido cardíaco, um benefício adicional relacionado à reversão da CD neste trabalho experimental. Além disso, o tratamento com LASSBio-2090 em ratos ZDF, mostraram uma melhora da função endotelial assim como um efeito antihipertensivo. Esses resultados validam a importância farmacológica inovativa de LASSBio-2090 no contexto do CD.

A hiperglicemia crônica, observada em pacientes com DM2, leva ao aumento da geração de AGEs (GOLDIN et al, 2006). Ativando assim a via de sinalização AGE/RAGE, a qual proporciona uma alteração de depósito de colágeno do tipo I e do tipo III, acúmulo de MEC e aumento da produção de ROS. Além disso a ativação desta via leva ao aumento da secreção de fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), o qual estimula a inflamação e síntese gênica, acentuando a formação de MEC e fibrose em diversos tecidos (SCHIMIDT et al, 1999; COOPER, 2004; LI et al, 2004; ZHAO et a, 2012; HUTCHINSON et al, 2013). O aumento de ROS por sua vez leva ao aumento de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumento de fibrose no miocárdio. Todas essas alterações geram danos ao tecido cardíaco, remodelamento e disfunção. Nielsen e colaboradores (2009),

demonstraram que camundongos db/db knockout para RAGE não desenvolveram disfunção diastólica e atenuando a expressão de colágeno (NIELSEN et al, 2009). Portanto essa via de sinalização é um fator importante para o desenvolvimento da disfunção cardíaca. Segundo os dados apresentados neste trabalho, os animais ZDF tratados com DMSO apresentaram maior deposição de colágeno miocárdico, assim como um número maior de cardiomiócitos, e aumento da expressão de RAGE, o que resultou em uma má adaptação do VE (fibrose/remodelação) e hipertrofia. Após o tratamento com LASSBio-2090 houve uma diminuição na expressão de RAGE, normalização da deposição de colágeno e diminuição de células intersticiais. Esses achados podem, em parte, explicar a melhora da função do VE em ratos ZDF tratados com DMSO.

O efeito cardioprotetor de iDPP4, é mediado pelo aumento dos níveis de GLP-1, através da ativação da via PI3K/AKT, (HUISAMEN et al, 2011) com melhora da função e morfologia cardíaca, concomitante a redução da hiperglicemia e hiperinsulinemia (LIU et al, 2010). O envolvimento do GLP-1 para a cardioproteção pode ser reforçado pelo fato da deleção genética de GLP-1R provocar hipertrofia de VE, disfunção diastólica e sistólica (GROS et al, 2003), o que pode ser revertido com o tratamento com análogo de GLP-1 em modelo animal de obesidade (NOYAN-ASHRAF et al, 2013). Diversos estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que os iDPP4 melhoram o desenvolvimento e a progressão da insuficiência cardíaca (BOER et al, 2017; CHOU et al, 2017; JAX et al, 2017; KIM et al, 2017; WANG et al, 2017). Assim, a melhora da função ventricular esquerda dos animais ZDF tratados com LASSBio-2090 poderia ser justificada pela inibição de DPP-4 e aumento dos efeitos citoprotetores do GLP-1, que são mediados por mecanismos dependentes da ativação das vias PI3K, quinase regulada por sinal extracelular (ERK1 / 2), AMPc, PKA e Akt (BOSE et al, 2007; HUISAMEN et al, 2008; IWASA et al, 2010; HUISAMEN et al, 2011), que inibem o processo de morte celular nos cardiomiócitos, ROS e citocinas pró-inflamatórias (DOKKEN et al, 2011).

A inflamação miocárdica é uma característica importante no desenvolvimento da CD (WESTERMANN et al, 2007; WESTERMANN et al, 2009). Através do estresse oxidativo, cardiomiócitos, células endoteliais e fibroblastos exibem um papel na formação de citocinas pró-inflamatórias. O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas

pró-inflamatórias responsáveis pela redução da contratilidade dos cardiomiócitos (CAIN et al, 1999; DORGE et al, 2002; SCHULZ et al, 2004). Foi relatado que o aumento dos níveis de TNF $\alpha$  em corações de roedores diabéticos está significativamente correlacionado com o desenvolvimento da disfunção do VE e comprometimento do grau de contratilidade (+ dP/dt) (WESTERMANN et al, 2007; WESTERMANN et al, 2006). No estudo atual, o LASSBio-2090 normalizou a super expressão do TNF $\alpha$  em amostras de tecidos cardíacos de ratos ZDF. Este efeito benéfico melhorou a função do VE como representado pela normalização de dados hemodinâmico e ecocardiográficos em animais diabéticos.

Níveis elevados de glicose também podem desregular a estrutura e a função dos cardiomiócitos, em parte por uma via c-fos induzida, contribuindo para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, o que leva a CD em ratos (MIN et al, 2009). Este achado está de acordo com nossos dados mostrando um aumento da expressão de c-fos no tecido cardíaco de animais ZDF tratados com DMSO. Especificamente, 2 semanas de tratamento com LASSBio-2090 reduziram a hipertrofia regional da parede do VE e que a ação benéfica do derivado de N-acylhydrazone parece estar relacionada com reduções na expressão de c-fos em corações de animais diabéticos ZDF.

Como abordado no início deste trabalho, o LASSBio-2090 foi sintetizado pelo grupo de pesquisa considerando suas características estruturais necessárias para inibir a enzima DPP4. A adição da subunidade de N-acylhydrazone na molécula de LASSBio-2090 é uma estratégia para aperfeiçoar seu efeito benéfico considerando que este grupo químico tem um papel importante a respeito da promoção de efeitos anti-inflamatório e cardioprotetores quando adicionados em vários compostos bioativos, duas ações importantes que precisam ser consideradas para o tratamento da CD. Devido à alta prescrição de inibidores da DPP4, desde 2006 quando a sitagliptina foi aprovada pelo FDA, trabalhos sobre as ações desta droga têm sido conduzidos em todo o mundo (DRUCKER et al, 2007). Tendo em vista a busca de novas abordagens terapêuticas para CD induzida por DM, este trabalho investigou o composto analógico de LASSBio-2090 em um modelo experimental de DM2 de estágio avançado com comorbidades como CD e disfunção renal, apresentando uma eficácia superior à sitagliptina, quando ambas as substâncias foram administradas numa

dose equimolar em ratos diabéticos (ALVES et al, 2019). Demonstrando que o LASSBio – 2090 pode ser considerado um potencial terapêutico em cepa de rato ZDF que tem alta eficiência reprodutiva servindo como um modelo animal mais útil do DM2 (YOKOI et al, 2013).

Como limitação deste trabalho, pode se considerar a idade do modelo experimental, pois proporcionou um longo período de espera para realização dos testes experimentais e formação dos determinados grupos.

Em conclusão, as lesões cardíacas induzidas pelo DM2 em ratos ZDF podem ser amenizadas pelo tratamento com LASSBio-2090, sugerindo uma estratégia terapêutica inovadora para o tratamento dessas condições.

## **7 CONCLUSÃO**

Em relação ao novo protótipo, LASSBio-2090:

- ✓ Normalizou o distúrbio metabólico com redução da hiperglicemia e dislipidemia
- ✓ Diminuiu a hipertensão arterial e a disfunção ventricular esquerda dos ratos diabéticos
- ✓ Normalizou a reatividade vascular e o remodelamento cardíaco através da redução da ativação de vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório e de proliferação celular

## **8 REFERÊNCIAS**

ADEGHATE, E.; SINGH, J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy. **Heart Fail Rev.**, v. 19(1), p. 15-23. 2014.

ALENCAR A.K.N, et al. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Br J Pharmacol.**, v.169(5), p. 953–962. 2013.

ALENCAR A.K.N, et al. Cardioprotection induced by activation of GPER in ovariectomized rats with pulmonary hypertension. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v.73(9), p. 1158-1166. 2018.

ALENCAR, A.K.N, et al. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. **Int J Cardiol.**, v.173(2), p. 154–162. 2014.

ALVES, B.E.O, et al. Reduction of cardiac and renal dysfunction by new inhibitor of DPP4 22 in diabetic rats. **Pharmacological Reports**. In press. 2019.

AMERICAN DIABETES, A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. **Diabetes Care.**, v. 42(1), p. S13-S28. 2019.

ANEJA, A. et al. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. **Am J Med.**, v. 121(9), p. 748-57. 2008.

AROOR, A.R.; ACEVEDO, C.M.; DEMARCO, V.G. The role of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors in management of cardiovascular disease in diabetes; focus on linagliptin. **Cardiovasc Diabetol.**, v.17, p. 59. 2018.

AUTHORS/TASK FORCE, M. et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Eur Heart J.**, v. 34(39), p. 3035-87. 2013.

BAENA-DIEZ, J. M. et al. Risk of Cause-Specific Death in Individuals With Diabetes: A Competing Risks Analysis. **Diabetes Care.**, v. 39(11), p. 1987-1995. 2016.

BATTIPROLU, P.K. et al. Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. **Drug Discov Today Dis Mech.**, v.7(2), p. 135-143. 2010.

BOER, S.A. et al. Effect of linagliptin on pulse wave velocity in early type 2 diabetes: a randomized, double-blind, controlled 26-week trial (RELEASE). **Diabetes Obes Metab.**, v.19(8), p. 1147–54. 2017.

BOSE, A.K. et al. Myocardial ischaemia–reperfusion injury is attenuated by intact glucagon like peptide-1 (GLP-1) in the in vitro rat heart and may involve the p70s6K pathway. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 21, p. 253–256. 2007.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.**, v.72(1), p.248-254.1976.

BRAY, GA. The Zucker-fatty rat: a review. **Fed Proc.** v.36, s.2, p. 148-53. Feb 1977.

BUCHWALD H. Lowering of cholesterol absorption and blood levels by ileal exclusion. **Circulation.**, v. 29, p. 713-20.1964.

BUCHWALD, H. et al. Effect of partial ileal bypass surgery on mortality and morbidity from coronary heart disease in patients with hypercholesterolemia. Report of the Program on the Surgical Control of the Hyperlipidemias (POSCH). **N Engl J Med.**, v. 323, p. 946-55.1990.

BUGGER, H. e ABEL, E.D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. **Diabetology.**, v. 57(4), p. 660–71. 2014.

CAIN, B.S. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. **Crit care medicine.**, v. 27, p. 1309-18. 1999.

CHANTEMELE, Berlin de et al. Type 2 diabetes severely impairs structural and functional adaptation of rat resistance arteries to chronic changes in blood flow. **Cardiovasc Res.**, v.81(4), p.788-96. 2009.

CHIASSON, J.L. et al. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance. **JAMA.**, v. 290(4), p. 486-94. 2003.

CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 138, p. 271-281. 2018.

CHOU C.Y.et al. Effect of long-term incretin-based therapies on ischemic heart diseases in patients with type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis. **Sci Rep.**, v. 7(1), p. 157-95. 2017.

COOPER, M.E. Importance of advanced glycation end products in diabetes associated cardiovascular and renal disease. **Am J Hypertens.**, v. 17, p. 31-38. 2004.

DELL'ORO, R. et al. Long-term saxagliptin treatment improves endothelial function but not pulse wave velocity and intima-media thickness in type 2 diabetic patients. **High Blood Press Cardiovasc Prev.**, v. 24(4), p. 393–400. 2017.

DOKKEN, B.B. et al. Glucagon- like peptide-1 (GLP-1) attenuates post-resuscitation myocardial microcirculatory dysfunction. **Resuscitation.**, v. 81, p. 755–760. 2010.

DOMINGUEZ, J.H. et al. Studies of renal injury III: lipid-induced nephropathy in type II diabetes. **Kidney Int.**, v.57(1), p. 92-104. 2000.

DORGE, H. et al. Coronary microembolization: the role of TNF-alpha in contractile dysfunction. **J mol cell cardiol.**, v. 34, p. 51-62. 2002.

DRUCKER, D.; EASLEY, C.; KIRKPATRICK, P. Sitagliptin. **Nat Rev Discov.**, v.6(2), p. 109/10. 2007.

FANG, Z. Y.; PRINS, J. B.; MARWICK, T. H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. **Endocr Rev.**, v. 25(4), p. 543-67. 2004.

FINCK, B. N. et al. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. **J Clin Invest.**, v. 109(1), p. 121-30. 2002.

FREITAS, R.H.C.N. et al. Discovery of naphthyl-N-acylhydrazone p38 $\alpha$  MAPK inhibitors with in vivo anti-inflammatory and anti-TNF- $\alpha$  activity. **Chem Biol Drug Des.**, v. 91(2), p. 391-397. 2018.

GROS, R. et al. Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. **Endocrinology.**, v.144, p. 2242–2252. 2003.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 103(2), p. 176-85. 2014.

GUPTA, V. Pleiotropic effects of incretins. **Indian J Endocrinol Metab.**, v. 16, n.1, p. 47-56. 2012.

HALPERN, A et al. Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment. **Diabetol Metab Syndr.**, v.2 p.55. 2010.

HOD, M. et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. **Int J Gynaecol Obstet.**, v. 131(3), p. S173-211. 2015.

HORNICK, T., ARON, D.C. Managing diabetes in the elderly: go easy, individualized. **Cleve Clin J Med.**, v. 75(1), p. 70-8. 2008.

HUISAMEN, B. et al. Pre-treatment with a DPP-4 inhibitor is infarct sparing in hearts from obese, pre-diabetic rats. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 25, p. 13–20. 2011.

HUISAMEN, B., GENADE, S., LOCHNER, A. Signaling pathways activated by glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat heart and their role in protection against ischaemia. **Cardiovasc J Afr.** v. 19, p. 77–83. Mar 2008.

HUTCHINSON, K.R. et al. Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes. **PLoS One.**, v. 8(8), p. e72080. 2013.

ITZHAKI BEN ZADOK, O. et al. Admission blood glucose and 10-year mortality among patients with or without pre-existing diabetes mellitus hospitalized with heart failure. **Cardiovasc Diabetol.**, v. 16(1), p. 102. 2017.

IWASA, M. et al. Antidiabetic drug voglibose is protective against ischemia–reperfusion injury through glucagon-like peptide 1 receptors and the phosphoinositide 3-kinaseAkt-endothelial nitric oxide synthase pathway in rabbits. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 55, p. 625–634. 2010.

JAX, T. et al. A randomized, active and placebo-controlled, three-period crossover trial to investigate short-term effects of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin on macro- and microvascular endothelial function in type 2 diabetes. **Cardiovasc Diabetol.**, v. 16(1), p.13. 2017.

JIA, G. et al. Endothelial Mineralocorticoid Receptor Deletion Prevents Diet-Induced Cardiac Diastolic Dysfunction in Females. **Hypertension.**, v. 66(6), p. 1159-1167. 2015.

JIA, G.; DEMARCO, V. G.; SOWERS, J. R. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 12(3), p. 144-53. 2016.

JIA, G.; HILL, M. A.; SOWERS, J. R. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. **Circ Res.**, v. 122(4), p. 624-638. 2018.

JIA, G.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. **Diabetologia.**, v. 61(1), p. 21-28. 2018.

JORSALI, T. et al. Enteroendocrine K and L cells in healthy and type 2 diabetic individuals. **Diabetology.**, v. 61, p. 284–294. 2017.

KAHN, A. et al. Prospective Analysis of Metabolic Parameters in the Detection of Diabetes and Metabolic Syndrome in Liver Transplant Recipients. **Metab Syndr Relat Disord.**, v. 14(6), p. 305-10. 2016.

KASISKE, B.L. et al. Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Kidney int.**, v. 37(3), p. 880-91. 1990.

KAWAMORI, R. et al. Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. **Lancet.**, v.373, s. 9675, p. 1607-14. 2009.

KIENCKE, S. et al, Pre-clinical diabetic cardiomyopathy: prevalence, screening, and outcome. **Eur J Heart Fail.**, v.12(9), p. 951-7. 2010.

KIM, J.A, et al. Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 302, p. 201–208. 2012.

KIM, Y.G. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and risk of heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. **Circ Heart Fail.**, v. 10(9), p. e003957. 2017.

KROLLER-SCHON, S. et al. Glucose-independent improvement of vascular dysfunction in experimental sepsis by dipeptidyl-peptidase 4 inhibition. **Cardiovasc Res.**, v. 96(1), p. 140–9. 2012.

KUBOTA, Y. et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin improves vascular endothelial function in type 2 diabetes. **J Korean Med Sci.**, v. 27(11), p. 1364–70. 2012.

LANG, R.M, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **J Am Soc Echocardiogr.**, v.28(1), p.1-39. 2015.

LAZO, M. et al. Soluble receptor for advanced glycation end products and the risk for incident heart failure: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Am Heart J.**, v. 170(5), p. 961-7. 2015.

LEE, T. W. et al. PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes. **J Biomed Sci.**, v. 24(1), p. 5. 2017.

LEITE, A.C. et al. Parkinsonia aculeata aqueous extract fraction: biochemical studies in alloxan-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol.**, v.111(3), p.547-52. 2007.

LEON, B. M.; MADDOX, T. M. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. **World J Diabetes.**, v. 6(13), p. 1246-58. 2015.

LI, J.H. et al. Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. **Am J Pathol.**, v. 164, p. 1389-1397. 2004.

LIND, M. et al. Glycaemic control and incidence of heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: an observational study. **Lancet.**, v. 378 (9786), p. 140-6. 2011.

LIPSCOMBE, L.L.; HUX, J.E. Trends in diabetes prevalence, incidence, and mortality in Ontario, Canada 1995-2005: a population-based study. **Lancet.**, v. 369, p. 750-6. 2007.

LIU, Q. et al. The exenatide analogue AC3174 attenuates hypertension, insulin resistance, and renal dysfunction in Dahl salt sensitive rats. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 9, p. 32. 2010.

LUNDERBERG, J.O.; GLADWIN, M.T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signaling in cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discovery.**, v.14, n.9, p. 623– 41. 2015.

MALTA, D.C. et al. Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to. **Rev Bras Epidemiol.**, v. 17(1), p. 267-76. 2012.

MANRIQUE, C. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition with linagliptin prevents western diet-induced vascular abnormalities in female mice. **Cardiovasc Diabetol.**, v. 15(1), p. 94. 2016.

MIN, W. et al. The signal transduction pathway of PKC/NF-kappa B/c-fos may be involved in the influence of high glucose on the cardiomyocytes of neonatal rats. **Cardiovasc diabetol.**, v.8(8). 2008.

MULHERIN, A.J. et al. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal Lcell. **Endocrinology.** v. 152, p.4610– 4619. 2011.

MULVIHILL, E.E.; DRUCKER, D.J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Endocr Rev.**, v.35, p. 992–1019. 2014.

MYTAS, D. Z. et al. Diabetic myocardial disease: pathophysiology, early diagnosis and therapeutic options. **J Diabetes Complications.**, v. 23(4), p. 273-82. 2009.

NAUCK, M.A. et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. **Am. J. Physiol.**, v. 273(5), p. 981–E988 1997.

NEUMILLER, J.J; SETTER S.M. Review of linagliptin for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Clin Ther.**, v. 34, p. 993-1005. 2012.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet.**, v. 384, p. 766-81. 2013.

NIELSEN, J.M. et al. Blockage of receptor for advanced glycation end products prevents development of cardiac dysfunction in db/db type 2 diabetic mice. **Eur J Heart Fail.**, v. 11, p. 638–647. 2009.

NORRIS, S.L. et al. Pharmacotherapy for weight loss in adults with type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. CD004096. 2005.

NOYAN-ASHRAF, M.H. et al. A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity. **Circulation.**, v.127, p. 74– 85. 2013.

POIRIER, P. et al. Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Care.**, v. 24(1), p. 5-10. 2001.

RUBLER, S. et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. **Am J Cardiol.**, v. 30(6), p. 595-602. 1972.

RYDEN, L. et al. Efficacy and safety of high-dose lisinopril in chronic heart failure patients at high cardiovascular risk, including those with diabetes mellitus. Results from the ATLAS trial. **Eur Heart J.**, v. 21(23), p. 1967-78. 2000.

SARAIVA, K.R.; SPOSITO A.C. Cardiovascular effects of Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonists. **Cardiovasc Diabetol.**, v. 13, p.142. 2014.

SCHEEN, A.J. A review of gliptins for 2014. **Exp Opin Pharmacother.**, v.16, p. 43–62. 2015.

SCHIMIDT, A.M. et al. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. **Circ Res.**, v. 84, p. 489-497. 1999.

SCHULZ, R. et al. TNF alpha in ischemia/reperfusion injury and heart failure. **Basic res cardiol.**, v.99, m.1, p.8-11. 2004.

SHAH, Z. et al. Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. **Vasc Pharmacol.**, v. 55(1–3), p. 2–9. 2011.

SHIGIYAMA, F. et al. Linagliptin improves endothelial function in patients with type 2 diabetes: a randomized study of linagliptin effectiveness on endothelial function. **J Diabetes Investig.**, v. 8(3), p. 330–40. 2017.

SHINDLER, D. M. et al. Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Trials and Registry. **Am J Cardiol.**, v. 77(1), p. 1017-20. 1996.

SINGH, A.K. Deciding oral drugs after metformin in type 2 diabetes: An evidence-based approach Indian. **J Endocrinol Metab.**, v. 18(5), p.617–623. 2014.

SJOSTROM, L. et al. Diabetes and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. **N Engl J Med.**, v. 351, p. 2683-93. 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018.** 2018.

SOLUN, B.; MARCOVICIU, D.; DICKER, D. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and their effects on the cardiovascular system. **Curr Cardiol Rep.**, v. 15(8), p. 382. 2013.

SONNE, D.P. et al. Postprandial gallbladder emptying in patients with type 2 diabetes: potential implications for bile-induced secretion of glucagon-like peptide 1. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 171(4), p. 407–419. 2014.

STRATTON, I. M. et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ.**, v. 321(7258), p. 405-12. 2000.

THOTAA, S. et al. N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 28, n. 17, p. 2797–2806. 2018.

THRAINSDOTTIR, I. S. et al. The association between glucose abnormalities and heart failure in the population-based Reykjavik study. **Diabetes Care.**, v. 28(3), p. 612-6. 2005.

TOKUYAMA, Y et al. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes.**, v.44(12), p. 1447-57. 1995.

URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.**, v. 299, n. 3, p. 401–12. 2010.

VAN HEEREBEEK, L. et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. **Circulation.**, v. 117(1), p. 43-51. 2008.

VISCONTI, L. et al. Lipid disorders in patients with renal failure: Role in cardiovascular events and progression of chronic kidney disease. **J Clin Transl Endocrinol.**, v.20(6), p. 8-14. 2016.

WANG, J. et al. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. **Rev Diabet Stud.**, v. 3(3), p. 108-17. 2006.

WANG, M.T. et al. The impact of DPP-4 inhibitors on long-term survival among diabetic patients after first acute myocardial infarction. **Cardiovasc Diabetol.**, v.16,(1), p. 89. 2017.

WESTERMANN, D. et al. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. **Diabetes.**, v.58(6), p. 1373-81. 2009.

WESTERMANN, D. et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. **Diabetologia.**, v.49(10), p.2507-13. 2007.

WETTERGREN, A. et al. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. **Dig. Dis. Sci.**, v. 38(4), p. 665–673. 1993.

WILLIAMSON, J.R. et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes.**, v. 42(6), p. 801-13. 1993.

WRIGHT, J.J.; TYLEE, T.S. Pharmacologic Therapy of Type 2 Diabetes. **Pharmacologic Therapy.**, v. 100, s.4, p. 647–663. 2016.

YANCY, C. W. et al. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **J Am Coll Cardiol.**, v. 62(16), p. e147-239. 2013.

YOKOI, N. et al. A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. **Journal of diabetes research.**, v.2013, p.103731. 2003.

ZERILLI, T.; PYON, E.Y. Sitagliptin phosphate: a DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Clin Ther.**, v. 29(12), p. 2614-2634. 2007.

ZHAO, L.M. et al. Advanced glycation end products promote proliferation of cardiac fibroblasts by upregulation of KCa3.1 channel. **Pflugers Arch.**, v. 464, p. 613–621. 2012.

ZHONG, J.; RAO, X.; RAJAGOPALAN, S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: Potential implications in cardiovascular disease. **Atherosclerosis.**, v. 226(2), p. 305-14. 2013.