Daniel Francisco de Arruda Júnior

Efeito combinado da vildagliptina e do valsartan no tratamento da insuficiência cardíaca em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Castello Costa Girardi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Arruda Júnior, Daniel Francisco de
Efeito combinado da vildagliptina e do valsartan no tratamento da insuficiência cardíaca em ratos / Daniel Francisco de Arruda Júnior. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas.Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Dipeptidil peptidase 4 3.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon 4.Sistema renina-angiotensina 5.Vildagliptina 6.Valsartana

USP/FM/DBD-225/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu maior incentivador, ídolo e exemplo, meu pai, ***Daniel Francisco de Arruda (in memoriam)****, que sempre acreditou em mim e não mediu esforços para ajudar na realização dos meus sonhos. Não ter concluído esta fase a tempo de ver o orgulho em seus olhos, será sempre motivo de lamentação para mim. Sentirei sua falta eternamente.*

AGRADECIMENTOS

*À **Deus**... Por tudo... Pelo objetivo profissional alcançado, mas especialmente por cada uma das pessoas que colocou em meu caminho durante a minha trajetória. Muitas delas me influenciaram para que eu chegasse até aqui. Algumas me ensinaram o que se deve fazer, e muitas outras me ensinaram, de modo ainda mais significativo, o que não deve ser feito... Obrigado Senhor por mais esta conquista.*

*Gostaria de expressar minha gratidão à minha orientadora, **Profa. Dra. Adriana Castello Costa Girardi**, que gentilmente abriu as portas de seu laboratório e me deu todo suporte e treinamento para que eu integrasse o seu grupo de pesquisa. Considero-me privilegiado, por ter podido acompanhar de perto sua ascensão profissional como pesquisadora, orientadora e docente. Obrigado pelo apoio durante este tempo, especialmente nos dias mais sombrios. Obrigado por acreditar em mim mesmo quando eu mesmo não acreditava. Sem seus preciosos ensinamentos, sem sua paciência, suas convicções firmes, sem sua mente brilhante, sem sua competência e poder de liderança, sem suas atitudes e habilidades inspiradoras como cientista este trabalho jamais existiria. Minha eterna gratidão por tudo, mas principalmente para que o melhor fosse sempre o objetivo, lição que levo para a vida.*

*Agradeço, em ordem mais ou menos cronológica, aos companheiros de laboratório do grupo renal: **Renato, Tumi, Ana Luiza, Vanessa, Patrícia, Thiago, Gabriela, Flávia, Acaris, Carol, Marina, Carla, Juliana, Flávio, Juliano e Danubia.** Obrigado pelos momentos na hora do café, pelos momentos*

descontraídos e distraídos também, dentro e fora do laboratório, pelas discussões, viagens e congressos que compartilhamos e assim, pudemos aprender juntos.

Gostaria de registrar um agradecimento especial ao ***Renato****, que acompanhou de perto minha chegada ao laboratório e desde sempre foi um grande amigo, sempre pronto para ensinar e ajudar, com sua sabedoria em assuntos técnicos-científicos, não científicos e áreas afins. Muito obrigado por tudo durante estes anos que convivemos, especialmente, por me apresentar a pizza hut, o cookie triplo chocolate do mister cheney, o coco-bambu e entre tantas guloseimas (risos), brincadeiras à parte, obrigado pelo seu bom humor que marca a sua personalidade. Grande abraço!*

A aluna ***Flávia*** *que trabalhou diretamente comigo como aluna de iniciação científica. Obrigado por tudo que me ensinou em pesquisa básica e especialmente no que diz respeito ao relacionamento interpessoal. Mais uma vez me considero privilegiado por ter tido a oportunidade de trabalhar com você e assim poder crescer como pessoa e como pseudo-orientador também. Obrigado mesmo.*

Ao ***Dr. Flávio Araújo****, pelo entusiasmo sempre demonstrado pelo seu constante sorriso, Top! (risos), pelos conselhos, pelo incentivo, pelo companheirismo e por toda ajuda prestada. Em minha opinião, um profissional que o exemplo, por si só, basta! Nunca terei como retribuir o que você fez. Considero-o um grande amigo.*

Agradeço ainda, pelo companheirismo de todos os dias, pelas constantes palavras de incentivo, pelas sugestões preciosas e pelo apoio técnico e humano, aos amigos, alunos, secretárias e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM): ***Gabriela Venturini, Pamela, Tamiris, Kally, Juliana, Juan, Camila Zogbi, Ana Maria, Lucia, Marcelly, Maúde, Silvana, Renata, Mariliza, Thiago Turaça, Mirian, Ayumi, Paulo Caleb, Vinícius, Márcio, Leno, Sileide, Brendo, Andrea.***

Aos amigos ***Leo, Rafa e Marcão*** *por todos os bons momentos, anos de convivência, aprendizado e diversão, por todas as horas de eco, cervejadas, churrascos, pela sinceridade e companheirismo. A vocês minha eterna amizade.*

Aos professores que colaboraram desde o início até a concretização desse trabalho: ***Prof. Dr. Leonardo dos Santos, Prof. Dr. Luiz Henrique Wolff Gowdak, Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira, Prof. Dr. José Eduardo Krieger.***

A ***Universidade de São Paulo*** *e ao* ***LGCM*** *pela estrutura oferecida. Ao pessoal da Secretaria da Pós-Graduação em Ciências Médicas, particularmente a* ***Rose*** *e* ***Angélica*** *pelo pronto atendimento, na medida do possível e às vezes do impossível também.*

Ao ***Prof. Dr. Paulo Tucci****, da Unifesp e a* ***Profa. Dra. Luciana Rossoni****, do Instituto de Ciências Biomédicas, pela amizade e por me receberem em seus laboratórios oferecendo toda a estrutura para a realização dos experimentos de radioablação e reatividade vascular, respectivamente. Agradeço a* ***Milene*** *e* ***Gisele****, do laboratório da Profa. Luciana Rossoni, grandes amigas, por todo*

ensinamento compartilhado, pelos bons conselhos científicos e pessoais. Meninas, obrigado mesmo por tudo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca do Prof. Paulo Tucci, ***Ednei, Edu, Luis Felipe, Flávio, Helenita e Andrey****, pelas discussões e aprendizados compartilhados, cafés, almoços e churrascos inesquecíveis, mas sobretudo pela amizade adquirida. Em especial Ednei, pela direta contribuição neste trabalho através de sua majestosa habilidade em cirurgia experimental.*

Aos meus pais, ***Daniel (in memoriam) e Silvana*** *cuja história de vida me incentiva melhorar a cada dia. Por todo amor e ensinamentos que possibilitaram meu amadurecimento como filho, irmão, marido, pai e como pessoa. Meu pai, o senhor permanece vivo em meus pensamentos e sonhos. Minha mãe, a senhora é o meu maior exemplo de força e perseverança, lição que levo para toda minha vida. À minha irmã,* ***Jéssica****, pelo carinho e confiança. Obrigado pelo amor incondicional. Amo vocês...*

Agradeço, de todo o meu coração, à minha amada esposa e companheira, ***Regiane*** *por tudo que vivemos e aprendemos juntos. Agradeço por seu amor e por compartilhar a vida ao meu lado, nas horas alegres e nas menos felizes, me estimulando, aconselhando e me ajudando na escolha de melhores soluções para um novo porvir. Você me instiga a procurar melhorar sempre, crescer sempre e por conta disso, a minha admiração e respeito por você. Obrigado por tudo o que você fez e faz por nós, abrindo mão de muitos dos seus anseios para cuidar da nossa família. Obrigado pelo Gustavo, o nosso filho querido e espero que possamos repetir a experiência em breve. Te amo!*

*Ao meu filho **Gustavo** por, desde sempre, transformar a minha vida com sua presença e com seu sorriso. Todas as vezes que me vejo neste menino, é sempre uma oportunidade de refletir sobre a vida e como ela se renova. Eu te amo mais do que tudo neste mundo...*

*Aos meus sogros, **Reginaldo e Sandra**, por terem me recebido como um filho no seio da família de vocês. Juntamente com suas filhas **Thais, Tamires e Aline** sempre nos proporcionaram momentos agradáveis durante nossas viagens à Terra Rica-PR. Muito obrigado por tudo, especialmente por me fazerem sentir em casa...*

*Aos **animais de experimentação**, meu eterno respeito e gratidão!*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro ao processo nº 2014/17135-9, tornando viável o desenvolvimento desta tese!*

“O senhor é o meu pastor, nada me faltará”.

(Salmos 23:1)

“O homem que não se dá mais valor

está à mercê da vontade de qualquer um”.

(Ayn Rand)

Se não puder voar, corra.

Se não puder correr, ande.

Se não puder andar, rasteje,

mas continue em frente

de qualquer jeito.

(Martin Luther King)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIAÇÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 21

1.1. Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca 21
1.1.1. Ativação do sistema nervoso simpático na IC 22
1.1.2. Ativação do sistema-renina angiotensina na IC 24
1.1.3. Ativação de sistemas-neuro-humorais na IC 28
1.1.4. Remodelamento ventricular na IC 29
1.2. Dipeptidil peptidase IV 32

2. OBJETIVOS 40

3. MATERIAL E MÉTODOS 42

3.1. Modelo Experimental 42
3.2. Indução de Insuficiência Cardíaca 42
3.3. Grupos Experimentais 44
3.4. Determinação dos níveis circulantes de BNP total 46
3.5. Avaliação dos parâmetros biométricos 47
3.6. Análises Histomorfométricas e Imunohistoquímica 47
3.6.1. Volume Nuclear 48
3.6.2. Quantificação de Fibrose Intersticial Cardíaca 49
3.6.3. Imunohistoquímica 49
3.7. Determinação da Atividade da DPPIV 50
3.8. Homogeneização das Amostras 51
3.9. Determinação da Concentração de Proteínas 51
3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e immunoblotting 51
3.11. Determinação da concentração sérica de GLP-1 52
3.12. Determinação da concentração intra-cardíaca de Angiotensina II 52
3.14. Análise Estatística 53

4. RESULTADOS 55

4.1. Determinação dos níveis de BNP total circulante 55
4.2. Parâmetros Biométricos 56
4.3. Determinação do volume nuclear do cardiomiócito e fibrose intersticial em tecido cardíaco remanescente ao infarto 58
4.4. Atividade e abundância da DPPIV plasmática e tecidual 59

5. DISCUSSÃO 66

6. CONCLUSÕES 75

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIMBOLOS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AT1	Receptor AT1
AT2	Receptor AT2
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
BSA	Albumina sérica bovina
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
DPPIV	Dipeptidil peptidase IV
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro Padrão da Média
FACS	Citometria de fluxo
FBS	Soro fetal bovino
FDA	*Food and Drug Administration*
g	Grama
GIP	Polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
GLP-1R	Receptor de GLP-1
HF	Heart failure
IC	Insuficiência Cardíaca
IM	Infarto agudo do miocárdio
KDa	Kilodalton
N	Normal
n	Número amostral
NHE3	Isoforma 3 do trocador Na+/H+
NO	Óxido nítrico
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RPM	Rotação por minuto
SDF-1α	Fator-1 alfa derivado do estroma
sDPPIV	Dipeptidil peptidase solúvel
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema-renina angiotensina aldosterona
SUS	Sistema único de saúde
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da retenção de sódio e água na IC 26

Figura 2. Aumento de expressão de AQP2 no córtex renal de ratos com IC 28

Figura 3. Efeitos da inibição da DPPIV sobre a relação pressão-volume (P-V) sistólica final (ESPVR) e sobre a relação pressão-volume (P-V) diastólica final do ventrículo esquerdo (EDPVR) de ratos submetidos à injúria do miocárdio 36

Figura 4. Sequência de eventos para induzir lesão por radioablação no ventrículo esquerdo 44

Figura 5. Desenho Experimental 46

Figura 6. Determinação dos níveis circulantes do peptídeo natriurético cerebral (BNP) nos animais Sham e com insuficiência cardíaca experimental tratados com veículo (HF), valsartan (HF + Val), inibidor da DPPIV vildagliptina (HF + Vil) e associação de vildagliptina com valsartan (HF + Assoc). 6 e 10 semanas após a cirurgia de ablação do VE 56

Figura 7. Avaliação dos parâmetros biométricos dos animais Sham e com insuficiência cardíaca experimental tratados com veículo (HF), valsartan (HF + Val), inibidor da DPPIV vildagliptina (HF + Vil) e associação de vildagliptina com valsartan (HF + Assoc) 57

Figura 8. Avaliação histológica do remodelamento cardíaco 59

Figura 9. Avaliação da atividade da DPPIV nos animais Sham e com insuficiência cardíaca experimental tratados com veículo (HF), valsartan (HF + Val), inibidor da DPPIV vildagliptina (HF + Vil) e associação de vildagliptina com valsartan (HF + Assoc) 60

Figura 10. Expressão da DPPIV no coração de ratos Sham e HF tratados com veículo, vildagliptina e/ou valsartan 61

Figura 11. Marcação imunohistológica da DPPIV no coração. Imagens representativas de cortes histológicos de tecido cardíaco corado com anticorpo anti-DPPIV..... 62

Figura 12. Avaliação dos níveis séricos do peptídeo-1 semelhante ao glucagon em ratos Sham e HF tratados com veículo, vildagliptina e/ou valsartan 63

Figura 13. Avaliação da concentração plasmática de angiotensina II em ratos Sham e HF tratados com veículo, vildagliptina e/ou valsartan 64

RESUMO

Arruda-Junior DF. *Efeito combinado da vildagliptina e do valsartan no tratamento da insuficiência cardíaca em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A inibição da dipeptidil peptidase IV (DPPIV), enzima responsável pela degradação do hormônio incretina peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), representa uma terapia efetiva e segura para os pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Contudo, devido à miríade de ações fisiológicas do GLP-1, além de seus outros substratos endógenos, o efeito da inibição da atividade da DPPIV pode ir muito além do benefício glicêmico, promovendo ações cardio, vaso e renoprotetoras. Neste contexto, dados publicados previamente por nosso laboratório demonstram que na insuficiência cardíaca (IC) não associada ao diabetes há aumento da atividade e da abundância da DPPIV no plasma e no endotélio cardíaco, sugerindo que esta peptidase desempenhe papel importante na fisiopatologia da IC. Consistente com esta ideia, demonstramos que a inibição da DPPIV atenua significativamente a disfunção cardíaca em ratos submetidos à injúria miocárdica por meio de ablação com radiofrequência. Esta melhora inclui diminuição da pressão final diastólica do ventrículo esquerdo, aumento da performance sistólica e diminuição da rigidez da câmara cardíaca. O papel central do sistema renina-angiotensina na fisiopatologia da IC é bem estabelecido. A angiotensina II é um potente vasoconstritor arterial e mediador importante da retenção renal de sódio e água em túbulos renais. Além disso, a angiotensina II potencializa a liberação neural de catecolaminas, é arritmogênica, promove hiperplasia vascular e hipertrofia miocárdica patológica, bem como estimula a morte dos cardiomiócitos. Em consequência, o antagonismo dos receptores de angiotensina II constitui uma das bases do tratamento da IC. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a associação entre um inibidor da DPPIV e um antagonista do receptor de angiotensina II promove efeitos terapêuticos sinérgicos quando administrados a ratos com insuficiência cardíaca congestiva. Para tal, ratos Wistar pesando ±250g foram submetidos à ablação por radiofrequência do ventrículo esquerdo para indução de insuficiência cardíaca (HF) ou cirurgia fictícia (Sham). Seis semanas após a cirurgia os ratos foram distribuídos em 5 grupos e tratados por via oral (gavagem) durante quatro semanas: 1) Sham + Veículo (água); 2) HF + Veículo (água); 3) HF + Valsartan (30mg/kg/dia); 4) HF + Vildagliptina (120mg/kg/dia); 5) HF + Assoc (120 mg/kg/dia Vildagliptina + 30 mg/kg/dia Valsartan). Os ratos com IC tratados com veículo apresentaram elevação do BNP plasmático total, congestão pulmonar, hipertrofia cardíaca e maior deposição de colágeno em miocárdio remanescente quando comparado ao grupo Sham. Por sua vez, tanto a monoterapia com valsartan ou vildagliptina como o tratamento combinado reduziram significativamente os níveis circulantes de BNP. Além disso, todos os tratamentos foram eficazes em diminuir a congestão pulmonar, hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial em comparação ao grupo IC. O grupo HF + Veículo apresentou maior atividade e abundância da DPPIV no plasma e coração comparado com os ratos Sham. De maneira interessante, verificamos que a atividade da DPPIV no plasma e no coração foi

menor não somente nos ratos HF que receberam vildagliptina, mas também naqueles que receberam monoterapia com valsartan, em comparação aos ratos HF tratados com veículo. Adicionalmente, relatamos que o inibidor da DPPIV vildagliptina reduz a concentração de angiotensina II cardíaca, ao passo que o antagonista do receptor AT1 valsartan é capaz de reduzir a atividade da DPPIV no plasma e no coração de ratos com IC. Em conjunto, estes dados sugerem que não há efeito cardioprotetor aditivo da administração de inibidor da DPPIV e de antagonista de receptor AT1 em ratos com IC muito possivelmente em decorrência de uma possível sobreposição de vias cardioprotetoras ativadas por estes fármacos.

Descritores: Insuficiência cardíaca; Dipeptidil peptidase 4, Peptídeo 1 semelhante ao glucagon; Sistema renina-angiotensina, Vildagliptina, Valsartana

ABSTRACT

Arruda-Junior DF. *Combinated effect of vildagliptin and valsartan on the treatment of heart failure in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), an enzyme responsible for the degradation of glucagon-like incretin peptide-1 (GLP-1), represents an effective and safe therapy for patients with type 2 diabetes mellitus. However, due to the multiple actions of GLP-1, besides its other endogenous substrates, the effect of inhibition of DPPIV activity can go far beyond the glycemic benefit, promoting cardio, vaso and renoprotective actions. In this context, data previously published by our laboratory demonstrate that in heart failure (HF) not associated with diabetes there is an increase in the activity and abundance of DPPIV in plasma and cardiac endothelium, suggesting that this peptidase plays an important role in the pathophysiology of HF. Consistent with this idea, we demonstrated that the inhibition of DPPIV significantly attenuates cardiac dysfunction in rats submitted to myocardial injury through radiofrequency ablation. This improvement includes decreased left ventricular end-diastolic pressure, increased systolic performance, and decreased cardiac stiffness. The central role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of HF is well established. Angiotensin II is a potent vasoconstrictor and important mediator of renal retention of sodium and water in renal tubules. In addition, angiotensin II potentiates the neural release of catecholamines, is arrhythmogenic, promotes vascular hyperplasia and pathological myocardial hypertrophy, as well as stimulates the death of cardiomyocytes. As a consequence, angiotensin II receptor antagonism is one of the bases of HF treatment. In view of the foregoing, this study aimed to test the hypothesis that the association between a DPPIV inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist promotes synergistic therapeutic effects when administered to rats with congestive heart failure. For this, Wistar rats weighing ± 250g were submitted to left ventricular radiofrequency ablation for induction of heart failure (HF) or sham surgery (Sham). Six weeks after surgery the rats were divided into 5 groups and treated orally (gavage) for four weeks: 1) Sham + Vehicle (water); 2) HF + Vehicle (water); 3) HF + Valsartan (30mg / kg / day); 4) HF + Vildagliptin (120mg / kg / day); 5) HF + Assoc (120 mg / kg / day Vildagliptin + 30 mg / kg / day Valsartan). Vehicle-treated HF rats showed elevated total plasma BNP, pulmonary congestion, cardiac hypertrophy and increased collagen deposition in the remaining myocardium when compared to the Sham group. On the other hand, both valsartan or vildagliptin monotherapy and combined treatment significantly reduced circulating levels of BNP. In addition, all treatments were effective in reducing pulmonary congestion, cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis compared to the HF group. The HF + Vehicle group had higher activity and abundance of DPPIV in plasma and heart compared to Sham rats. Interestingly, we found that plasma and heart DPPIV activity was lower not only in HF rats receiving vildagliptin but also in those receiving valsartan monotherapy compared to vehicle treated HF rats. Additionally, we report that the DPPIV inhibitor vildagliptin reduces the concentration of cardiac angiotensin II, whereas

the valsartan AT1 receptor antagonist is able to reduce the activity of DPPIV in the plasma and heart of rats with HF. Taken together, these data suggest that there is no additive cardioprotective effect of the administration of DPPIV inhibitor and AT1 receptor antagonist in rats with HF quite possibly due to a possible overlap of cardioprotective pathways activated by these drugs.

Descriptors: Heart failure; Dipeptidyl-Peptidase IV; Glucagon-like peptide 1; Renin-angiotensin system, Vildagliptin, Valsartan.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) representa um problema grave de saúde pública, constituindo uma das maiores causas de incapacitação e morte no país e no mundo moderno. No Brasil, segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS), entre janeiro de 2008 e janeiro de 2013, houve 1.326.784 internações devidas à IC, que atingiram o custo global de R$ 1.479.870.807,06 (DATASUS). O aumento da expectativa de vida das populações e o fato da IC ser a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares sugere fortemente que o encargo econômico associado a esta síndrome continuará a progredir. Tais aspectos justificam o empenho em se obter maior conhecimento sobre a síndrome da IC, notadamente no que se refere a viabilizar o desenvolvimento de novos procedimentos preventivos e terapêuticos.

A IC é uma síndrome clínica, classicamente definida como falência do coração em propiciar suprimento adequado de sangue em relação ao retorno venoso e às necessidades metabólicas teciduais, ou pode fazê-lo apenas a partir do aumento da pressão de enchimento ventricular (1, 2). Muitas são as etiologias da IC e doenças como hipertensão, infarto do miocárdio e diabetes são importantes fatores de risco.

1.1. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca

A IC pode ser vista como uma doença progressiva iniciada após um “evento índice”, que pode ser um dano no músculo cardíaco, com resultante perda dos cardiomiócitos funcionantes, ou, alternativamente, interrupções da capacidade do miocárdio gerar força, impedindo assim, a contração normal do coração. Este evento índice pode começar de modo abrupto, como no caso do

infarto agudo do miocárdio; pode ter início gradual ou insidioso, como na sobrecarga hemodinâmica de pressão ou volume; ou ser hereditário, conforme ocorre nas cardiomiopatias genéticas. Independentemente da natureza do insulto deflagrador, o que é comum a cada um destes eventos é que todos, de alguma maneira, produzem declínio da capacidade bombeadora do coração. Após este declínio, uma variedade de mecanismos compensatórios é ativada, incluindo o sistema nervoso simpático (SNS), sistema-renina angiotensina aldosterona (SRAA) e mediadores inflamatórios (3). Em curto prazo, estes sistemas são capazes de restaurar a função cardiovascular para a faixa homeostática normal e, como resultado, o paciente permanece assintomático. Contudo, com o tempo, a ativação sustentada desses sistemas pode levar a danos secundários finais do ventrículo, com piora do remodelamento do ventrículo esquerdo e subsequente descompensação cardíaca (4). Como consequência da piora do remodelamento do ventrículo esquerdo e da descompensação cardíaca, os pacientes evoluem de assintomáticos para sintomáticos.

1.1.1. Ativação do sistema nervoso simpático na IC

A redução do débito cardíaco na IC ativa uma série de adaptações que tentam manter a homeostasia cardiovascular. Uma das mais importantes adaptações é a ativação do SNS. Na IC, a ativação do SNS é acompanhada por concomitante redução do tônus parassimpático. Em condições normais de impulso inibitório, os barorreceptores do seio carotídeo e arco aórtico de elevada pressão e os mecanorreceptores de baixa pressão são os principais inibidores da atividade simpática, ao passo que a descarga dos quimiorreceptores

periféricos não barorreceptores e metaborreceptores musculares é o maior impulso excitatório para a atividade simpática. O braço vagal do reflexo barorreceptor de frequência cardíaca é também responsivo ao impulso inibitório aferente do barorreceptor arterial. Indivíduos saudáveis apresentam baixa descarga simpática em repouso e elevada variabilidade da frequência cardíaca. Contudo, o impulso inibitório dos barorreceptores e dos mecanorreceptores em pacientes com IC diminui e o impulso excitatório aumenta, resultando, finalmente, em aumento generalizado da estimulação do nervo simpático e em redução da estimulação parassimpática, com consequente perda da variabilidade da frequência cardíaca e aumento da resistência vascular periférica.

Como resultado do aumento do tônus simpático, há aumento dos níveis circulantes de norepinefrina, potente neurotransmissor adrenérgico. Os níveis elevados de norepinefrina resultam da combinação entre aumento de liberação dos terminais dos nervos adrenérgicos e seu extravasamento no plasma com reduzida captação pelas terminações nervosas adrenérgicas. Em pacientes com IC avançada, os níveis circulantes de norepinefrina durante o repouso são duas a três vezes mais altos que os encontrados em indivíduos saudáveis. Além disso, níveis plasmáticos de norepinefrina predizem mortalidade em pacientes com IC.

A ativação simpática aumentada dos receptores beta-1 adrenérgicos resulta em aumento da frequência cardíaca e da força miocárdica de contração, com aumento do débito cardíaco. Ademais, a atividade aumentada do sistema nervoso adrenérgico leva à estimulação dos receptores alfa-1 adrenérgicos miocárdicos, que induz modesto efeito inotrópico positivo, bem como vasoconstrição arterial periférica. Apesar da norepinefrina aumentar tanto a

contração como o relaxamento e manter a pressão arterial, a energia miocárdica requerida está aumentada, podendo intensificar a isquemia quando a oferta de oxigênio está restrita. O fluxo adrenérgico do sistema nervoso central pode também desencadear taquicardia ventricular ou até morte súbita, particularmente na presença de isquemia miocárdica. Assim, a ativação do SNS produz suporte em curto prazo que tem o potencial de tornar-se mal adaptativo a longo prazo.

1.1.2. Ativação do sistema-renina angiotensina na IC

A estimulação simpática no rim estimula a liberação de renina pelas células granulares do aparelho justaglomerular. A renina cliva o angiotensinogênio circulante, sintetizado no fígado, formando o decapeptídeo angiotensina I que é biologicamente inativo. A enzima conversora de angiotensina (ECA) cliva os dois primeiros aminoácidos da angiotensina I, gerando o octapeptídeo angiotensina II. Cabe ressaltar que nas últimas décadas, descobriu-se a existência de SRAs locais com função e regulação independente do SRA sistêmico e presente em diversos tecidos incluindo o coração e rins. A Ang II circulante ou local pode se ligar a dois diferentes receptores acoplados à proteína G: o receptor de angiotensina tipo I (AT1) e receptor de angiotensina tipo 2 (AT2). Entretanto, tendo em vista a alta afinidade da Ang II pelo receptor AT1, grande parte das atividades biológicas da Ang II nos rins, coração, vasos e cérebro, é mediada via AT1. A ativação do receptor AT1 leva à vasoconstrição, ao crescimento celular, à secreção de aldosterona, retenção renal de sal e água e à liberação de catecolaminas, enquanto a ativação do AT2 leva à vasodilatação, à inibição do crescimento celular, à natriurese e à liberação de

bradicinina (1, 5). A Ang II exerce várias ações que são críticas para a manutenção da homeostase circulatória em curto prazo. Contudo, a ação prolongada da Ang II é mal adaptativa e leva à fibrose cardíaca, renal e de outros órgãos. A Ang II pode também causar piora da ativação neuro-hormonal pelo aumento da liberação de norepinefrina das terminações nervosas simpáticas, bem como por estimular a zona glomerulosa do córtex adrenal a produzir aldosterona.

Nos rins, a aldosterona aumenta a expressão e inserção na membrana do canal epitelial para sódio (ENaC), aumentando consequentemente, a reabsorção de sódio em células principais do ducto coletor. A ação sustentada da aldosterona provoca hipertrofia e fibrose na vasculatura e no miocárdio, contribuindo, desse modo para a reduzida complacência vascular e o aumento do enrijecimento ventricular. Além disso, a aldosterona provoca disfunção das células endoteliais, disfunção dos barorreceptores e inibição da captação de norepinefrina pelos terminais sinápticos, contribuindo para piorar a IC. O mecanismo de ação da aldosterona no sistema cardiovascular parece envolver estresse oxidativo com resultante inflamação dos tecidos-alvo. A importância da aldosterona, independentemente da Ang II, foi demonstrada em estudos clínicos que mostraram que baixas doses de espironolactona, antagonista de receptor de mineralocorticoide, ao qual a aldosterona se liga, aumentaram a sobrevida de pacientes com IC sistólica e a sobrevida após infarto agudo do miocárdio.

Uma das marcas da IC avançada é a retenção de sódio e água pelos rins (Figura 1) (6). Entretanto, a causa primária deste aumento não é disfunção renal. Ao contrário, os rins são, a princípio, funcionalmente competentes e fazem o que deles se espera, ou seja, respondem como se o organismo estivesse diante de

uma hipovolemia real. De fato, é a redução crônica do volume de sangue arterial efetivo, também chamada de subpreenchimento arterial, o determinante primário dos distúrbios hidroeletrolíticos na IC.

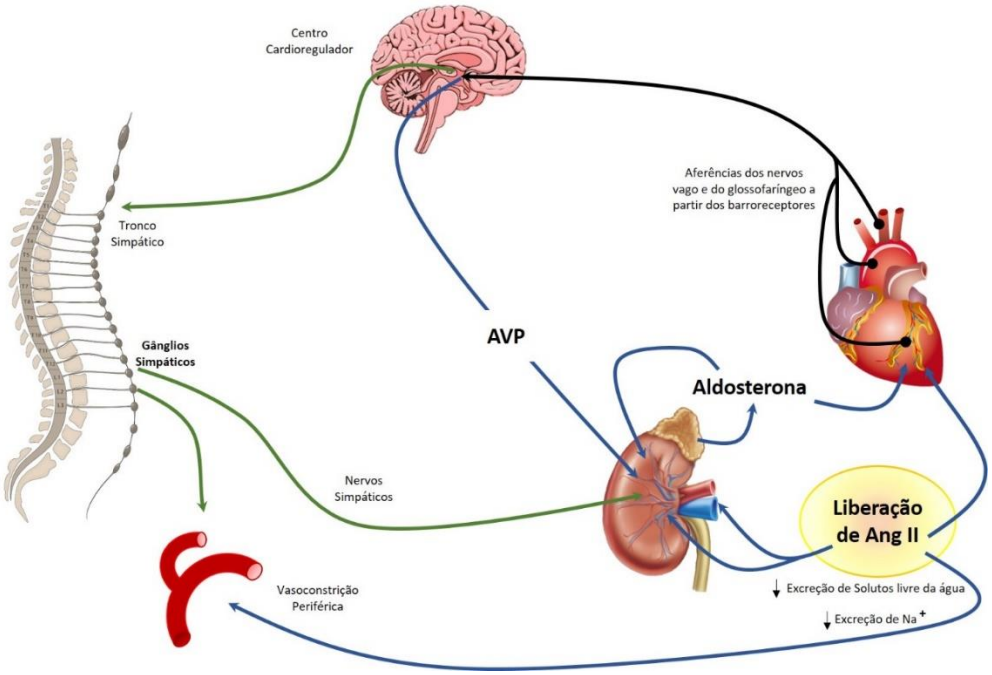

Figura 1. Fisiopatologia da retenção de sódio e água na IC. Descarga de barorreceptores de alta pressão (linhas azuis) no ventrículo esquerdo, seio carotídeo e arco aórtico gera sinais aferentes (linhas pretas) que estimulam o centro cardiorregulatório no cérebro, resultando na ativação de vias eferentes no SNS (linhas verdes). O SNS parece ser o principal integrador da resposta neuro-humoral vasoconstritora ao enchimento arterial. Ativação de nervos simpáticos renais estimula a liberação de renina e ANG II, ativando o SRAA. Concomitantemente, estimulação simpática dos núcleos supra-óptico e paraventriculares no hipotálamo resulta na liberação não-osmótica de AVP. A ativação simpática também causa vasoconstrição renal e periférica, assim como a ANG II. ANG II contrai os vasos sanguíneos e estimula a liberação de aldosterona pela glândula supra-renal, e também aumenta a reabsorção de sódio e causa remodelamento de miócitos cardíacos. A aldosterona também pode exercer efeitos cardíacos diretos, além de aumentar a reabsorção de sódio e a secreção de íons potássio e hidrogênio no ducto coletor. As linhas azuis designam hormônios circulantes. Adaptado de: Cadnapaphornchai MA **2001 (6).**

A queda de pressão ocasionada pelo subpreenchimento arterial sensibiliza os barorreceptores localizados no ventrículo esquerdo, arco aórtico, seio carotídeo e arteríolas aferentes renais e geram sinais aferentes que estimulam centro cardiorregulatório no cérebro, resultando na ativação de vias eferentes no SNS. O decorrente aumento de catecolaminas circulantes e nos terminais sinápticos elevam a resistência vascular periférica e renal. O aumento do tônus adrenérgico renal estimula o SRAA, conforme já descrito, promovendo ávida retenção de sal e água (6).

O aumento da retenção de sódio é mediada por efeitos diretos estimulatórios da Ang II sobre a reabsorção de sódio mediada pela isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) em túbulo proximal renal (7, 8) bem como pelas ações da aldosterona sobre o ENaC em néfron distal (8). Ademais, a ativação do SNS estimula os núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo aumentando a liberação não osmótica de vasopressina, que via ativação de receptores V2, aumenta a reabsorção de água, por meio da inserção de canais para água (aquaporina-2) na membrana apical das células do ducto coletor. A vasopressina, via receptores V1, contribui para piora da vasoconstrição periférica, bem como para produção aumentada de endotelina. A Ang II estimula o centro da sede no cérebro e também provoca liberação de vasopressina. O aumento da expressão proteica de AQP2 e aumento do tráfego desta isoforma do canal de água para a membrana apical das células do ducto coletor tem sido documentado em modelos de IC experimental em associação com retenção de água e hiponatremia (6). (Figura 2) (9).

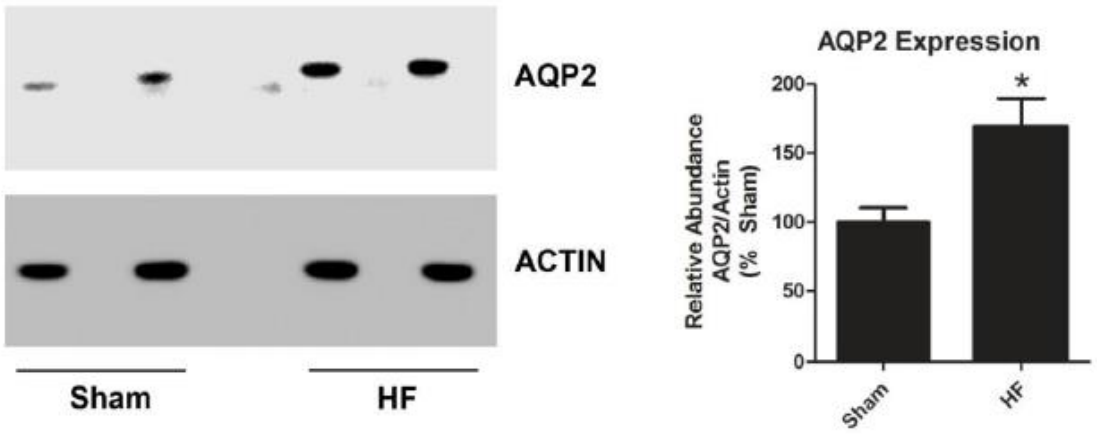

Figura 2. Aumento de expressão de AQP2 no córtex renal de ratos com IC. Esquerda: immunoblot representativo da expressão de AQP2 em córtex renal de ratos Sham e HF foram sujeitos a SDS-PAGE, transferido para membranas de PVDF, e analisados por immunoblotting. As membranas foram incubadas com anticorpo policlonal contra AQP2 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnologies) e com anticorpo monoclonal contra actina (1:50,000; clone JLA20, Merck). Direita: Gráfico da expressão proteica relativa de AQP2 em membranas de córtex renal. Valores são média ± EP; n = 4 ratos/grupo. *P<0.05 vs. Sham. (9).

1.1.3. Ativação de sistemas-neuro-humorais contrarregulatórios na IC

Um número considerável de sistemas neuro-hormonais contrarregulatórios torna-se ativado na tentativa de compensar os efeitos deletérios dos neuro-hormônios anti-natriuréticos e vasoconstritores. Um dos mais importantes sistemas contrarregulatórios que se tornam ativados na IC estão os peptídeos natriuréticos, incluindo o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP). Em condições fisiológicas, o ANP e o BNP são secretados em aumento ao estiramento do átrio ou do ventrículo. Uma vez liberados, os peptídeos natriuréticos promovem vasodilatação, diurese e natriurese. Mais especificamente, tanto o ANP como o BNP aumentam o ritmo de filtração glomerular e inibem a reabsorção tubular de sódio em néfron distal.

Adicionalmente, promovem inibição do SRAA e do SNS produzindo vasodilatação sistêmica em nível venoso e arterial, além de exercer efeito vasodilatador regional renal. Exercem também efeitos endócrinos e parácrinos nos cardiomiócitos com ações anti-fibróticas, anti-hipertróficas e anti-inflamatórias (1, 5, 10, 11). Contudo, os efeitos dos peptídeos natriuréticos parecem atenuar com a piora da IC, levando a ausência de oposição aos efeitos do SRAA e SNS e de mediadores pró-inflamatórios. As razões potenciais para esta atuação incluem o aumento da atividade de enzimas que clivam e inativam/diminuem a atividade biológica destes peptídeos, como exemplo, a dipeptidil peptidase, bem como diminuição da atividade/expressão de enzimas que ativam estes peptídeos como a corin, uma vez que não foi constada alteração na expressão de receptores para estes peptídeos.

Além dos peptídeos natriuréticos, os neuro-hormônios vasoconstritores ativam outras respostas contrarregulatórias como a liberação de óxido nítrico (NO). Em condições normais, a liberação contínua de NO do endotélio contrabalanceia os fatores vasoconstritores e permite respostas vasodilatadoras apropriadas. Contudo, com a progressão da IC, existe a perda da responsividade vasodilatadora dependente do endotélio, que contribui para a excessiva vasoconstrição emblemática da IC avançada. Esta perda da responsividade vasodilatadora é em grande parte explicada pela inibição da atividade e expressão da isoforma 3 da óxido nítrico sintase (NOS).

1.1.4. Remodelamento ventricular na IC

O remodelamento ventricular, um dos principais mecanismos de progressão da IC, é o processo pelo qual fatores mecânicos, neuro-hormonais e

genéticos alteram o tamanho, a forma e função ventricular. Pode ser definido por alterações moleculares, celulares e intersticiais no miocárdio, levando a modificações no tamanho, na massa, geometria e na função do coração, como resultado de uma agressão ao miocárdio. Este processo adaptativo inicia-se como mecanismo compensatório a fim de manter a função contrátil e preservar o estresse da parede. Entretanto, com a degeneração da função miocárdica, este processo contribui para a piora da IC.

Conforme o tipo de estímulo, o remodelamento ventricular pode ocorrer de duas maneiras distintas: 1) Na sobrecarga pressórica, como na hipertensão arterial ou estenose aórtica valvar, proteínas contráteis e novos sarcômeros são acrescentados aos miócitos cardíacos existentes em paralelo com os miócitos presentes. Isso aumenta a espessura da parede e reduz o raio da câmara cardíaca, resultando em redução do estresse sistólico na parede. Como a fração de ejeção do ventrículo esquerdo é inversamente proporcional ao estresse sistólico na parede, esse mecanismo compensatório contribui para manutenção de um volume sistólico normal do ventrículo esquerdo. A desvantagem do remodelamento concêntrico advém da redução da complacência do ventrículo esquerdo que se origina deste padrão de hipertrofia, a pressão diastólica do ventrículo esquerdo é aumentada em qualquer volume do VE dado, predispondo a sintomas congestivos. 2) Em contraste, aumentos persistentes de volume, como na insuficiência valvar esquerda, acarretam hipertrofia no padrão excêntrico. Neste padrão de remodelamento, novas proteínas contráteis são acrescentadas aos miofilamentos existentes em série, o que aumenta a complacência miocárdica e, desse modo, atenua o estresse diastólico na parede. Ao nível de todo o órgão, isso permite recrutamento contínuo da pré-carga sem

elevação significativa da pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Em consequência, o volume sistólico final do VE é aumentado e o débito cardíaco anterógrado, se mantém em pressões de enchimento normais. Essa resposta compensatória encerra consequências: a dilatação progressiva do VE produz aumento secundário do estresse sistólico na parede. Em circunstâncias de sobrecarga persistente de pressão e volume, sobrevêm lesão dos cardiomiócitos e disfunção de bomba em todo o coração, caso as condições anormais responsáveis pela sobrecarga não sejam corrigidas. Essa transição da hipertrofia compensada para disfunção contrátil é o resultado final de sinalização proliferativa mal adaptativa.

No nível molecular, as alterações associadas à transição para a disfunção contrátil incluem: alterações na regulação e expressão de proteínas contráteis, incluindo a diminuição da expressão da isoforma alfa da cadeia pesada da miosina (alfa-MHC), que tem elevada atividade ATPásica, e aumento da expressão fetal beta-MHC, que possui baixa atividade ATPásica; disregulação na homeostase do cálcio, incluindo diminuição da expressão gênica da $Ca2^{+}$-ATPase (SERCA2) e do canal para cálcio do tipo L e aumento da expressão do trocador Na^{+}/Ca^{+}, que levam a alterações do acoplamento excitação-contração; anormalidades nas proteínas do citoesqueleto e dessensibilização beta-adrenérgica.

A morte celular através de vias necróticas, apoptóticas e autofágicas é determinante no remodelamento ventricular porque causa a perda de massa contrátil com consequente hipertrofia das células miocárdicas e fibrose reparativa. De fato, o interstício cardíaco é muito sensível aos mesmos estímulos mecânicos, inflamatórios e neuro-hormonais que afetam o crescimento dos

miócitos. A fibrose provoca rigidez miocárdica e heterogeneidade mecânica e elétrica que desempenham papel importante na gênese de arritmias e deterioração das funções sistólica e diastólica.

Recentemente, estudos experimentais realizados por vários laboratórios mostraram que os microRNAs (miRNAs) exercem efeito profundo sobre o remodelamento cardíaco. Os miRNAs são RNAs não codificadores que se pareiam com RNAs mensageiros específicos e regulam sua estabilidade e tradução. De fato, os miRNAs regulam componentes chave do processo de remodelamento, associados à biologia do cardiomiócito, o destino celular, o remodelamento da matriz extracelular e a ativação neuro-hormonal. Especula-se atualmente que os miRNAs podem ser responsáveis por modular a transição de remodelamento adaptativo para patológico, constituindo, portanto, alvos terapêuticos para diminuir a progressão da doença.

Em resumo, a IC desenvolve-se e progride como resultado das alterações deletérias na função cardíaca e no remodelamento cardíaco que ocorre em decorrência da ativação neuro-hormonal sustentada.

1.2. Dipeptidil peptidase IV

A dipeptidil peptidase IV (DPPIV), também conhecida como CD26, é uma serino-peptidase amplamente expressa que pode ser encontrada ancorada na membrana celular de diversos tipos celulares. Níveis elevados de DPPIV são encontrados nos rins, intestino delgado e pulmão; níveis moderados existem no pâncreas, fígado e baço; níveis baixos são encontrados no estômago e no coração, e não existe expressão detectável no cérebro e nos músculos esqueléticos (12). O rim é a principal fonte de DPPIV, onde é uma das principais

proteínas de membrana de borda em escova (13). Dentro dos rins, a DPPIV também está presente nos podócitos e capilares glomerulares (14). Na vasculatura sistêmica, a DPPIV é expressa nas células endoteliais das vênulas e particularmente nos capilares. De fato, em diferentes órgãos e tecidos, como pulmão, músculo e coração, quase toda a atividade do DPPIV tecidual se deve à sua presença na microvasculatura (14, 15).

Notavelmente, uma forma solúvel da DPPIV (sDPPIV) pode ser encontrada no plasma e outros fluidos corporais (14, 16). Existem poucos estudos disponíveis na literatura sobre a origem do sDPPIV. Alguns estudos suportam a hipótese de que o sDPPIV é gerada a partir da clivagem da DPPIV expressa na membrana de linfócitos periféricos, especialmente linfócitos T, através da ação catalítica de uma "sheddase" ainda não identificada (isto é, uma enzima que cliva a porção extracelular de proteínas transmembrana, liberando-as no meio extracelular (14, 17). Assim, alguns relatos mostraram que a expressão da DPPIV em linfócitos está diminuída em estados patológicos em que a atividade e a abundância sérica de DPPIV encontra-se elevada (18, 19). A atividade circulante da DPPIV está aumentada em pacientes obesos e, de fato, o tecido adiposo também foi reconhecido como fonte de sDPPIV (20, 21).

A função da DPPIV consiste em clivar cadeias peptídicas nas quais está presente a prolina ou a alanina, como o segundo aminoácido a partir da extremidade N-terminal (22). Entre os substratos endógenos da DPPIV, cita-se o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), o polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP) e peptídeo natriurético cerebral (BNP) (23). O substrato da DPPIV mais amplamente estudado é o hormônio incretina peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), que desempenha papel fundamental na

manutenção da homeostase sistêmica da glicose. Em 2000, Marguet e colaboradores (24) demonstraram que a forma insulinotrópica intacta circulante de GLP-1 (25) encontra-se preservada em camundongos knockout para DPPIV e que a deleção genética específica ou a inibição farmacológica da DPPIV melhora a secreção de insulina e a tolerância à glicose. Não muito depois disso, o primeiro inibidor da DPPIV, a sitagliptina, foi aprovado pelo FDA para controlar a homeostase da glicose em pacientes diabéticos tipo II. Atualmente, vários inibidores da DPPIV, conhecidos como gliptinas, estão aprovados para uso como medicamentos antidiabéticos em todo o mundo.

Além da sua atividade como exopeptidase, a DPPIV também funciona como uma proteína de ligação. No túbulo proximal renal, a DPPIV interage com NHE3 (26). O NHE3 desempenha um papel crítico na reabsorção de sódio, na homeostase do volume extracelular e no controle da pressão arterial (27). A inibição da DPPIV reduz a atividade do NHE3 in vitro e in vivo (28, 29), ressaltando o possível papel da DPPIV na retenção de líquidos. Além disso, a DPPIV liga-se diretamente ao colágeno (30, 31) e à fibronectina (32, 33).

Estudos recentes têm demonstrado que os inibidores da DPPIV podem exercer efeitos cardioprotetores e renoprotetores além da redução da glicose. Estas ações benéficas podem também ser atribuídas, pelo menos parcialmente, ao aumento da biodisponibilidade do GLP-1. Após a ligação do GLP -1 em seu receptor (GLP-1R), no coração, que induz a ativação das vias de sinalização citoprotectores AMPc/PKA e de PI3K/Akt, reduz apoptose, aumenta captação de glicose no coração independente de insulina, reduz o tamanho do enfarte e melhora fluxo sangüíneo coronariano, por meio de suas ações vasodilatadoras (34-38). GLP-1 e seus análogos exercem também efeitos natriuréticos em

humanos e em modelos experimentais, e acredita-se que esse mecanismo esteja relacionado, ao menos em parte, com a inibição da atividade do NHE3 em túbulo proximal renal.

É importante ressaltar que, embora o BNP seja um substrato reconhecido da DPPIV e possua diversas ações que beneficiam o sistema cardiovascular, como a diminuição do cálcio intracelular e conseqüente inibição de vias hipertróficas, inibição da secreção de renina, vasodilatação e efeitos natriuréticos (39, 40), os estudos que relacionam a ação do BNP e da DPPIV ainda são escassos. Ademais, foi demonstrado que o produto da clivagem do BNP pela DPPIV, denominado BNP (3-32), possui menor ação vasodilatadora e natriurética quando comparado com a forma madura, biologicamente ativa, BNP (1-32), evidenciando assim, o papel da DPPIV na biodisponibilidade deste peptídeo (41).

Uma vez que os produtos decorrentes da clivagem da DPPIV sobre esses peptídeos possuem caráter inativo ou de baixa ação biológica, e análogos da forma ativa destes peptídeos melhoram a função cardíaca em modelos experimentais (41, 42), testamos a hipótese que a atividade e/ou expressão da DPPIV poderiam estar elevadas na IC e que o tratamento com inibidores da DPPIV melhoraria a função cardíaca em modelo experimental de IC.

Consistente com esta ideia, ratos que foram submetidos à lesão miocárdica por meio de ablação por radiofrequência (43) e desenvolveram IC após 6 semanas, apresentam níveis e atividade aumentados da DPPIV no plasma e no coração quando comparados ao grupo controle (Sham).

A fim de corroborar o papel da enzima na fisiopatologia da IC, um grupo de animais foi submetido ao tratamento com o inibidor específico da DPPIV

sitagliptina (40mg/kg/dia) por seis semanas após o processo de injúria do miocárdio por ablação de radiofrequência. Estudos hemodinâmicos diretos usando um cateter de condutância de pressão-volume demonstraram que o tratamento com sitagliptina atenua significativamente a disfunção cardíaca em ratos submetidos à injúria miocárdica por meio de ablação com radiofrequência (Figura 3). Entre os efeitos preventivos da inibição da DPPIV inclui-se a diminuição da pressão final diastólica do ventrículo esquerdo, aumento do desempenho sistólico e diminuição da rigidez da câmara cardíaca. O tratamento com sitagliptina também atenua a hipertrofia cardíaca e a fibrose intersticial do miocárdio remanescente.

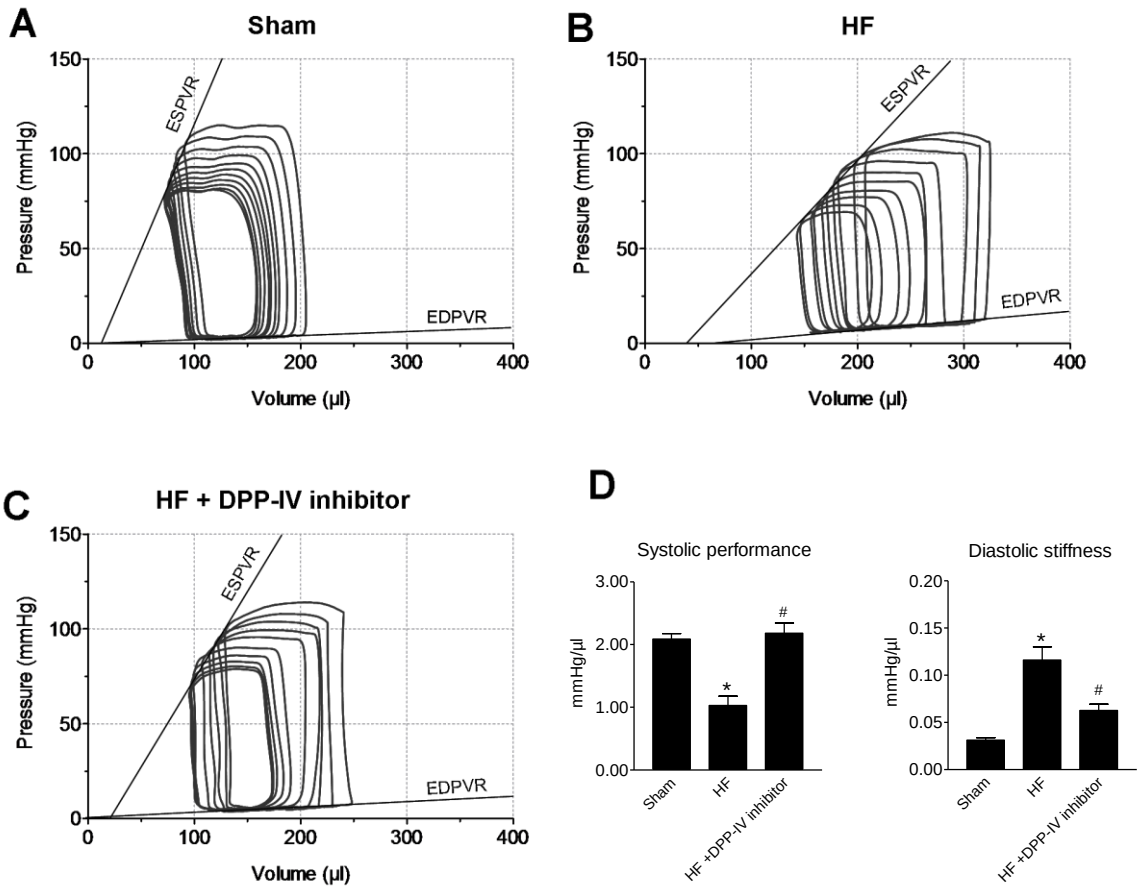

Figura 3 – Efeitos da inibição da DPPIV sobre a relação pressão-volume (P-V) sistólica final (ESPVR) e sobre a relação pressão-volume (P-V) diastólica final do ventrículo esquerdo (EDPVR) de ratos submetidos à injúria do miocárdio. Registros originais de alças P-V em diferentes pré-cargas durante oclusões transitórias da veia cava inferior mostraram diferenças em ESPVR e em EDPVR entre Sham (***A***) e HF (***B***) assim como entre HF e HF + inibidor de DPPIV (***C***). Em ***D*** os valores médios da inclinação de ESPVR (esquerda) representam um índice do desempenho sistólico e da inclinação da EDPVR (direita) como um índice da rigidez diastólica. O declive da relação linear entre volume e pressão sistólica final (ESPVR) foi mais íngreme em ratos Sham, sugerindo um desempenho sistólico diminuído em ratos HF. Entretanto, a ESPVR de ratos com HF tratados com o inibidor da DPPIV foi similar à do Sham (Figura 1D, esquerda). Além disso, a inclinação aumentada da relação pressão-volume (P-V) diastólica final no grupo HF quando comparada ao Sham, sugere um aumento da rigidez da câmara cardíaca, o qual foi significativamente atenuado pela inibição da DPPIV (Figura 1D, direita). $^{*}P < 0.05$ *vs* Sham; $^{\#}P < 0.05$ *vs* HF.

Além disso, a inibição da DPPIV foi capaz de prevenir a diminuição do ritmo de filtração glomerular, o aumento da reabsorção tubular proximal de sódio, assim como minimizar a congestão pulmonar (43). Em conjunto, os dados obtidos sugerem que a inibição da DPPIV exerce ações cardioprotetoras e renoprotetoras que previnem o desenvolvimento de IC em ratos submetidos à injúria miocárdica.

Adicionalmente, demonstramos recentemente que o tratamento com inibidores da DPPIV exerce efeitos não apenas preventivos mas também terapêuticos em ratos com IC, uma vez que o tratamento tardio com o inibidor da DPPIV, vildagliptina, reverteu, ao menos em parte, as alterações estruturais cardíacas e restaurou, parcialmente a função cardíaca, e completamente, a função renal de ratos com IC estabelecida (44).

Tendo em vista que o antagonismo da angiotensina II constitui uma das bases do tratamento da IC, neste estudo testamos a hipótese que a associação

entre um inibidor da DPPIV e um antagonista do receptor de angiotensina II, promove efeitos terapêuticos sinérgicos, quando administrados a ratos com IC.

2. Objetivo

2. OBJETIVO

Testar a hipótese que a associação entre o inibidor da DPPIV (vildagliptina) e o antagonista do receptor de angiotensina II (valsartan) exercem ações terapêuticas sinérgicas em ratos com insuficiência cardíaca.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo Experimental

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP – Processo Nº. 050/17). Foram utilizados ratos Wistar com idade entre três e quatro meses, pesando 250 ± 50g obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto do Coração (InCor) em temperatura ambiente (23 ± 1°C) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, e livre acesso ao consumo de água e ração.

3.2. Indução de Insuficiência Cardíaca

O método para induzir IC em rato por ablação foi originalmente desenvolvido e padronizado no laboratório de Fisiopatologia Cardíaca da UNIFESP (45). Para o procedimento de ablação foi utilizado um gerador de correntes elétricas com radiofrequência da Tecnologia Eletrônica Brasileira Ltda, modelo TEB RF10, que gera correntes elétricas com frequência de 1.000 KHz.

Os animais foram anestesiados com isoflurano, mantidos na posição de decúbito dorsal, intubados e ventilados mecanicamente com pressão positiva em ventilador para roedores (modelo Harvard 683, Holliston, MA, USA). Após tricotomia do hemitórax esquerdo, foi realizada incisão na pele, utilizando-se pinça e tesoura, na linha axilar média, um dedo abaixo da axila. Com auxílio de tesoura curva os músculos peitorais foram afastados e com uma pinça hemostática os músculos intercostais foram divulsionados, dois afastadores

cirúrgicos tipo “Stevenson” foram colocados no espaço intercostal para afastar as costelas e ampliar a toracotomia (Figura 4A). A pata dianteira esquerda do animal foi liberada da posição original de decúbito dorsal e fixada junto à pata dianteira direita para posicionar o tórax em semi-decúbito lateral direito, favorecendo a exposição da face lateral do ventrículo esquerdo ao eletrodo de ablação. O coração foi imobilizado dentro do tórax, em posição favorável para se proceder à ablação da face lateral do ventrículo esquerdo com a pinça-eletrodo (Figura 4B e 4C). Esta manobra foi realizada com a preocupação de segurar o coração com a pinça-eletrodo apenas para imobilizá-lo, sem promover sua compressão. Após pericardiotomia, promovida por meio de pinça anatômica, o eletrodo positivo de ablação foi posicionado na parede anterior do miocárdio (espaço deixado pelas extremidades da pinça-eletrodo) e uma corrente de alta frequência (1,000 KHz,12 watts durante 12 segundos) promovida por gerador de radiofrequência convencional (TEB RF10; Tecnologia Eletrônica Brasileira, São Paulo, Brasil) foi liberada (Figura 4D e 4E). Depois de retirado o eletrodo positivo e visualização da área de lesão (Figura 4F), o coração foi recolocado em sua posição original, foi promovida hiperinsuflação pulmonar e fechamento da toracotomia por sutura em bolsa previamente preparada em torno da incisão. A seguir, o animal foi mantido em ventilação artificial enriquecida com oxigênio até que ocorra ventilação espontânea.

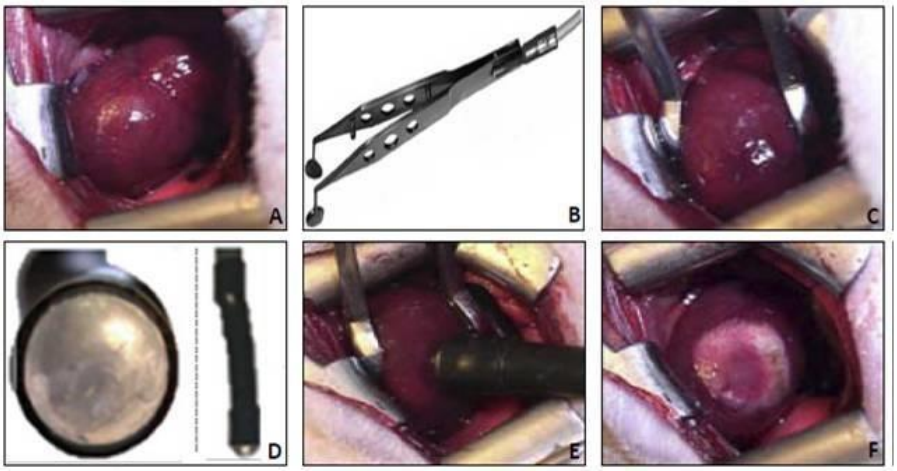

Figura 4. Sequência de eventos para induzir lesão por radioablação no ventrículo esquerdo. (A) Exposição do coração após colocação dos afastadores; (B) Pinça-eletrodo; (C) Estabilização do coração com a pinça-eletrodo; (D) Eletrodo Positivo; (E) Posicionamento do eletrodo positivo na parede anterior do ventrículo esquerdo; (F) Área lesionada imediatamente após corrente ablativa.

Após retirada da ventilação artificial e quando a ventilação se mostrou estável, o animal foi extubado e colocado em caixa plástica e mantido aquecido durante o período pós-operatório, até que se recuperasse completamente da anestesia. Os animais pertencentes ao grupo sham passaram pelos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém não foram submetidos a ablação do miocárdio por radiofrequência e, portanto, não sofreram lesões. Após o procedimento cirúrgico os animais foram medicados com dipirona sódica 20 mg/kg via oral duas ou três vezes ao dia durante 5 a 7 dias.

3.3. Grupos Experimentais

A cirurgia de ablação do VE ou cirurgia fictícia foi realizada na semana “zero” (0) em seguida os ratos foram mantidos em gaiolas no biotério do InCor. Seis semanas após a cirurgia, foi realizada coleta de sangue por via retro-orbital para dosagem de BNP circulante para verificar se os ratos submetidos à cirurgia

de ablação do VE haviam desenvolvido IC. Ratos HF que apresentaram BNP total circulante inferior a 1 ng/mL foram excluídos do estudo. Subsequentemente, os ratos foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais e submetidos aos seguintes tratamentos:

1) HF: Ratos que foram submetidos à ablação por correntes de radiofrequência no ventrículo esquerdo com a intenção de induzir IC. Foram tratados com veículo (água) por gavagem durante quatro semanas.
2) Sham: Ratos que sofreram os mesmos estresses cirúrgicos que os animais acima, porém não foram submetidos à lesão do miocárdio propriamente dita ou qualquer outra lesão semelhante.
3) HF + Val: Ratos submetidos à ablação por radiofrequência no ventrículo esquerdo e tratados com 30 mg/kg de valsartan, uma vez ao dia, durante quatro semanas, por gavagem.
4) HF + Vil: Ratos submetidos à ablação por radiofrequência no ventrículo esquerdo e tratados com 120 mg/kg de vildagliptina, duas vezes ao dia, durante quatro semanas, por gavagem.
5) HF + Assoc: ratos submetidos à ablação por radiofrequência no ventrículo esquerdo e tratados com a associação de vildagliptina (120 mg/kg duas vezes ao dia) e valsartan (30 mg/kg uma vez ao dia), durante quatro semanas, por gavagem.

No final do estudo os ratos foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg/dia) e xilazina (10 mg/kg/dia) para coleta de sangue e, por fim, foram

mortos por decapitação para remoção dos tecidos para posteriores análises biométrica e molecular (Figura 5).

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

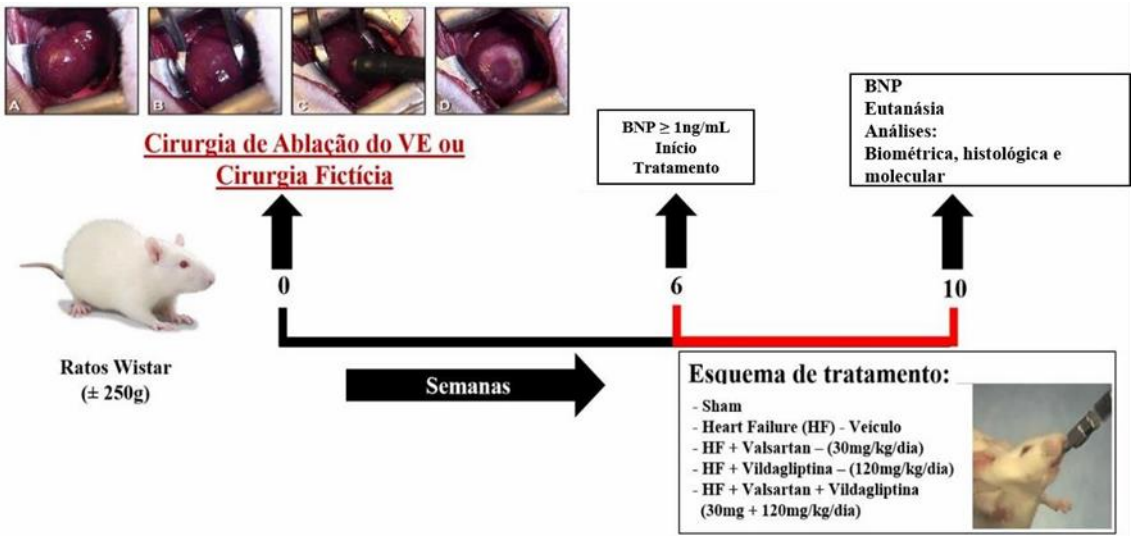

Figura 5. Desenho Experimental. Ratos Wistar pesando ±250g foram submetidos a cirurgia de ablação do ventrículo esquerdo por radiofrequência ou cirurgia fictícia (Sham) na semana zero. Seis semanas após a cirurgia foi coletado sangue para determinação da concentração de BNP. Em seguida os ratos foram aleatoriamente divididos em 5 grupos experimentais, de acordo com a intervenção cirúrgica e tratamento utilizado. O tratamento foi realizado por via oral (gavagem) durante 4 semanas. Dez semanas após a cirurgia, foi coletado sangue e os ratos foram eutanasiados para coleta de material biológico para avaliação biométrica, histológica e molecular.

3.4. Determinação dos níveis circulantes de BNP total

O sangue foi coletado a partir do plexo retro-orbital e imediatamente transferido para um tubo para separação do soro contendo gel separador (BD vacutainer). Os tubos contendo o sangue coletado foram centrifugados a 4000RPM, 4°C por 10 min e as amostras de soro foram armazenadas em freezer

-80°C até o uso. Os níveis séricos de BNP foram determinados por ensaio imuno-enzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (Abcam - Rat BNP 32 ELISA Kit - ab108815).

3.5. Avaliação dos parâmetros biométricos

As análises biométricas e histológicas foram realizadas para avaliar congestão pulmonar, hipertrofia e remodelamento cardíaco. Logo após a retirada do coração, os átrios esquerdo e direito foram descartados e os ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) foram rapidamente pesados para avaliação das massas brutas e corrigidas pelas massas corpóreas de cada animal, como estimativa de hipertrofia miocárdica. Sendo um parâmetro de congestão pulmonar e, consequentemente, do grau de IC, também foi avaliado o teor de água no pulmão que, sabidamente, é uma análise sensível como indicadora da congestão tissular. Para tanto, o pulmão direito foi retirado do animal e pesado imediatamente, obtendo-se a massa úmida (MU) da peça. Tais amostras de tecido foram mantidas em dessecador (70°C) por 24 horas e pesadas fornecendo então a massa seca (MS) da amostra. O teor de água do pulmão foi calculado pela seguinte fórmula tradicionalmente utilizada: % H20 = [(MU – MS) / MU] x 100, onde % H2O é o teor de água no pulmão. Ademais foram avaliadas as massas úmidas e secas dos pulmões indexadas pela respectiva massa corpórea do animal.

3.6. Análises Histomorfométricas e Imunohistoquímica

Após pesagem e secção do VE transversalmente, a metade apical de cada ventrículo foi acondicionada em formol 4% por 24 horas. Em seguida, o

fragmento do VE foi fatiado na transversal e disposto em cassete plástico do tipo processador/inclusor. Os cassetes foram processados em aparelho autotécnico com ciclo total de 12 horas para a desidratação, diafanização e parafinização do material. A desidratação foi realizada com concentrações crescentes de álcool etílico até chegar ao álcool absoluto, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina a 60ºC para obtenção de cortes de 3 µm em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035). A seguir, os cortes foram colocados em lâminas mantidas à temperatura de 37ºC para secagem, colagem e posterior coloração. As imagens foram visualizadas em microscópio ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Solutions) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (Leica QWin Plus V.3.2.0., Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

3.6.1. Volume Nuclear

Como parâmetro de hipertrofia miocitária, foi estimado o volume nuclear médio dos cardiomiócitos, a partir de amostras de cada animal, do miocárdio ventricular esquerdo, remoto a área de infarto (septo e parede posterior). Nos cortes histológicos corados com hematoxilina & eosina de Harris, as fibras musculares cardíacas cortadas longitudinalmente foram visualizadas em aumento de 400 vezes (objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes) e medidos exclusivamente os núcleos totalmente visíveis, situados no centro da célula, e que apresentaram forma elipsoide, sendo estes, localizados principalmente no mesocárdio. Os núcleos cortados em sentido transversal ou oblíquo foram desprezados. Para cada animal estudado foram medidos de 70 a 90 núcleos, avaliados num total de seis campos de 75.000 μm^2 cada, calculando-se o volume

de cada núcleo conforme equação (46): Volume nuclear (V) = $\pi \times D \times d^2/6$. Sendo d o menor diâmetro do núcleo e D o maior diâmetro medido.

3.6.2. Quantificação de Fibrose Intersticial Cardíaca

Para avaliar o teor de colágeno no interstício do miocárdio remoto ao infarto, os cortes montados sobre as lâminas foram corados pelo método do picrossírius red por imersão durante uma hora em solução contendo 0,1% de sírius red F3BA, em meio aquoso saturado de ácido pícrico, e a seguir, lavados em solução 0,01 N de ácido clorídrico (HCl) por dois minutos, desidratados com álcool etílico e diafanizados com xilol. A cobertura com resina sintética (Entellan – Merck) preservou o material para análises posteriores. O teor de colágeno no miocárdio do VE foi estimado (47) desprezando-se as mensurações na região perivascular e cicatricial (infarto). Após captar as imagens na tela do computador, o software detectou as regiões coradas em vermelho vibrante, composto por tons de vermelho (red), verde (green) e azul (blue). Foi selecionada e padronizada a faixa na qual se obtinham os mesmos tons (red: 200 a 250, green: 120 a 160, e blue: 130 a 180) para uniformização da análise de todas as amostras, e as estimativas foram realizadas com objetiva que ampliava as imagens em 20 vezes e ocular de 10 vezes (ampliação de 200 vezes). Foram avaliados de oito a dez campos de cada animal, capturados do septo interventricular e parede posterior. Os resultados foram expressos em percentagens da área ocupada por fibras colágenas em relação a área de tecido.

3.6.3. Imunohistoquímica

O tecido cardíaco foi colocado em formol tamponado 4% durante 24 horas e depois incluído em parafina. O tecido foi então cortado em micrótomo em espessura de 4 µm. Os tecidos foram desparafinizados em xilol, reidratados em graduações decrescentes de álcool e água. Para bloquear a peroxidase endógena dos tecidos, foram realizados 7 banhos de água oxigenada por 3 minutos, depois feita a recuperação antigênica por panela à vapor Pascal em solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0, por 50 minutos. Para bloquear as reações inespecíficas os tecidos foram banhados com 2% leite desnatado por 20 minutos e, então, incubados com anticorpo primário (anti-DPPIV) diluído em solução 5% BSA. Após 18h de incubação à 4°C, os tecidos foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS (137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na^2HPO^4 e 176 mM KH^2PO^4, pH 7,4) e incubados com anticorpo secundário. Depois de lavados em PBS os tecidos foram incubados com solução 2 do kit LSAB HRP Universal que contém complexo biotina estreptavidina para amplificação do sinal do anticorpo primário e, então, foram revelados em solução de diaminobenzidina tetrahidroclorida (DAB) por 7 minutos.

3.7. Determinação da Atividade da DPPIV

A atividade da DPPIV plasmática e tecidual foi determinada colorimetricamente através da liberação de p-nitroanilina resultante da hidrólise do composto tosilato de glicil-prolil-p-nitroanilida, conforme previamente descrito (48). Resumidamente, 15 µl de plasma ou amostra de proteína de tecido diluído foi adicionado em 185µl de tampão Tris- HCl (10 mM; pH = 7,6) contendo 4 mM de tosilato de glicil-prolil-p-nitroanilida por uma hora a 37°C. Em seguida, foi adicionado 500 µl de tampão acetato (0,1 mM) para terminar a reação. A

absorbância foi medida colorimetricamente em espectrofotômetro em 405 nm. A atividade da DPPIV tecidual foi normalizada pela concentração de proteínas totais analisadas pelo método de Lowry.

3.8. Homogeneização das Amostras

Os homogenatos proteicos de coração foram obtidos através da homogeneização destes tecidos em homogeneizador Polymix PX-SR 50 E (Kinematica, AG, Switzerland) em tampão PBS gelado contendo (150 mM Nacl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico, 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; pH 7.4), inibidores de protease (pepstatina 0,7 µg/mL, leupeptina 0,5 µg/mL e PMSF 40 µg/mL). O homogenato foi então aliquotado em tubos para centrífuga e armazenado em freezer -80°C até o uso.

3.9. Determinação da Concentração de Proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi obtida pelo método de Lowry (49). O método consiste na adição de hidróxido de sódio, de carbonato de cálcio, de sulfato de cobre e de tartarato de sódio a uma mistura contendo proteínas. Adiciona-se Folin-fenol Ciocalteau no qual há um constituinte ativo que sofre redução quando reage com proteínas na presença do cobre em solução alcalina produzindo um complexo de coloração azul com absorção máxima em 750nm.

3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e immunoblotting

As proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra contendo 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% azul de bromofenol, 50 mM Tris, pH 6.8, e submetidas a eletroforese utilizando gel de poliacrilamida 7,5% conforme previamente descrito (50). As membranas de PVDF contendo as proteínas transferidas foram incubadas primeiro em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5% e Tween 20 - 0,1% em PBS) por 1 hora para bloquear ligações de anticorpos, seguida por incubação “overnight” em anticorpo primário. Anticorpos primários (anti-DPPIV e anti-GAPDH) diluídos em solução de bloqueio, foram utilizados na diluição de 1:1000 – 1:5000. As membranas de PVDF foram então lavadas com solução de bloqueio e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário apropriado conjugado ao HRP (horseradish peroxidase) diluído na proporção 1:2,000 em solução de bloqueio. Após 5 lavagens com solução de bloqueio e 2 lavagens com tampão PBS 1X, incubou-se a membrana durante 1 minuto com ECL (reagente para imuno-detecção através de quimioluminescência). Em seguida a membrana foi colocada em fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) para visualização das bandas para depois serem analisadas por densitometria (Image J).

3.11. Determinação da concentração sérica de GLP-1 ativo

A concentração de GLP-1 ativo foi determinada por ensaio imuno-enzimático (ELISA) utilizando-se um kit específico para GLP-1 (7-36) em soro de rato (Millipore). Os experimentos foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

3.12. Determinação da concentração intra-cardíaca de Angiotensina II

A concentração de ANG II em homogenato cardíaco foi determinada por kit de ELISA competitivo (Biomatik Corporation, Cambridge, Ontario, Canada) de acordo com as instruções do fabricante, incluindo coleta da amostra e estocagem. Homogenatos cardíacos foram obtidos conforme descrito acima e estocado a -80°C. A concentração do peptídeo foi normalizada pela concentração proteica e reportada como pg/mg de proteína.

3.14. Análise Estatística

A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância uma via (One-way ANOVA). Quando identificadas diferenças significantes, foi aplicado o teste post-hoc de Newman-Keuls para localizar as diferenças. Todas as análises e construção gráfica foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism 5.0 e foram expressas em média ± erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos níveis circulantes de BNP total

A concentração de BNP plasmático é utilizada amplamente como biomarcador clínico para IC (51). Neste contexto, avaliamos a concentração de BNP plasmático total nos cinco grupos experimentais, para avaliar se os tratamentos com vildagliptina, valsartan ou vildagliptina + valsartan eram capazes de diminuir a concentração de BNP circulante em ratos com HF (Figura 6). De acordo com o esperado, as medidas de BNP circulante realizadas seis semanas após a cirurgia, mostram que os ratos submetidos a lesão miocárdica tiveram níveis de BNP maiores em comparação ao grupo Sham. Ao final do tratamento os níveis plasmáticos de BNP em ratos HF aumentaram consideravelmente, ao passo que todos os agentes farmacológicos administrados foram capazes de diminuir a concentração plasmática deste peptídeo.

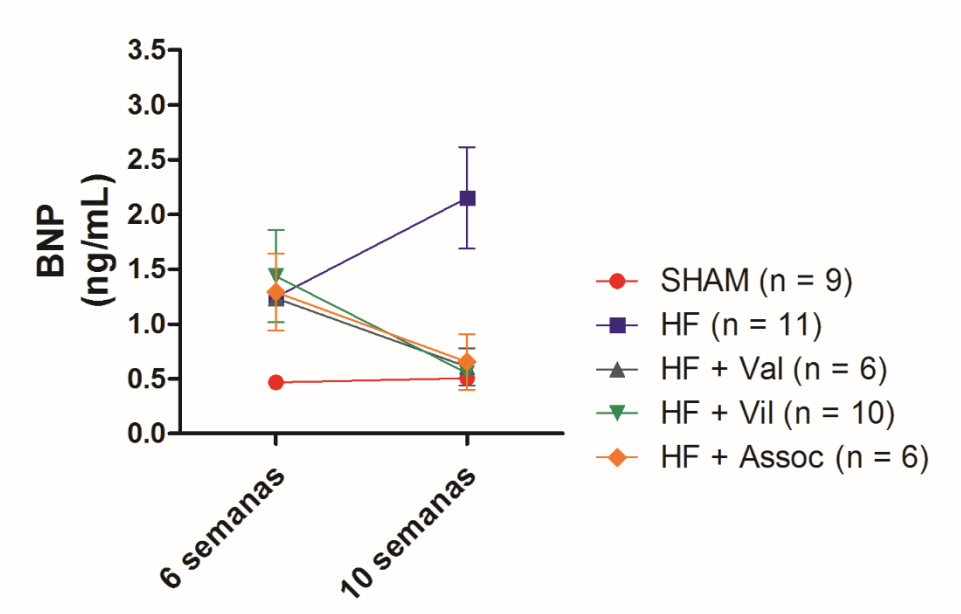

Figura 6. Determinação dos níveis circulantes do peptídeo natriurético cerebral (BNP) nos animais Sham e com insuficiência cardíaca experimental tratados com veículo (HF), valsartan (HF + Val), inibidor da DPPIV vildagliptina (HF + Vil) e associação de vildagliptina com valsartan (HF + Assoc). 6 e 10 semanas após a cirurgia de ablação do VE. Valores expressos como média ± EPM.

4.2. Parâmetros Biométricos

A Figura 7 mostra algumas características biométricas dos cinco grupos experimentais. A média do peso corporal foi semelhante em todos os grupos de ratos, tanto no início como no final do estudo (Figura 7A e B). Ratos HF tratados com veículo apresentaram maior peso do ventrículo esquerdo, ventrículo direito e peso do coração total em proporção ao peso corporal em comparação com Sham e os tratamentos utilizados foram efetivos em atenuar este aumento (Figura 7C-E). Ratos HF exibiram maior peso do pulmão em relação ao peso corporal e maior teor de água no pulmão comparado ao grupo sham, característico de congestão pulmonar (Figura 7F e G). Os tratamentos utilizados normalizaram o peso do pulmão/peso corporal e a congestão pulmonar. Não

foram observadas diferenças no teor de água no fígado e razão peso do baço/peso corporal entre os cinco grupos experimentais estudados (dados não apresentados).

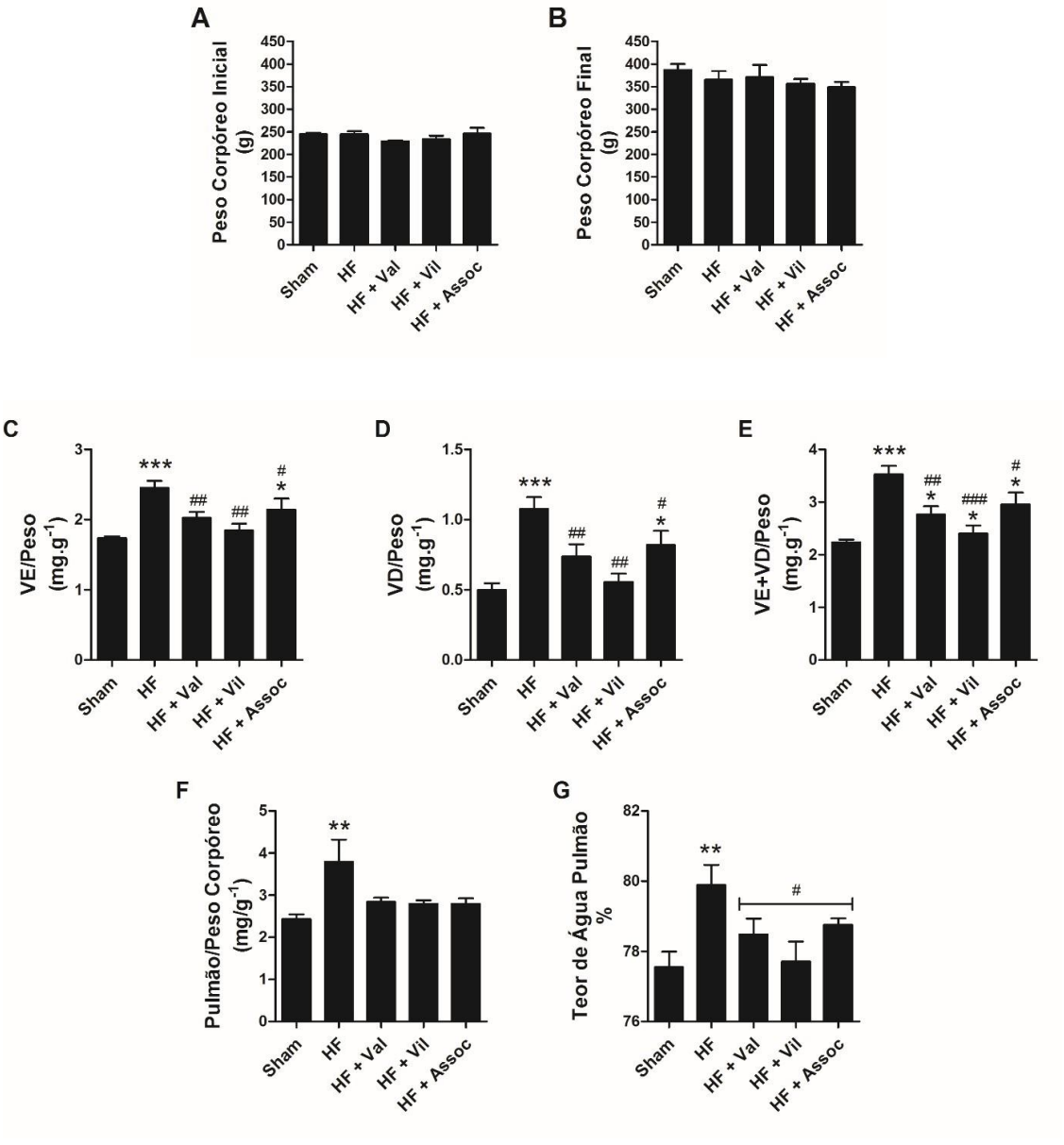

Figura 7. Avaliação dos parâmetros biométricos dos animais Sham e com insuficiência cardíaca experimental tratados com veículo (HF), valsartan (HF + Val), inibidor da DPPIV vildagliptina (HF + Vil) e associação de vildagliptina com valsartan (HF + Assoc). Ventrículo direito (VD); Ventrículo esquerdo (VE). Sham (n = 9); HF (n = 8); HF + Val (n = 7); HF + Vil (n = 4); HF + Assoc (n = 6). Valores expressos como média ± EPM. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. Sham; #P<0,05 e ##P<0,01 vs. HF.

4.3. Determinação do volume nuclear do cardiomiócito e fibrose intersticial em tecido cardíaco remanescente ao infarto

As análises histológicas para hematoxilina-eosina (HE) e Picrossírius red demonstraram que os ratos HF apresentam maior volume nuclear (Figura 8A) e fibrose intersticial (Figura 8B) em miocárdio remanescente respectivamente, comparados ao grupo Sham. Em consonância com a redução no peso do coração/peso corpóreo mostrado na Figura 7, todos os tratamentos utilizados atenuaram o aumento no volume nuclear e reduziram os níveis de colágeno intersticial.

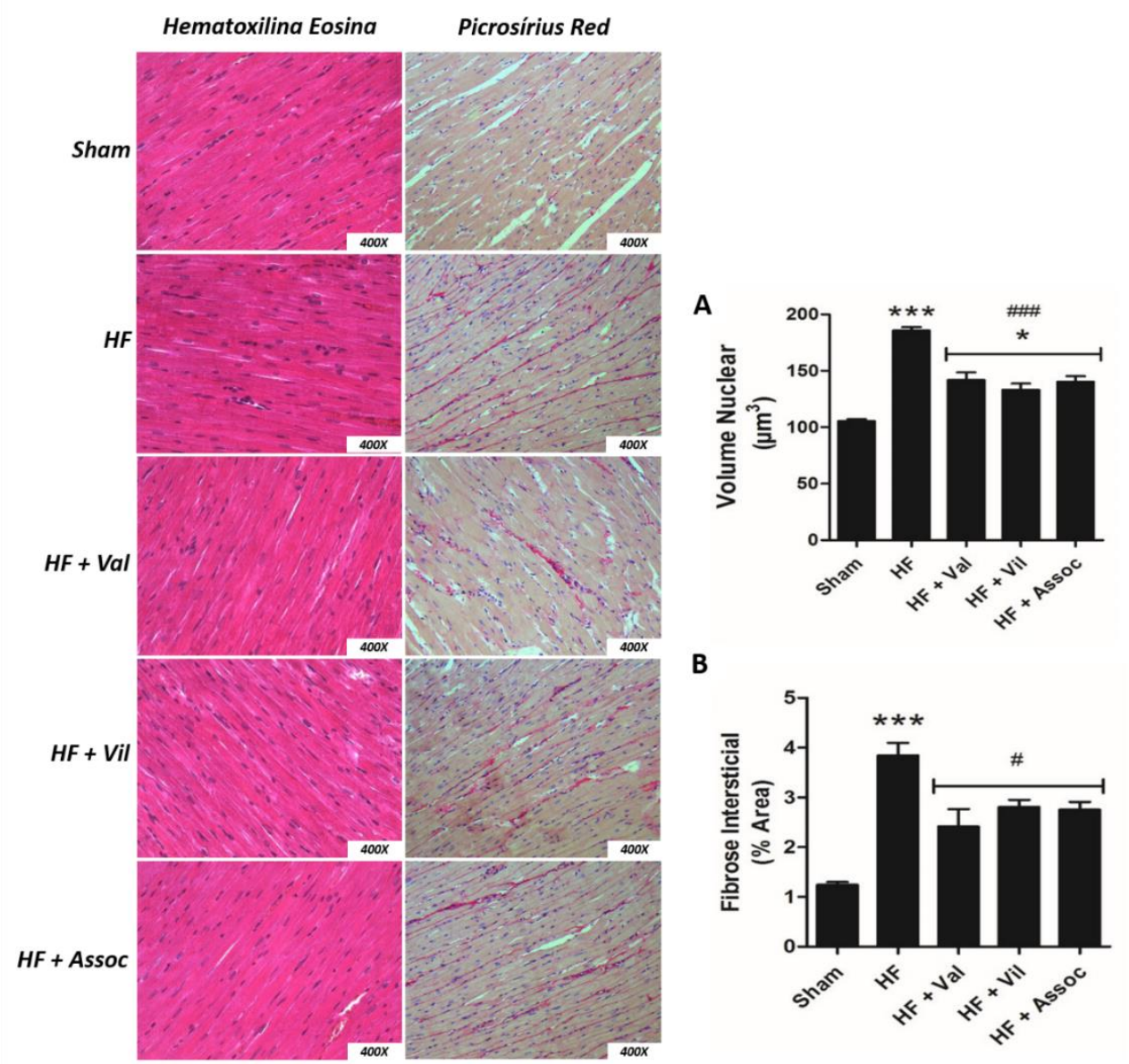

Figura 8. Avaliação histológica do remodelamento cardíaco. (A) Volume nuclear dos cardiomiócitos. (B) Fibrose intersticial do miocárdio remanescente ao infarto. Valores expressos como média ± EPM. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. Sham. ###P<0.001 vs. HF.

4.4. Atividade e abundância da DPPIV plasmática e tecidual

Avaliamos a atividade da DPPIV no plasma e homogenato de tecido cardíaco de animais sham, com IC experimental tratados com valsartan e/ou vildagliptina e tratados com veículo. A Figura 9 demonstra que os ratos HF apresentaram atividade mais elevada da DPPIV no soro (Figura 9A) e no coração

(Figura 9B) em comparação com os ratos sham. No entanto, todos os tratamentos utilizados foram capazes de inibir a atividade da DPPIV no soro e coração.

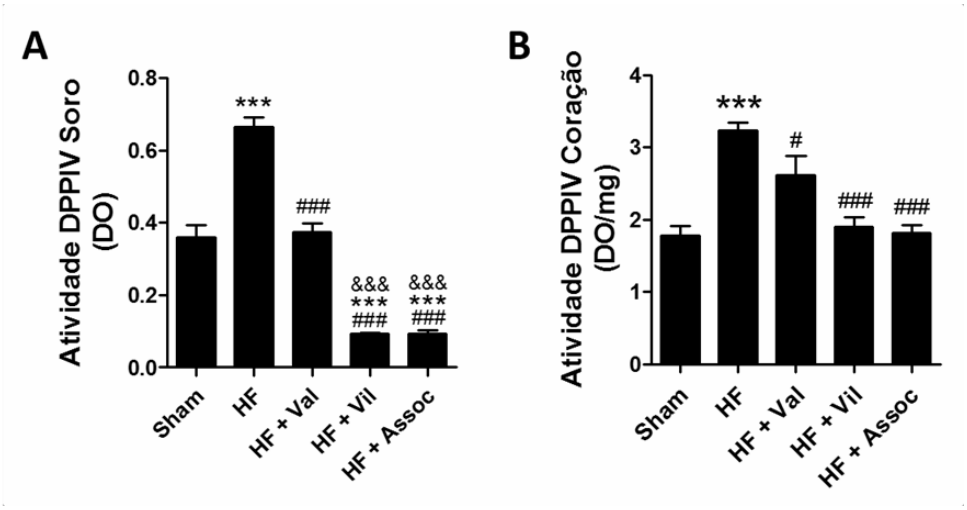

Figura 9. Avaliação da atividade da DPPIV nos animais Sham e com insuficiência cardíaca experimental tratados com veículo (HF), valsartan (HF + Val), inibidor da DPPIV vildagliptina (HF + Vil) e associação de vildagliptina com valsartan (HF + Assoc). (A) soro e (B) homogenato de músculo cardíaco. Densidade óptica (DO). Sham (n = 9); HF (n = 8); HF + Val (n = 7); HF + Vil (n = 4); HF + Assoc (n = 6). Valores expressos como média ± EPM. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. Sham; #P<0,05 e ###P<0,001 vs. HF; &&&P<0,001 vs. HF + Val.

Consistente com nossos achados anteriores (43, 44, 52), a IC cursou com aumento na expressão proteica da DPPIV no coração dos animais HF comparado ao Sham (Figura 10). Todavia, todos grupos tratados inclusive o grupo tratado apenas com valsartan, tiveram níveis de expressão da DPPIV no coração próximos ao Sham e inferiores ao grupo HF tratado com veículo. Por meio de análise imunohistológica reforçamos nossos achados demonstrando, de maneira qualitativa, maior imunomarcação para DPPIV no coração dos animais

HF tratados com veículo, enquanto é observado menor marcação para DPPIV com os tratamentos utilizados (Figura 11).

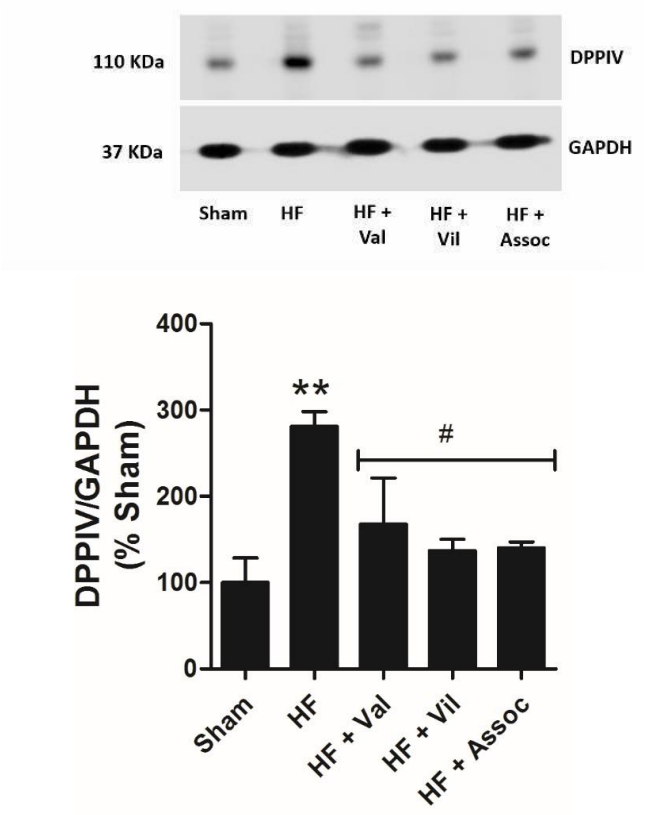

Figura 10. Expressão da DPPIV no coração de ratos Sham e HF tratados com veículo, vildagliptina e/ou valsartan. Quantidades iguais de proteína 40 µg para DPPIV e 10 µg para GAPDH) foram submetidas à SDS-PAGE, transferida para membrana de PVDF e incubada com os seguintes anticorpos primários anti-DPPIV (1:1,000) e anti-GAPDH (1:5,000). GAPDH foi utilizado como controle interno. Valores estão expresso com média ± EPM. **P<0,01 vs. Sham. #P<0,05 vs. HF.

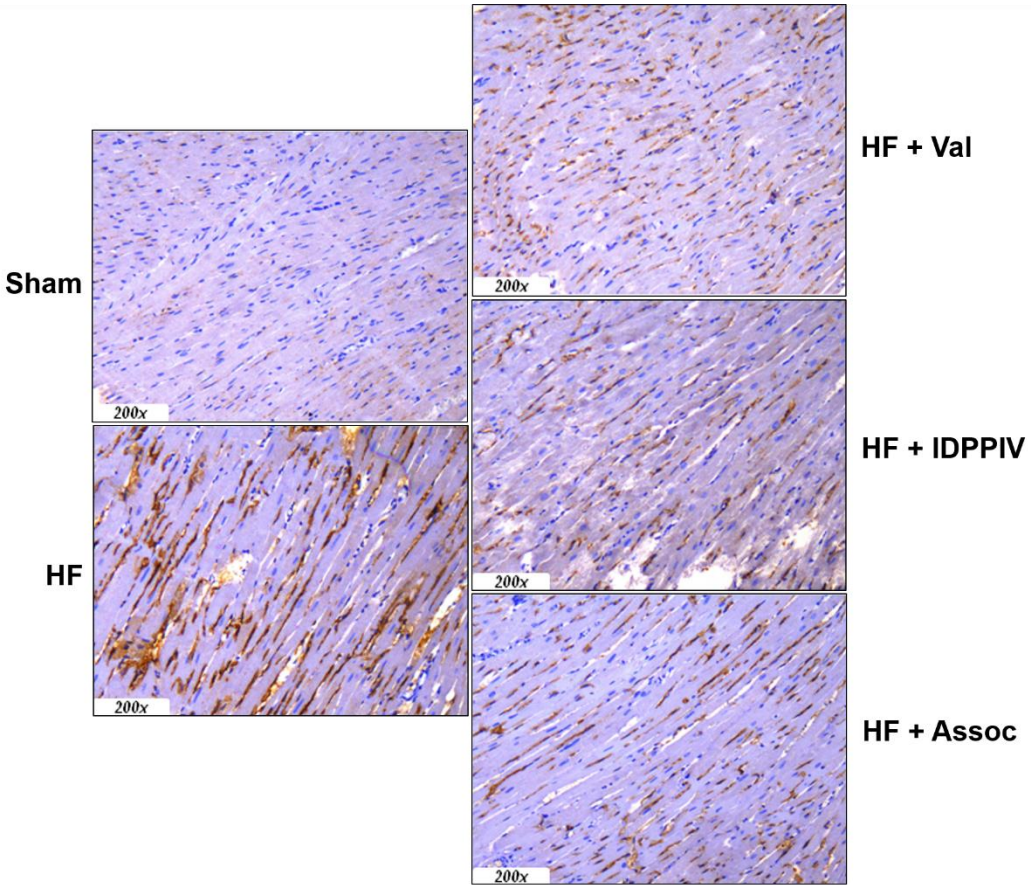

Figura 11. Marcação imunohistológica da DPPIV no coração. Imagens representativas de cortes histológicos de tecido cardíaco corado com anticorpo anti-DPPIV. Foto micrografias em aumento de 400x.

O GLP-1 ativo foi medido em sangue arterial coletado pela artéria aorta abdominal no momento do sacrifício dos animais. Uma vez coletado, o sangue foi imediatamente transferido para tubos contendo EDTA (1 mg/ml) e 10 μM P32/98, inibidor da enzima DPPIV (Abcam, Cambridge, MA), com a finalidade de evitar a degradação do GLP-1. Como esperado, os níveis de GLP-1 ativo aumentaram significativamente nos ratos HF tratados com inibidor da DPPIV e nos ratos tratados com a associação das duas terapias, quando comparado com os grupos sham, HF tratado com veículo e HF tratado com valsartan. De maneira interessante, a concentração plasmática de GLP-1 ativo no grupo HF tratado

com valsartan permaneceu semelhante ao grupo Sham, enquanto que o grupo HF apresentou tendência de menor concentração de GLP-1 ativo (Figura 12).

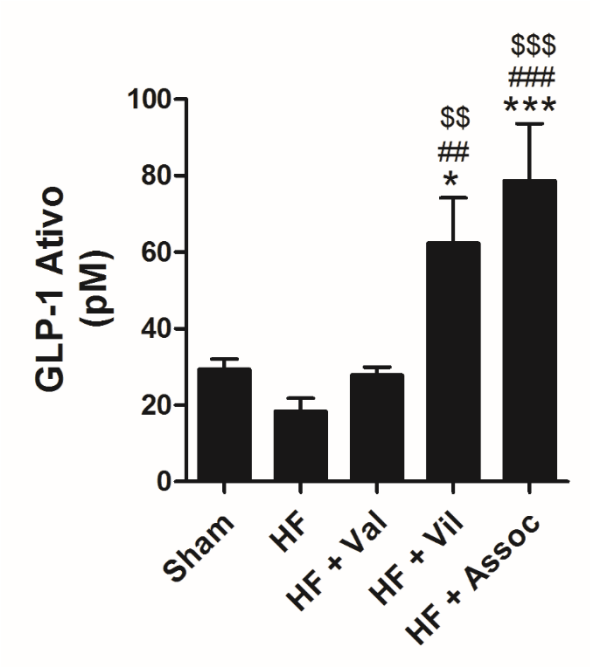

Figura 12. Avaliação dos níveis séricos do peptídeo-1 semelhante ao glucagon em ratos Sham e HF tratados com veículo, vildagliptina e/ou valsartan. Os níveis séricos de GLP-1 ativo foram determinados por ELISA em ratos Sham (n = 9); HF (n = 8); HF + Val (n = 7); HF + Vil (n = 10); HF + Assoc (n = 6). Valores expressos como média ± EPM. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. Sham; ##P<0,01 e ###P<0,001 vs. HF; $$P<0,01 e $$$P<0,001 vs. HF + Val.

Avaliamos a concentração cardíaca de angiotensina II por meio de ensaio imuno-enzimático (ELISA), com o intuito de investigar se a inibição da DPPIV e ou a terapia combinada com valsartan, altera o perfil da angiotensina II no coração. Conforme atesta a Figura 13, o grupo HF tratado com veículo cursou com aumento da concentração cardíaca de angiotensina II em comparação com o grupo Sham. Ao passo que os tratamentos utilizados foram eficazes em reduzir tais concentrações de angiotensina II para níveis próximos ao do grupo Sham.

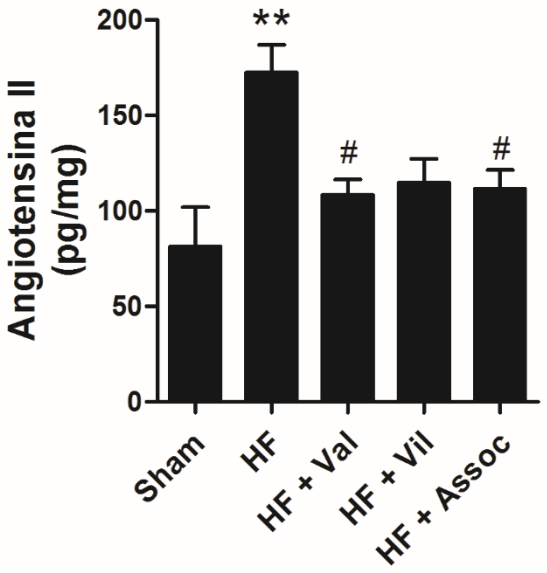

Figura 13. Avaliação da concentração cardíaca de angiotensina II em ratos Sham e HF tratados com veículo, vildagliptina e/ou valsartan. A concentração intra-cardíaca de angiotensina II foi determinada por ELISA em ratos Sham (n = 9); HF (n = 8); HF + Val (n = 7); HF + Vil (n = 10); HF + Assoc (n = 6). Valores expressos como média ± EPM. **P<0,01 vs. Sham; #P<0,05 vs. HF.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que não há efeito benéfico adicional do tratamento combinado do inibidor da DPPIV e do antagonista de receptor AT1 valsartan em comparação à monoterapia em ratos com IC. De fato, tanto as terapias isoladas, como a associação terapêutica da vildagliptina com o valsartan reduziram para níveis similares a concentração sérica de BNP total circulante, atenuaram a hipertrofia e fibrose cardíaca e a congestão pulmonar. Além disso, nossos dados demonstram que o inibidor da DPPIV vildagliptina reduziu a concentração de angiotensina II cardíaca, ao passo que o antagonista do receptor AT1 valsartan reduziu a atividade da DPPIV no plasma e no coração de ratos com IC, evidenciando uma possível sobreposição entre a vias cardioprotetoras deflagradas pela inibição do sistema-renina angiotensina e da atividade da enzima DPPIV.

Evidências recentes de estudos clínicos e pré-clínicos levantam a possibilidade de que a DPPIV possa estar envolvida na fisiopatologia da IC. Nosso grupo de pesquisa e outros laboratórios tem mostrado que pacientes com IC (43) e modelos animais (43, 53, 54) exibem aumento da atividade plasmática da DPPIV em relação aos controles, e que a atividade da DPPIV está negativamente correlacionada com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e congestão pulmonar (43).

Curiosamente, neste e em outros estudos do nosso grupo, além de maior atividade enzimática circulante, temos observado que os ratos HF também exibem elevada atividade e abundância proteica da DPPIV no coração. Em modelo de IC induzida por ablação por radiofreqüência do ventrículo esquerdo,

a atividade cardíaca e a expressão da DPPIV estavam aumentadas em comparação com ratos sham (43). Além disso, Shigeta e colaboradores (53) descobriram que ratos com disfunção cardíaca e diabetes induzida por estreptozotocina exibem aumento da atividade e expressão da DPPIV cardíaca. Por outro lado, esses mesmos autores demonstraram que a atividade e a expressão da DPPIV cardíaca estavam reduzidas em comparação com os controles em modelo de IC induzida por sobrecarga de pressão. Se esses resultados conflitantes se devem aos diferentes modelos de IC induzida por lesão miocárdica, ainda não foi esclarecido.

De fato, a regulação *in situ* da DPPIV na IC parece ser uma questão complexa. Embora o rim seja o órgão com o maior nível de expressão de DPPIV, os animais HF não mostram um aumento na DPPIV nos rins, sugerindo que esta enzima é transcricionalmente e/ou pós-transcricionalmente regulada de maneira órgão-específica. Notavelmente, os efetores *downstream* proteína quinase A (PKA) e proteína quinase G (PKG), que são ativados pelos substratos da DPPIV, GLP-1 e BNP, respectivamente, foram regulados negativamente nos rins de ratos HF (43). Apesar das incertezas sobre como a atividade e a expressão da DPPIV estão sobre-reguladas na IC, níveis circulantes elevados de sDPPIV na IC têm sido consistentemente relatados em estudos pré-clínicos e clínicos (43, 53, 54). A alta atividade da DPPIV provavelmente diminui a biodisponibilidade de peptídeos com funções cardiorenais e a menor atividade biológica desses substratos da DPPIV pode estar associada à disfunção cardíaca progressiva e ao aumento da retenção de sódio e água pelos rins.

Os mecanismos e estímulos moleculares que medeiam o aumento da atividade e abundância da DPPIV solúvel e cardíaca na IC permanecem sem

solução. Uma descoberta intrigante em relação à modulação da expressão da DPPIV na IC é que a inibição competitiva da DPPIV também reduz a abundância da DPPIV tanto no plasma como no coração. Uma possível explicação para essa observação inesperada surgiu de um estudo de Kanasaki e colaboradores (55), que demonstrou que a linagliptina aumenta a expressão de componentes da família dos microRNAs (miRNA) 29, que por sua vez reduz a abundância da DPPIV nos rins e células endoteliais de ratos diabéticos induzidos por STZ. Curiosamente, a família do miRNA 29 é regulada negativamente após o infarto do miocárdio (56, 57), entretanto, ainda não se sabe se esse mecanismo pós-transcricional também está envolvido na regulação positiva da atividade/expressão da DPPIV no coração de modelos experimentais de IC. Além disso, é tentador especular que a sheddase que libera a DPPIV da superfície celular para a corrente sanguínea está estimulada na IC, bem como em outras doenças cardiovasculares e metabólicas em que a atividade da DPPIV no soro é superior que de indivíduos saudáveis.

O tratamento com BRA na IC já está bem estabelecido e documentado. O tratamento combinado entre valsartan e vildagliptina é uma intervenção comprovadamente bem-sucedida para a hipertensão em pacientes com diabetes tipo 2. Não existem relatos na literatura sobre o tratamento combinado na IC. No presente estudo, o remodelamento cardíaco em ratos com IC foi atenuado pelos tratamentos utilizados, seja isolado, vildagliptina ou valsartan, ou em combinação das duas terapias. Especificamente, a inibição crônica da DPPIV e/ou o bloqueio do receptor AT1 diminuiu os níveis de fibrose intersticial e o volume nuclear de cardiomiócitos, além de diminuir a relação peso dos ventrículos/peso corporal em comparação ao sham. Um estudo realizado por Yin

e colaboradores relatou que o tratamento com vildagliptina na dose de 15/mg/kg uma vez ao dia não demonstrou nenhum tipo de efeito benefício em prevenir ou reverter remodelamento e disfunção cardíaca em ratos pós infarto do miocárdio (58). Uma plausível explicação sobre essa discrepância entre os achados é a dose (120 vs. 15 mg/kg/dia) e a frequência de administração (duas vezes vs. uma vez ao dia). Observamos em nosso laboratório que embora o tratamento crônico com vildagliptina na dose de 20 mg/kg/dia iniba a atividade plasmática da DPPIV, falha em inibir a atividade da peptidase no coração e nos rins de ratos com IC. Além disso, nesta dose baixa, a vildagliptina é incapaz de melhorar a função cardíaca e renal e de reduzir congestão pulmonar em ratos com IC estabelecida (dados não publicados). Em conjunto, estas observações sugerem que a inibição da atividade plasmática e tecidual da DPPIV pode ter um papel crucial na mediação dos efeitos dos inibidores da DPPIV em ratos com IC.

Chaykovska e colaboradores relataram evidências moleculares dos efeitos benéficos da DPPIV no coração em ratos doença renal crônica DRC (59). Seu estudo mostrou que o inibidor da DPPIV linagliptina normaliza os níveis de mRNA dos marcadores de fibrose no coração de ratos com DRC.

Em um recente trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa, observamos que ratos com DRC apresentavam hipertrofia e fibrose cardíaca, que foram associados com maior atividade e expressão da DPPIV cardíaca. O tratamento com sitagliptina preveniu a fibrose cardíaca e mitigou a hipertrofia cardíaca. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi maior em ratos com DRC do que em ratos sham, o que foi sugestivo de disfunção diastólica associada à DRC. O inibidor da DPPIV atenuou significativamente o aumento do

TRIV. Estes resultados sugerem que a inibição da DPPIV pode retardar o comprometimento cardiovascular na DRC (60).

É sabido que a DPPIV se liga diretamente ao colágeno (30, 31) e à fibronectina (32, 33) formando um complexo proteico que contribui para a migração celular e reparo do tecido conjuntivo (61). Curiosamente, a inibição da DPPIV mostrou atenuar a fibrose cardíaca em ratos com IC (43, 53, 62), bem como em outros modelos de doença cardíaca (59, 63-65). Portanto, é tentador especular que uma associação entre a DPPIV com colágeno e/ou fibronectina possa estar envolvida na remodelação do tecido cardíaco, mas essa suposição requer investigação adicional.

A maioria dos estudos pré-clínicos demonstraram que as gliptinas melhoram o remodelamento e a função cardíaca e podem até aumentar a sobrevida na IC experimental. É de particular importância que as gliptinas têm sido consistentemente relatadas por exercer ações renoprotetoras em modelos experimentais de doença cardíaca e em pacientes com disfunção cardíaca.

Em contrapartida, um menor consenso é evidente em relação aos benefícios cardiovasculares da inibição da DPPIV no cenário clínico. Estudos clínicos documentaram que os inibidores da DPPIV podem melhorar a disfunção cardíaca em alguns pacientes, mas em outros não afetam os desfechos cardíacos ou até mesmo aumentam o risco de complicações da IC. Em estudos pilotos, indivíduos não diabéticos com disfunção cardíaca tratados com inibidores da DPPIV apresentaram melhora na captação de glicose miocárdica, redução de níveis séricos de produtos finais de glicação avançada e níveis elevados de células progenitoras circulantes em comparação com indivíduos tratados com placebo.

Por outro lado, os resultados dos ensaios SAVOR-TIME 53 e EXAMINE demonstraram que tanto a saxagliptina como a alogliptina, respectivamente, tiveram efeito neutro em comparação com o placebo em termos de resultados cardiovasculares primários em pacientes diabéticos tipo 2 (66, 67). Na verdade, o aumento da hospitalização por IC em pacientes diabéticos tratados com saxagliptina versus pacientes tratados com placebo, observado no estudo SAVOR-TIME 53, levantou algumas preocupações de segurança cardiovascular com relação à administração de inibidores da DPPIV em pacientes diabéticos com IC. Resta determinar se esse resultado negativo pode ser considerado um efeito adverso dos inibidores da DPPIV, qual é sua relevância clínica, se é comum a todos os inibidores da DPPIV e se pode estar associado a comorbidades e polimedicação. Até agora, os possíveis mecanismos subjacentes para explicar por que a saxagliptina aumentaria o risco de internações por IC permanecem especulativos.

Em um estudo publicado recentemente, Koyane e colaboradores relataram que a saxagliptina possui como alvo primário a DPP9, que por sua vez inicia cascatas de sinalização intracelular contribuindo para contratilidade cardíaca e disfunção eletrofisiológica, efeito este, que não está presente no inibidor da DPPIV, sitagliptina (68).

Os efeitos cardioprotetores do GLP-1 independente do controle glicêmico têm sido relatados em estudos pré-clínicos e clínicos. In vitro, os agonistas do GLP-1R ativam as vias citoprotetoras e reduzem a apoptose dos cardiomiócitos em resposta a diversos estímulos, como ceramida, palmitato, estaurosporina e fator de necrose tumoral alfa (37, 69). Além disso, o GLP-1 nativo atenua o tamanho do infarto após isquemia/reperfusão in vivo e em corações isolados

perfundidos (70), e o liraglutide (análogo do GLP-1) melhora os desfechos de IM tanto em camundongos diabéticos quanto não diabéticos (71). Além disso, esses resultados pré-clínicos são apoiados por dados clínicos porque o tratamento com GLP-1 e exenatide melhora significativamente a função cardíaca e o índice de recuperação miocárdica em pacientes com infarto agudo do miocárdio e disfunção ventricular esquerda independentemente do histórico de diabetes (72, 73).

As ações diuréticas e natriuréticas do GLP-1 têm sido demonstradas consistentemente por uma variedade de estudos em roedores (50, 74-76) e em humanos (77-80). Os efeitos do GLP-1 sobre o manuseio de sódio e água em roedores e humanos é mediado, pelo menos em parte, pela inibição da reabsorção de sódio mediada pelo NHE3 em túbulo proximal renal via ativação da via de sinalização cAMP/PKA (50, 75, 76). Conforme esperado, no presente trabalho observamos que a administração de vildagliptina e a terapia combinada (vildagliptina + valsartan) aumentou a concentração do GLP-1 ativo circulante. De fato, observamos em nossos trabalhos anteriores que o aumento na concentração de GLP-1 foi acompanhado por restauração da via da PKA o que também foi acompanhado por aumento da fosforilação do NHE3 na serina 552, sítio consenso da PKA, um mecanismo que reduz a atividade de transporte do NHE3 em túbulo proximal (43, 44). Além disso, a renoproteção a longo prazo conferida pela inibição da DPPIV envolve um melhor manuseio renal de sódio e água, que pode contribuir para a diminuição da expansão volêmica e da congestão pulmonar na IC.

Embora o SRA sistêmico possa desempenhar um papel importante no processo de remodelamento cardíaco, nas últimas décadas as pesquisas

revelam que a progressão das doenças cardiovasculares ocorre principalmente influenciada pela superestimulação local do SRA no coração. Os dados apresentados neste trabalho fortalecem essa ideia, uma vez que os tratamentos utilizados alteraram os níveis de Ang II no coração de ratos com IC. De fato, evidências recentes sugerem um *cross talk* entre a DPPIV e o SRA tecidual em patologias cardiorrenais (60, 81, 82).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a cardioproteção conferida pela inibição da DPPIV em ratos com DRC está associada a uma redução nos níveis cardíacos de Ang II e um aumento nos níveis de angiotensina (1-7), que foram acompanhados por efeitos anti-hipertróficos, anti-inflamatórios e antioxidantes (60).

Aroor e colaboradores relataram que a infusão de Ang II em rins de camundongos obesos com doença renal, bem como em células de túbulo proximal em cultura aumenta a atividade da DPPIV. Os autores atribuem um “cross talk” entre a sinalização do receptor AT1 e ativação da DPPIV na regulação da megalina e destaca a significância de considerar a DPPIV como alvo na prevenção da progressão da lesão renal relacionada à obesidade (81). Scot M Brown e colaborares demonstraram que a inibição da DPPIV com saxagliptina atenua a disfunção diastólica induzida por angiotensina II (82). Neste mesmo sentido, Jelena Seferovic e colaboradores avaliaram a concentração plasmática de GLP-1 ativo em 27 pacientes com IC e fração de ejeção reduzida (83). Estes autores demonstraram considerável aumento na concentração de GLP-1 plasmático após 3 meses de tratamento com Sacubitril (inibidor de neprilisina)/valsartan (antagonista do receptor AT1), terapia promissora e recentemente aprovada para tratamento de IC. Sugerindo que

sacubitril/valsartan exerce efeito antihiperglicêmico em pessoas com e sem diabetes. Além disso, destacam que esta terapia pode ajudar a melhorar o controle glicêmico em pacientes com diabetes e prevenir a ocorrência de diabetes em pessoas com IC com fração de ejeção reduzida e pré-diabetes. Uma vez que sacubitril/valsartan e inibidores da DPPIV potencializam os efeitos do GLP-1, embora seja por vias diferentes, seria de grande interesse avaliar um potencial efeito sinérgico ou redundante destas duas classes terapêuticas. Em nossos achados, apesar de não observarmos efeito sinérgico, curiosamente o antagonista do receptor AT1 de angiotensina II (Valsartan) inibe a atividade e expressão da DPPIV, evidenciando também possível “cross talk” entre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e a DPPIV, o que poderia explicar a não observação de efeito sinérgico das terapias utilizadas.

6. CONCLUSÕES

A inibição da enzima DPPIV e/ou o antagonista do receptor de angiotensina II AT1 reduzem os níveis de BNP circulante, a congestão pulmonar, a fibrose e a hipertrofia cardíaca em ratos com IC. O inibidor da DPPIV vildagliptina reduz a concentração de angiotensina II cardíaca, ao passo que o antagonista do receptor AT1 valsartan é capaz de reduzir a atividade da DPPIV no plasma e no coração de ratos com IC.

Em conjunto, estes dados sugerem que não há efeito cardioprotetor sinérgico da administração de inibidor da DPPIV e de antagonista de receptor AT1 em ratos com IC muito possivelmente em decorrência de um possível “crosstalk” e/ou sobreposição de vias ativadas por estes fármacos.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kemp CD, Conte JV. The pathophysiology of heart failure. Cardiovasc Pathol. 2012;21(5):365-71.

2. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 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. 2013;62(16):e147-239.

3. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur J Heart Fail. 2012;14(8):803-69.

4. Braunwald E. Heart failure. JACC Heart Fail. 2013;1(1):1-20.

5. SCHRIER RW. Hormones and hemodynamics in heart failure. In: ABRAHAM WT, editor. The New England Journal of Medicine1999. p. 577-85.

6. Cadnapaphornchai MA, Gurevich AK, Weinberger HD, Schrier RW. Pathophysiology of sodium and water retention in heart failure. Cardiology. 2001;96(3-4):122-31.

7. Inoue BH, dos Santos L, Pessoa TD, Antonio EL, Pacheco BP, Savignano FA, et al. Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2012;302(1):R166-74.

8. Lutken SC, Kim SW, Jonassen T, Marples D, Knepper MA, Kwon TH, et al. Changes of renal AQP2, ENaC, and NHE3 in experimentally induced heart failure: response to angiotensin II AT1 receptor blockade. Am J Physiol Renal Physiol. 2009;297(6):F1678-88.

9. AC G. The Aquaretic Effect of Vasopressin V2 Receptor Antagonists. 1ed.Hauppauge ed. NY: Nova Science Publishers2013.

10. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. N Engl J Med. 1998;339(5):321-8.

11. Nathisuwan S, Talbert RL. A review of vasopeptidase inhibitors: a new modality in the treatment of hypertension and chronic heart failure. Pharmacotherapy. 2002;22(1):27-42.

12. Hong WJ, Petell JK, Swank D, Sanford J, Hixson DC, Doyle D. Expression of dipeptidyl peptidase IV in rat tissues is mainly regulated at the mRNA levels. Exp Cell Res. 1989;182(1):256-66.

13. Kenny AJ, Booth AG, George SG, Ingram J, Kershaw D, Wood EJ, et al. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. Biochem J. 1976;157(1):169-82.

14. Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. Crit Rev Clin Lab Sci. 2003;40(3):209-94.

15. Matheeussen V, Baerts L, De Meyer G, De Keulenaer G, Van der Veken P, Augustyns K, et al. Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. Biol Chem. 2011;392(3):189-98.

16. Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. Eur J Biochem. 2000;267(17):5608-13.

17. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. Cancer Immunol Immunother. 2009;58(11):1723-47.

18. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Racz K, et al. Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. Pathol Oncol Res. 2011;17(4):925-30.

19. Eric-Nikolic A, Matic IZ, Dordevic M, Milovanovic Z, Markovic I, Dzodic R, et al. Serum DPPIV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. Immunobiology. 2011;216(8):942-6.

20. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. Diabetes. 2011;60(7):1917-25.

21. Sell H, Bluher M, Kloting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, et al. Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-

specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. Diabetes Care. 2013;36(12):4083-90.

22. Green BD, Flatt PR, Bailey CJ. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. Diab Vasc Dis Res. 2006;3(3):159-65.

23. Lambeir AM, Scharpe S, De Meester I. DPP4 inhibitors for diabetes--what next? Biochem Pharmacol. 2008;76(12):1637-43.

24. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, et al. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(12):6874-9.

25. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. N Engl J Med. 1992;326(20):1316-22.

26. Girardi AC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, Aronson PS. Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule. J Biol Chem. 2001;276(49):46671-7.

27. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na+/H+ exchanger. Nat Genet. 1998;19(3):282-5.

28. Girardi AC, Knauf F, Demuth HU, Aronson PS. Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na+/H+ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287(5):C1238-45.

29. Girardi AC, Fukuda LE, Rossoni LV, Malnic G, Reboucas NA. Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na+ - H+ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. Am J Physiol Renal Physiol. 2008;294(2):F414-22.

30. Bauvois B. A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV. Biochem J. 1988;252(3):723-31.

31. Loster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. Biochem Biophys Res Commun. 1995;217(1):341-8.

32. Piazza GA, Callanan HM, Mowery J, Hixson DC. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. Biochem J. 1989;262(1):327-34.

33. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC, Pauli BU. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. J Biol Chem. 1998;273(37):24207-15.

34. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. Circulation. 2008;117(18):2340-50.

35. Liu Q, Anderson C, Broyde A, Polizzi C, Fernandez R, Baron A, et al. Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure. Cardiovasc Diabetol. 2010;9:76.

36. Poornima I, Brown SB, Bhashyam S, Parikh P, Bolukoglu H, Shannon RP. Chronic glucagon-like peptide-1 infusion sustains left ventricular systolic function and prolongs survival in the spontaneously hypertensive, heart failure-prone rat. Circ Heart Fail. 2008;1(3):153-60.

37. Ravassa S, Zudaire A, Carr RD, Diez J. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;300(4):H1361-72.

38. Timmers L, Henriques JP, de Kleijn DP, Devries JH, Kemperman H, Steendijk P, et al. Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. J Am Coll Cardiol. 2009;53(6):501-10.

39. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(2):198-207.

40. Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(10):2023-39.

41. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Harty GJ, Lapp H, Burnett JC, Jr. Des-serine-proline brain natriuretic peptide 3-32 in cardiorenal regulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007;292(2):R897-901.

42. Miller WL, Phelps MA, Wood CM, Schellenberger U, Van Le A, Perichon R, et al. Comparison of mass spectrometry and clinical assay measurements of circulating fragments of B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. Circ Heart Fail. 2011;4(3):355-60.

43. dos Santos L, Salles TA, Arruda-Junior DF, Campos LC, Pereira AC, Barreto AL, et al. Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure. Circ Heart Fail. 2013;6(5):1029-38.

44. Arruda-Junior DF, Martins FL, Dariolli R, Jensen L, Antonio EL, Dos Santos L, et al. Dipeptidyl Peptidase IV Inhibition Exerts Renoprotective Effects in Rats with Established Heart Failure. Front Physiol. 2016;7:293.

45. Antonio EL, Dos Santos AA, Araujo SR, Bocalini DS, Dos Santos L, Fenelon G, et al. Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality. J Card Fail. 2009;15(6):540-8.

46. Gerdes AM, Liu Z, Zimmer HG. Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. Cardioscience. 1994;5(3):203-8.

47. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J. 1979;11(4):447-55.

48. Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel AP, Lessa LM, Rossoni LV, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 2011;29(3):520-8.

49. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

50. Crajoinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BP, Lessa LM, Malnic G, et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. Am J Physiol Renal Physiol. 2011;301(2):F355-63.

51. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. Circulation. 1993;88(1):82-91.

52. de Almeida Salles T, Zogbi C, de Lima TM, de Godoi Carneiro C, Garcez AT, Barbeiro HV, et al. The contributions of dipeptidyl peptidase IV to inflammation in heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016;310(11):H1760-72.

53. Shigeta T, Aoyama M, Bando YK, Monji A, Mitsui T, Takatsu M, et al. Dipeptidyl peptidase-4 modulates left ventricular dysfunction in chronic heart

failure via angiogenesis-dependent and -independent actions. Circulation. 2012;126(15):1838-51.

54. Gomez N, Touihri K, Matheeussen V, Mendes Da Costa A, Mahmoudabady M, Mathieu M, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves cardiorenal function in overpacing-induced heart failure. Eur J Heart Fail. 2012;14(1):14-21.

55. Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He JH, Nagai T, Nakamura Y, et al. Linagliptin-Mediated DPP-4 Inhibition Ameliorates Kidney Fibrosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition in a Therapeutic Regimen. Diabetes. 2014;63(6):2120-31.

56. Melo SF, Fernandes T, Barauna VG, Matos KC, Santos AA, Tucci PJ, et al. Expression of MicroRNA-29 and Collagen in Cardiac Muscle after Swimming Training in Myocardial-Infarcted Rats. Cell Physiol Biochem. 2014;33(3):657-69.

57. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(35):13027-32.

58. Yin M, Sillje HH, Meissner M, van Gilst WH, de Boer RA. Early and late effects of the DPP-4 inhibitor vildagliptin in a rat model of post-myocardial infarction heart failure. Cardiovasc Diabetol. 2011;10:85.

59. Chaykovska L, von Websky K, Rahnenfuhrer J, Alter M, Heiden S, Fuchs H, et al. Effects of DPP-4 inhibitors on the heart in a rat model of uremic cardiomyopathy. PLoS One. 2011;6(11):e27861.

60. Beraldo JI, Benetti A, Borges-Junior FA, Arruda-Junior DF, Martins FL, Jensen L, et al. Cardioprotection Conferred by Sitagliptin Is Associated with Reduced Cardiac Angiotensin II/Angiotensin-(1-7) Balance in Experimental Chronic Kidney Disease. Int J Mol Sci. 2019;20(8).

61. Ghersi G, Dong H, Goldstein LA, Yeh Y, Hakkinen L, Larjava HS, et al. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. J Biol Chem. 2002;277(32):29231-41.

62. Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min KD, Shindo K, Yan Y, et al. Dipeptidyl-peptidase IV inhibition improves pathophysiology of heart failure and increases survival rate in pressure-overloaded mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013;304(10):H1361-9.

63. Bostick B, Habibi J, Ma L, Aroor A, Rehmer N, Hayden MR, et al. Dipeptidyl peptidase inhibition prevents diastolic dysfunction and reduces myocardial fibrosis in a mouse model of Western diet induced obesity. Metabolism. 2014;63(8):1000-11.

64. Connelly KA, Bowskill BB, Advani SL, Thai K, Chen LH, Kabir MG, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition improves left ventricular function in chronic kidney disease. Clin Invest Med. 2014;37(3):E172.

65. Miyoshi T, Nakamura K, Yoshida M, Miura D, Oe H, Akagi S, et al. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats. Cardiovasc Diabetol. 2014;13:43.

66. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. N Engl J Med. 2013;369(14):1317-26.

67. White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, et al. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med. 2013;369(14):1327-35.

68. Koyani CN, Trummer C, Shrestha N, Scheruebel S, Bourgeois B, Plastira I, et al. Saxagliptin but Not Sitagliptin Inhibits CaMKII and PKC via DPP9 Inhibition in Cardiomyocytes. Front Physiol. 2018;9:1622.

69. Picatoste B, Ramirez E, Caro-Vadillo A, Iborra C, Ares-Carrasco S, Egido J, et al. Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential roles of GLP-1 isoforms. PLoS One. 2013;8(10):e78330.

70. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. Diabetes. 2005;54(1):146-51.

71. Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. Diabetes. 2009;58(4):975-83.

72. Lonborg J, Vejlstrup N, Kelbaek H, Nepper-Christensen L, Jorgensen E, Helqvist S, et al. Impact of acute hyperglycemia on myocardial infarct size, area at risk, and salvage in patients with STEMI and the association with exenatide treatment: results from a randomized study. Diabetes. 2014;63(7):2474-85.

73. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. Circulation. 2004;109(8):962-5.

74. Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. Eur J Pharmacol. 2002;434(3):163-7.

75. Rieg T, Gerasimova M, Murray F, Masuda T, Tang T, Rose M, et al. Natriuretic effect by exendin-4, but not the DPP-4 inhibitor alogliptin, is mediated via the GLP-1 receptor and preserved in obese type 2 diabetic mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2012;303(7):F963-71.

76. Thomson SC, Kashkouli A, Singh P. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases GFR and suppresses proximal reabsorption in the rat. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304(2):F137-44.

77. Skov J, Holst JJ, Gotze JP, Frokiaer J, Christiansen JS. Glucagon-like peptide-1: effect on pro-atrial natriuretic peptide in healthy males. Endocr Connect. 2014;3(1):11-6.

78. Skov J, Dejgaard A, Frokiaer J, Holst JJ, Jonassen T, Rittig S, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): effect on kidney hemodynamics and renin-angiotensin-aldosterone system in healthy men. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(4):E664-71.

79. Gutzwiller JP, Tschopp S, Bock A, Zehnder CE, Huber AR, Kreyenbuehl M, et al. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(6):3055-61.

80. Gutzwiller JP, Hruz P, Huber AR, Hamel C, Zehnder C, Drewe J, et al. Glucagon-like peptide-1 is involved in sodium and water homeostasis in humans. Digestion. 2006;73(2-3):142-50.

81. Aroor A, Zuberek M, Duta C, Meuth A, Sowers JR, Whaley-Connell A, et al. Angiotensin II Stimulation of DPP4 Activity Regulates Megalin in the Proximal Tubules. Int J Mol Sci. 2016;17(5).

82. Brown SM, Smith CE, Meuth AI, Khan M, Aroor AR, Cleeton HM, et al. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition With Saxagliptin Ameliorates Angiotensin II-Induced Cardiac Diastolic Dysfunction in Male Mice. Endocrinology. 2017;158(10):3592-604.

83. Seferovic JP, Claggett B, Seidelmann SB, Seely EW, Packer M, Zile MR, et al. Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients

with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. Lancet Diabetes Endocrinol. 2017;5(5):333-40.