Gabriela Cozin Aragão

**A modulação crônica do receptor de GLP-1 altera os níveis
pressóricos, a estrutura e a função renal de ratos
espontaneamente hipertensos**

**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 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2016

Gabriela Cozin Aragão

**A modulação crônica do receptor de GLP-1 altera os níveis
pressóricos, a estrutura e a função renal de ratos
espontaneamente hipertensos**

**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**

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Aragão, Gabriela Cozin

A modulação crônica do receptor de GLP-1 altera os níveis pressóricos, a estrutura e a função renal de ratos espontaneamente hipertensos / Gabriela Cozin Aragón. -- São Paulo, 2016.

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.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Silmara Cozin Aragão e Simas Ferreira Aragão e ao meu irmão, Guilherme Ferreira Aragão por representarem muito mais do que a simples definição semântica de família e devotarem seus esforços para tornar os meus planos tangíveis. Agradeço a eles por tudo que fui, sou e pelo que eu ainda eu serei. Amor incondicional.

Agradecimentos

Agradeço ao meu avô Leonardo Arnaldo Cozin que embora não esteja fisicamente presente, estará para sempre conosco em pensamento e a minha avó Maria da Conceição Gonçalves Cozin por todo amor, carinho e apoio durante toda minha vida.

Agradeço à minha tia avó Josefina Ferreira Aragão, por todo carinho e por acreditar no meu potencial.

Agradeço aos meus avós Zeferino Ferreira Aragão e Maria Aparecida Borella Aragão, pela motivação e carinho durante esta jornada.

Agradeço à minha, tia Simone Cozin Mendonça ao meu primo Eduardo Oscar Gomes Mendonça e ao meu tio Oscar Gomes Mendonça Júnior por todo amor e apoio.

Agradeço ao Gabriel Ribeiro Tinoco por toda paciência, amor, companheirismo e por acreditar no meu potencial.

Agradeço a minha orientadora Adriana Castello Costa Girardi pela oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência e por todo o avanço técnico, intelectual e pessoal que eu adquiri durante este percurso.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório Thiago, Carla, Juliana, Flavia, Acaris, Daniel e Renato pelos conselhos, colaborações e pelo apoio técnico, intelectual e pessoal.

Agradeço à Pamella Malagrino pelos conselhos, pela amizade e por realizar os experimentos avaliação de estresse oxidativo em córtex renal.

Agradeço à Camila Zogbi por realizar os cortes histológicos.

Agradeço à Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu por realizar os experimentos de avaliação de fluxo plasmático renal.

Agradeço aos técnicos de laboratório Maicon e Mônica Nunes pelos experimentos de aferição de pressão direta.

Agradeço aos funcionários Leno, Pedro, Dario, Bruna, Suelen e Vicente, Reginaldo pelo apoio técnico.

Agradeço ao Prof. Dr. Alfredo Fiorelli e a Enf. perfusionista Flavia Alves por todo apoio e compreensão.

Agradeço a todos os alunos, funcionários e pesquisadores do LGCM por contribuírem de forma direta ou indireta para execução deste trabalho.

Agradeço, por fim, à FAPESP pela bolsa de doutorado direto concedida.

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

Mahatma Gandhi

Sumário

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	10
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas.....	15
1. Introdução	20
1.1. Efeito Incretina.....	20
1.2. O peptídeo-1 semelhante ao glucagon.....	22
1.3. A degradação do GLP-1	30
1.4. O receptor de GLP-1	32
1.5. As terapias baseadas em incretinas	33
1.5.1. Os inibidores da DPP4	34
1.5.2. Os Incretinomiméticos	34
1.6. Ações pancreáticas do GLP-1	36
1.7. Ações Extra Pancreáticas do GLP-1	38
1.7.1. Ações gastrointestinais e neuronais do GLP-1	39
1.7.2. Ações hepáticas do GLP-1	40
1.7.3. Ações cardiorrenais do GLP-1	40
1.7.4. O efeito endógeno do GLP-1 sobre a função renal	45
2. Objetivos	46
3. Métodos.....	46
3.1. Desenho Experimental	47
3.2. Avaliação Biométrica.....	48
3.3. Medida da pressão arterial.....	48
3.4. Avaliação da função renal	49
3.5. Hemodinâmica Renal	51
3.6. Microperfusão estacionária in vivo	52
3.7. Preparação do homogenato de córtex renal.....	55
3.8. Determinação da concentração de proteínas	55
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	55
3.10. Coloração do Gel com nitrato de prata.....	56
3.11. Immunoblotting.....	56
3.12. Análises Histológicas	57
3.13. Avaliação estresse oxidativo	58

3.14	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	58
3.15	Anticorpos Utilizados.....	59
3.16	Estatística	59
4	Resultados	59
4.1	A modulação do GLP-1R altera o peso corporal e a ingestão de água em SHRs	59
4.2	O bloqueio crônico do GLP-1R reduz a sensibilidade à insulina em SHRs.....	60
4.3	A modulação crônica do GLP-1R altera a pressão arterial de SHRs	61
4.4	A modulação crônica do GLP-1R altera a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de SHRs.....	63
4.5	A modulação crônica do GLP-1R altera a RVR em SHRs	65
4.6	Os efeitos da modulação crônica do GLP-1R sobre a estrutura renal de SHRs	66
4.7	A modulação crônica do GLP-1R altera componentes do SRAA intra-renal em SHRs	70
4.8	A modulação crônica do GLP-1R altera a expressão do TGF- β em córtex renal de SHRs.	71
4.9	Os efeitos da modulação crônica do GLP-1R sobre o estresse oxidativo intra-renal em SHRs	72
4.10	Os efeitos da modulação crônica do GLP-1R sobre a sinalização intra-renal deste receptor.....	73
5	Discussão.....	74
6	Conclusão	84
7	Referências Bibliográficas	85
8.	Anexos:	112
	Anexo I.....	112

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AC- Adenilil ciclase

AMPC – 3', 5'- monofosfato cíclico de adenosina

ANP – Peptídeo natriuréticoatrial

ATP- Adenosina trifosfato

BNP – Peptídeo natriurético cerebral

BSA – Albumina do soro bovino

CASR- Receptor sensível ao cálcio

CD26- Cluster de diferenciação 26 ou Dipeptidil peptidase 4

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMT2- Diabetes mellitus tipo 2

DPP4 - Dipeptidil-peptidase-4

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

eNOS - Oxido nítrico sintase endotelial

EPM – Erro padrão da média

EPAC – Proteína de troca ativada pelo AMPC

ERK1/2- Quinase regulada por sinal extracelular 1/2

Ex-4- Exendin-4, agonista do receptor de GLP-1

EX-9 – Exendin-9, antagonista do receptor de GLP-1

FPR- Fluxo plasmático renal

GI – Sistema gastrointestinal

GIP – Polipeptídeo inibidor gástrico

GLP-1 – Peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GPCR – Receptor acoplado à proteína G

GLP-1R – Receptor de peptídeo-1 semelhante ao glucagon

Gq- Subunidade q da proteína G

HDL- Lipoproteína de alta densidade

HEPES – Ácido 2- [4- (2-hidroxietil) -1-piperazinil]-etanosulfônico

HFD - Dieta hipercalórica “High fat diet”

IC- Insuficiência cardíaca

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

JHCO₃- Fluxo de bicarbonato

Na⁺/K⁺-ATPase - Bomba sódio potássio

K₂EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MAPK- Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MOPS – Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico

NEP- Neuropeptidase neutra

NHE3 – Isoforma 3 do trocador Na⁺/H⁺

NHERF- Fator regulador do NHE

NO – Óxido nítrico

OKP- Células de túbulo proximal renal de marsupial (“opossum kidney cells”)

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PBS – Tampão fosfato-salino

PCO₂ – Pressão parcial de gás carbônico

PE- 240 - Cateter de polietileno com 240 mm de diâmetro externo

PE- 60 – Cateter de polietileno com 60 mm de diâmetro externo

PI3K – Fosfatidilinositol 3- quinase

PKA – Proteína quinase dependente de AMPc

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PTH – Paratormônio

PVDF –Fluoreto de Polivinilideno

PVN- Núcleo paraventricular do hipotálamo

RFG - Ritmo de filtração glomerular

RVR – Resistência vascular renal

sDPP4- Dipeptidil peptidase 4 solúvel

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SGK- Proteína quinase induzida por soro e glicocorticoide

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

STZ- Estreptozotocina

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TP- Túbulo proximal

Lista de Figuras

Figura 1. O efeito incretina em indivíduos saudáveis e diabéticos.	21
Figura 2. Efeitos do GLP-1 sobre a homeostase da glicose.	22
Figura 3. A síntese do GLP-1.	23
Figura 4. A distribuição das células L-intestinais ao longo do epitélio gastrointestinal.	24
Figura 5. Os mecanismos de secreção de GLP-1 mediados por estímulos neurais e nutricionais.	29
Figura 6. Substratos da Dipeptidil Peptidase 4.	31
Figura 7. Degradação enzimática do GLP-1 pela dipeptidil peptidase 4	31
Figura 8. Esquema representativo das principais vias de sinalização deflagradas pela ativação do GLP-1R.	33
Figura 9. Os inibidores da DPP4 utilizados na prática clínica	34
Figura 10. Os Incretinomiméticos utilizados na prática clínica.	35
Figura 11. Os efeitos do agonismo farmacológico do GLP-1R sobre a célula beta pancreática.	37
Figura 12. Os efeitos pleiotrópicos do GLP-1.	38
Figura 13. Peptídeo-1 semelhante ao glucagon aumenta a secreção de insulina e reduz a glicemia e o apetite.	39
Figura 14. Desenho experimental do estudo. Foi realizado tratamento de 4 semanas com ratos espontaneamente hipertensos com antagonista do receptor de GLP-1 (exendin-9), agonista do receptor de GLP-1 exendin-4) e veículo.	48
Figura 15. Efeito da sinalização do GLP-1R sobre a glicemia e a insulinemia de jejum em SHRs.	61
Figura 16. Efeito endógeno e farmacológico do GLP-1 sobre a hemodinâmica de SHR	63
Figura 17. Atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos SHR tratados com Ex-4, Ex-9 ou veículo.	65
Figura 18. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre a hemodinâmica renal de SHRs.	66
Figura 19. Avaliação quantitativa e qualitativa do efeito da sinalização crônica do GLP-1R sobre a excreção urinária de proteínas.	67

Figura 20. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre a excreção urinária de proteínas em SHRs.	72
Figura 21. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre a estrutura do córtex renal de SHRs.....	69
Figura 22. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre os níveis de Angiotensinogênio plasmático e urinário em SHRs.....	71
Figura 23. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre o estresse oxidativo renal de SHRs.....	73
Figura 24. Sinalização intra-renal do receptor do GLP-1 em SHRs tratados durante 4 semanas com agonista do GLP-1R (SHR-ex-4), antagonista do GLP-1R (SHR-ex-9) e veículo (SHR-Ctrl).	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de Anticorpos Utilizados	59
Tabela 2. Parâmetros biométricos, bioquímicos e função renal dos ratos espontaneamente hipertensos tratados com antagonista do receptor de GLP-1 (SHR-EX-9), agonista do receptor de GLP-1 (SHR-EX-4) e veículo (SHR-CTRL).....	60

RESUMO

Aragão GC. *A modulação crônica do receptor de GLP-1 altera os níveis pressóricos, a estrutura e a função renal de ratos espontaneamente hipertensos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) é um hormônio incretina intestinal que exerce primariamente ações anti-hiperglicemiantes. Afim de viabilizar o emprego clínico deste peptídeo para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, foram criadas as terapias baseadas em incretinas que incluem as gliptinas, drogas que aumentam a meia-vida circulante do GLP-1 endógeno por meio da inibição da enzima dipeptidil peptidase-4 e agonistas exógenos do receptor de GLP-1 (GLP-1R). Demonstrou-se clínica e experimentalmente que estas classes de fármacos apresentam efeitos cardiorrenais benéficos que vão além do controle glicêmico. Dentre estes efeitos cardiorrenais incluem-se: diurese, natriurese e redução da pressão arterial. Recentemente, demonstramos que o bloqueio agudo da sinalização endógena do GLP-1R, por meio da administração sistêmica do antagonista do GLP-1R, exendin-9, em ratos normotensos causou efeitos antidiuréticos e anti-natriuréticos. Estes efeitos renais encontram-se associados à redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e ao aumento da atividade da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) em túbulo proximal renal. Entretanto, os efeitos da administração crônica do bloqueador de GLP-1R sobre a função renal e níveis pressóricos ainda permanece obscuro. Assim, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que o bloqueio do GLP-1 endógeno é capaz de aumentar a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e que este efeito está associado ao aumento da atividade do NHE3 em túbulo proximal renal. Além disso, testamos a hipótese que o bloqueio do GLP-1R piora o dano renal de ratos hipertensos ao passo que o agonismo farmacológico este receptor exerce renoproteção. Para tal, ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) com 5 semanas de idade foram tratados com exendin-9 (EX-9; 25 $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$), com agonista de GLP-1R, o exendin-4 (EX-4, 2,5 $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$) ou solução salina (controle), através de minibombas osmóticas, por um período de 4 semanas. A pressão arterial foi aferida semanalmente através de pletismografia caudal, a urina e sangue dos ratos foram coletados para avaliação da função renal e, ao término do tratamento, houve a mensuração invasiva da pressão arterial, bem como, morte dos ratos e coleta de amostras biológicas para a realização de

análises histológicas, bioquímicas e moleculares. A atividade do NHE3 em túbulo proximal renal foi determinada ao final do tratamento, em 4-5 ratos/grupo, por meio de microperfusão estacionária in vivo. Os valores da pressão arterial caudal ao final do tratamento demonstraram que os ratos tratados com exendin-9 apresentavam valores de pressão arterial maiores do que os controles (182 ± 4 vs. 172 ± 1 mmHg, $p < 0,05$), enquanto que o tratamento com exendin-4 atenuou a elevação da pressão arterial em relação aos controles (161 ± 4 vs. 172 ± 1 mmHg, $p < 0,01$). O aumento da pressão arterial em SHR tratados com EX-9 foi associado com maior atividade do NHE3 ($1,78 \pm 0,08$ nmol/cm²/s) no túbulo proximal renal comparados aos controles ($1,48 \pm 0,10$ nmol/cm²/s; $p < 0,05$) bem como aos SHR tratados com EX-4 ($1,19 \pm 0,07$ nmol/cm²/s, $p < 0,01$). Além disso, os SHRs tratados com o antagonista de GLP-1R apresentaram níveis de excreção de proteínas urinárias, marcadores de fibrose, inflamação, estresse oxidativo e atividade do sistema renina angiotensina (SRA) intra-renal superiores aos do controle. Por outro lado, a administração sistêmica de EX-4 exerceu efeitos anti-proteinurico, anti-inflamatório e antioxidante. A renoproteção mediada pelo tratamento com EX-4 em SHRs foi acompanhada por redução dos níveis de angiotensina II em córtex renal, sugerindo redução da atividade do SRA intra-renal. Em conjunto, estes resultados demonstram que o bloqueio do GLP-1R intensifica o aumento da pressão arterial e exacerba o dano renal em ratos espontaneamente hipertensos. Por sua vez, o agonismo do GLP-1R exerce efeitos anti-hipertensivo e renoprotetor.

Descritores: peptídeo 1 semelhante ao glucagon; incretinas; hipertensão; trocador de sódio-hidrogênio 3; ratos.

ABSTRACT

Aragão GC. Chronic modulation of GLP-1 receptor affects blood pressure, renal structure and function in spontaneously hypertensive rats [Thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2016.

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an incretin intestinal hormone that primarily exerts anti-hyperglycemic actions. In order to possibilitate the clinical use of this peptide for the treatment of type 2 diabetes mellitus, the incretin based therapies were created, which include the gliptins, drugs that increase the half-life of endogenous GLP-1 through the inhibition of the enzyme dipeptidil peptidase-4, and exogenous agonists of the receptor of GLP-1 (GLP-1R). It is well established that these classes of drugs exert cardiorenal beneficial effects that go beyond glycemic control. Among these cardiorenal effects are diuresis, natriuresis and reduction of blood pressure. We have recently demonstrated that acute blocking of the baseline GLP-1R signaling, via systemic administration of the GLP-1R antagonist, Exendin-9, causes anti-diuretic and anti-natriuretic effects in normotensive rats. These renal effects are associated with reduction of the glomerular filtration rate (GFR) and stimulation of proximal tubule Na^+/H^+ exchanger activity isoform 3 (NHE3). However, the effects of the chronic administration of the GLP-1R blocker on renal function and blood pressure levels remain obscure. Thus, this study aimed to test the hypothesis that GLP-1R blockade elevates blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) and that these effects are associated with upregulation of NHE3 activity. Additionally, we tested the hypothesis that GLP-1R blockade worsens kidney damage in hypertensive rats while pharmacological agonism of GLP-1R exerts renoprotection. To this end, 5-week-old SHR were treated during 4 weeks with Exendin-9 (EX-9; 25 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$), the agonist of GLP-1R receptor, Exendin-4 (EX-4, 2.5 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$) or saline (control), via osmotic minipumps. Blood pressure was weekly measured by plethysmography and urine and blood samples were collected for renal function evaluation. Direct measurement of blood pressure, collection of biological samples for histological, biochemical and molecular analysis were performed at the end of the treatment. At the end of the treatment, 4-5 rats/group were used for determination of NHE3 proximal tubule activity by *in vivo* determined by stationary microperfusion. SHRs treated with EX-9 displayed higher blood pressure values than SHRs treated with vehicle (182 ± 4 vs. 172 ± 1 mmHg, $p < 0.05$), while Exendin-4 treatment attenuated blood pressure

compared to controls (161 ± 4 vs. 172 ± 1 mmHg, $p < 0.01$). Blood pressure increase in SHR treated with EX-9 was associated with higher NHE3 activity (1.78 ± 0.08 nmol/cm²/s) in proximal renal tubule compared to controls (1.48 ± 0.10 nmol/cm²/s; $p < 0.05$), while EX-4-treated SHR treated displayed lower NHE3 activity (1.19 ± 0.07 nmol/cm²/s, $p < 0.01$). Additionally, SHRs treated with the GLP-1R antagonist show higher levels of urinary protein excretion, fibrosis, inflammation, oxidative stress markers and intrarenal renin angiotensin system (RAS) activity compared to control. On the other hand, systemic administration of EX-4 exerted anti-proteinuric, anti-inflammatory and antioxidant effects. The renoprotection conferred by EX-4 treatment was accompanied by lower renal cortex angiotensin II levels suggesting that GLP-1R activation reduces intra renal RAS activity. Collectively, these results demonstrate that chronic GLP-1R blockade in hypertensive rats intensifies blood pressure increase and exacerbates renal damage. On the other hand, the GLP-1R agonism exerts anti-hypertensive and renoprotective effects.

Keywords: glucagon-like peptide-1; incretins; hypertension; sodium-hydrogen exchanger 3; rats

1. Introdução

1.1. Efeito Incretina

Ao administrar glicose por via oral há uma maior liberação de insulina do que quando a mesma quantidade de glicose é administrada por via endovenosa. Esta resposta aumentada da insulina em resposta à glicose oral ocorre devido aos hormônios gastrointestinais, também conhecidos como incretinas, que são liberados em resposta às refeições, e que são capazes de potencializar a secreção de insulina estimulada por glicose bem como por outros macronutrientes. Os dois principais hormônios incretinas são o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) (1,2). Essas incretinas fornecem um sinal antecipatório do trato gastrointestinal para as ilhotas pancreáticas, moderando a elevação da glicose plasmática que se segue à ingestão e à absorção de uma refeição com carboidrato.

Em indivíduos saudáveis, o efeito incretina é responsável por 20-60% da secreção de insulina pós-prandial (3) (Figura 1). Contudo, indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2 apresentam menores níveis plasmáticos de GLP-1 ativo e efeito incretina prejudicado (Figura 1) (4–7).

De maneira geral, o GIP e o GLP-1 contribuem para a homeostase da glicose da seguinte forma: após a entrada de alimento no trato gastrointestinal existe a secreção do GIP pelas células K intestinais localizadas no duodeno e a secreção do GLP-1 pelas células L intestinais localizadas no jejuno. Estes hormônios são secretados na corrente sanguínea e atuam nas células- β pancreáticas aumentando a secreção de insulina e reduzindo a secreção

Figura 1. O efeito incretina em indivíduos saudáveis e diabéticos. Adaptado de: Nauck, 1986 e Wang X, 2016. A) Em indivíduos saudáveis, a secreção de insulina em resposta à administração oral de glicose (linha verde) é superior à secreção de insulina em resposta à infusão endovenosa (linha vermelha) de uma quantidade equivalente de glicose, este fenômeno é intitulado de efeito incretina representado pela área azul do gráfico. B) Em pacientes diabéticos existe um prejuízo na secreção de insulina em resposta à administração oral de glicose (linha verde) e consequentemente no efeito incretina representado pela área azul do gráfico. C) A secreção de GLP-1 em resposta à ingestão de glicose é menor em pacientes portadores de diabetes melitus tipo 2 (DMT2) do que nos indivíduos saudáveis normoglicêmicos.

de glucagon pelas células- α pancreáticas. Estas ações induzem respectivamente a maior captação de glicose pelo músculo e menor produção de glicose pelo fígado e assim desempenhando o importante papel no controle da glicemia (Figura 2).

Figura 2. Efeitos do GLP-1 sobre a homeostase da glicose. Adaptado de Gejl M, 2013. Após a ingestão de alimento, as células L e K intestinais secretam o GLP-1 e o GIP respectivamente. O GLP-1 atua sobre as células beta-pancreáticas ocasionando maior secreção de insulina, como consequência deste efeito, existe maior captação de glicose pelo músculo esquelético. O GIP por sua vez atua sobre as células alpha-pancreáticas reduzindo a secreção de glucagon e desta forma reduzindo a produção de glicose pelo fígado. Juntas estas ações levam ao controle glicêmico.

Estudos demonstraram que a resposta à secreção de insulina mediada por GIP na condição de DMT2 é totalmente perdida, enquanto que este fenômeno ainda pode ser estimulado por GLP-1 (8–11). Desta forma, o GLP-1 constitui um promissor alvo terapêutico para o tratamento da DMT2.

1.2. O peptídeo-1 semelhante ao glucagon

O GLP-1 possui 30 aminoácidos, é sintetizado por um processo pós-traducional tecido específico e secretado na corrente sanguínea pelas células L-intestinais em resposta à ingestão de alimentos (12).

Os níveis de GLP-1 bioativo no plasma variam na faixa de 5-10 pmol/L e estes valores aumentam cerca de duas a três vezes no período pós-prandial o que corresponde a valores entre 15-50 pmol/L. O retorno dos níveis plasmáticos basais deste peptídeo ocorre cerca de 180 min após o consumo alimentar. (13).

O GLP-1 é codificado pelo mesmo gene do glucagon, localizado no braço longo do cromossomo 2 humano. Após a síntese do Pré-Pró glucagon (PPG), este é clivado e origina pró-glucagon (PG), o precursor imediato do GLP-1 com 160 aminoácidos. O PG sofre um processo pós-traducional no pâncreas, no cérebro e no intestino por ação de enzimas denominadas pró-hormônio convertases (PC). Nas células- α pancreáticas o PG é clivado pela pró-hormônio convertase 2 originando o glucagon. Na célula L-intestinal e no sistema nervoso central, a PG é processada pelas PC1 e gera GLP-1, GLP-2, glicentina, oximodulina, peptídeo de intervenção-2 (14) (Figura 3).

Figura 3. A síntese do GLP-1. Adaptado de: Sandoval D, 2015. Inicialmente existe a clivagem do Pré-Pró glucagon (PPG) em pró-glucagon (PG). Após este processo, as enzimas pró-hormônio convertase (PC) irão atuar sobre o PG de maneira distinta no pâncreas, cérebro e intestino. Nas células α pancreáticas o PG será clivado pela PC2 e irá originar o glucagon. Diferentemente, nas células L-intestinais e no sistema nervoso central a PG após a ação da PC1, dará origem ao GLP-1, GLP-2, glicentina, oximodulina e peptídeo de intervenção-2.

As células-L intestinais são as responsáveis pela secreção de GLP-1 na circulação. Estas células estão localizadas ao longo do epitélio gastrointestinal, começando no jejuno proximal e aumentando sua densidade ao longo do intestino delgado e do intestino grosso (Baggio, Drucker, 2007). (Figura 4)

Fisiologia pós prandial normal

Figura 4. A distribuição das células L-intestinais ao longo do epitélio gastrointestinal. Adaptado de Pais R, 2016. O GIP é predominantemente secretado pelas células-K intestinais enquanto que o GLP-1 é secretado predominantemente pelas células-L intestinais. As células-K intestinais encontram-se principalmente no duodeno, enquanto que as células-L se encontram majoritariamente no intestino distal.

O segmento inicial capaz de secretar GLP-1 localiza-se cerca de 60 cm após o ligamento de Treitz (15). A sua liberação é bifásica sendo que a fase inicial é mais curta e tem início cerca de 10-15 min após a ingestão de alimento e num segundo momento existe a fase tardia, mais longa, com início cerca de 30-60 min pós-prandial, período no qual o pico máximo de GLP-1 no sangue é atingido (Figura 4)(13,16,17)

Tendo em vista que a fase inicial de secreção de GLP-1 ocorre cerca de 10-15 minutos após a ingestão de alimento, tem-se discutido se este primeiro estímulo secretor é mediado pelas células-L intestinais localizadas no intestino delgado superior ou se este rápido efeito secretor está relacionado a outros estímulos como um reflexo neural ou fatores

circulatórios. (18,19) Já a segunda fase de secreção de GLP-1 é mediada pelo contato direto de nutrientes com o intestino através da ativação de receptores específicos (20–22).

Neste contexto, diversos fatores vêm sendo associados à secreção do GLP-1, como: a quantidade e a composição do alimento ingerido, o número de células α e sua sensibilidade aos nutrientes, à liberação de hormônios, citocinas, ácidos biliares, metabolitos da microbiota intestinal, além do reflexo neural (Figura 5).

A secreção do GLP-1 foi inicialmente descrita em resposta à glicose, mas foi demonstrado que a secreção de GLP-1 em resposta à ingestão de dietas mistas é maior do que a resposta mediada por ingestão de glicose isoladamente. Este achado indica que existe sinergia na estimulação de secreção de GLP-1 por outros componentes nutricionais como a gordura e a proteína juntamente com a glicose (23,24).

Açúcares

As concentrações de glicose de 5-1000 mM ocasionam a secreção de GLP-1 *in vitro* e *in vivo*. A via envolvida neste processo envolve o cotransporte de sódio pelo cotransportador 1 de sódio/glicose (SGLT1). O SGLT1 é o principal transportador intestinal responsável pela absorção de glicose e galactose. O transporte de glicose via SGLT-1 é eletrogênico ($2\text{Na}^+ : 1\text{glicose}$). O influxo de íons de sódio despolariza a membrana plasmática, abre os canais de cálcio sensíveis à voltagem e ocorre a exocitose das vesículas contendo GLP-1 (25–28) Além disso, diminuição do cloreto de sódio prejudica a secreção de GLP-1, mediada por glicose o que sugere que a secreção de GLP-1 é dependente do cotransporte sódio/glicose, a despeito disso, um estudo demonstrou que a secreção de GLP-1 em resposta à carga oral de glicose está completamente abolida em camundongos nocaute para SGLT1 (29). No entanto o SGLT1 não é o único envolvido no mecanismo de secreção de GLP-1 em resposta a açúcares. Estudos demonstram que edulcorantes ocasionam secreção de GLP-1 *in vitro*, ademais a frutose é capaz de estimular secreção de GLP-1 *in vivo* através da ação de receptores do sabor doce. Estes receptores heterodímeros chamados T1R2/T1R3, são pertencentes à família dos GPCRs e estão presentes na cavidade

oral e no trato gastrointestinal; quando estimulados levam à ativação da proteína Gq e da fosfolipase C (PLC) com posterior secreção de GLP-1.

O canal para potássio sensível ao ATP (K^+ ATP) também tem sido reportado como possível envolvido na secreção de GLP-1 mediada por glicose. É proposto que o metabolismo da glicose aumenta os níveis de adenosina trifosfato (ATP), ocasionando o fechamento dos canais para potássio sensíveis ao ATP, despolarizando a membrana, aumentando os níveis de Ca^{2+} intracelular e a exocitose dos grânulos contendo GLP-1(30). Entretanto, estudos realizados *in vivo* com inibidores do K^+ ATP a glibenclamida, parecem não exercer efeito sobre a secreção de GLP-1 mediada por glicose (31).

Outro possível componente envolvido na via de secreção do GLP-1 mediado por glicose é o transportador de glicose 2 (GLUT2). Embora um estudo realizado em ratos knock-out para GLUT2 não tenha demonstrado diferenças na secreção de GLP-1, estudos *in vitro* e *in vivo* conduzidos com um inibidor do GLUT2 demonstraram prejuízo na secreção de GLP-1 induzida por glicose (30,32,33)

Proteínas

A proteína da carne hidrolisada conhecida como peptona estimula fortemente a secreção de GLP-1 *in vitro*(34). Este mecanismo envolve o receptor sensível ao cálcio (CaSR) e os canais de Ca^{2+} voltagem dependente (VGCC(35). Evidências sugerem que o CaSR atua como um sensor de aminoácidos no intestino mediando à secreção de hormônios intestinais como CCK, GLP-1 e GIP de maneira dependente de macronutrientes. (34–37). Ainda sobre a secreção de GLP-1 medida por peptona, um estudo *in vitro* sugere o envolvimento da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (38). Além disso, outros aminoácidos também têm sido descritos por estimular a secreção de GLP-1, dentre eles a L-glutamina, glicina, alanina e L-fenilalanina. (35,39–41).

Ademais, a ativação do receptor acoplado à proteína G, GPRC6A, e o transportador de peptídeo eletrogênico acoplado ao próton (PEPT1), também parecem estar envolvidos na secreção de GLP-1 mediada por aminoácidos(34,42).

Gorduras

Gorduras estimulam a secreção de GLP-1 de maneira potente (43,44). Inibidores de lipase atenuam o aumento dos níveis plasmáticos de GLP-1 após refeição gordurosa(45,46). Apenas ácidos graxos com cadeia superior a 10 carbonos parecem estimular a secreção de GLP-1 (43,44). Muitos GPCRs têm sido relacionados à secreção de GLP-1 estimulada por ácidos graxos, entre eles o GPR40, o GPR119 e o GPR120 (47).

Uma série de outros mecanismos diferentes dos GPCRs são associados à secreção de GLP-1 mediado por ácidos graxos. Dentre eles a proteína quinase C, a formação de quilomicrons pela ação da monoacilglicerolaciltransferase-2 e da diacilglicerolaciltransferase -1 (48,49).

Microbiota intestinal

A fermentação bacteriana de probióticos e carboidratos complexos não digeridos produzem ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs). Os SCFAs estimulam a secreção do GLP-1 mediado por GPR43 e GPR41 (50). A dieta probiótica em camundongos ob/ob, foi capaz de aumentar o número de células-L intestinais, os níveis de RNAm de pró-glucagon bem como os níveis plasmáticos de GLP-1 (51). A bactéria *Akkermanciamuciniphila* tem sido associada à secreção de GLP-1, por aumentar o número e a secreção das células-L intestinais. (51). O indol, um produto da degradação do aminoácido triptofano pelas bactérias intestinais, também tem associação com a secreção de GLP-1(52).

Ácidos biliares

Os ácidos biliares primários e secundários (formados pela modificação bacteriana) agem como moléculas sinalizadoras e estimulam a secreção de GLP-1. Eles agem em dois receptores, o receptor nuclear farnesóide X (FXR) e o receptor transmembrana acoplado a proteína G, o TGR5 (GPBAR1)(53).

Os sequestradores de ácidos biliares (BAS) são resinas usadas no tratamento da hipercolesterolemia e da diabetes mellitus, estas substâncias aumentaram a secreção de GLP-1 em camundongos obesos submetidos à dieta hipercalórica (54).

Mecanismos neurais

Os estímulos originados no trato gastrointestinal convergem a neurônios eferentes. Os neurônios eferentes compreendem neurônios colinérgicos e não colinérgicos, responsáveis pela liberação de GRP (peptídeo liberador de gastrina), VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e PACAP (peptídeo ativador de adenilil-ciclase pituitária) (55).

A estimulação colinérgica dos receptores muscarínicos M1, M2 e M3, ocasiona liberação de peptídeo liberador de gastrina (GRP). Este peptídeo está presente no trato gastrointestinal e através da ligação ao seu receptor (GRPR), afeta a proliferação e diferenciação celular, assim como vias neuroendócrinas (56,57). Estudos realizados com perfusão vascular isolada de colón e íleo de ratos demonstraram que a estimulação de GRP e GRPR favorecem a secreção de GLP-1 (58,59).

O ácido aminobutírico- γ (GABA) é conhecido por ser o principal neurotransmissor com atividade inibitória do SNC. Estudos *in vitro* sugerem que a ativação dos receptores desta substância, GABA_A e GABA_C, estimulam a secreção de GLP-1 (41,60).

Hormônios e citocinas

A somatostatina (SST) é um hormônio produzido pelas células-D localizadas no trato gastrointestinal. A secreção de somatostatina é estimulada pelo GIP, GLP-1 e CCK. A SST se liga ao seu receptor o SSTR5 acoplado a proteína G α i e leva a redução dos níveis de AMPc nas células entéricas e consequentemente reduz a secreção de GLP-1 (61,62).

O GIP ocasiona a secreção de GLP-1 *in vitro* e em camundongos submetidos à infusão endovenosa do mesmo, entretanto o GIP parece não exercer a mesma resposta secretora em humanos (8,63,64).

A grelina aumenta a secreção de GLP-1 induzida por glicose *in vivo* e *in vitro* através da quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) (65). A leptina também demonstrou ser capaz de estimular a secreção de GLP-1 *in vivo* e *in vitro* (21). O exercício físico demonstrou aumentar a secreção de GLP-1, um dos mecanismos provavelmente envolvidos é a IL-6 (66,67). Ademais estudos demonstraram que o TNF α , a RANTES (CCL5) e a insulina reduzem a secreção de GLP-1, enquanto que a progesterona, o NF κ B e a Nesfatina-1 estimulam a secreção de GLP-1 (35,65,68). Abaixo encontra-se um esquema representativo dos mecanismos neurais e nutricionais e hormonais capazes de induzir a secreção de GLP-1 pelas células-L intestinais (Figura 5).

Figura 5. Os mecanismos de secreção de GLP-1 mediados por estímulos neurais e nutricionais. Dentre os mecanismos associados a secreção do GLP-1, as células L intestinais podem detectar os nutrientes que atravessam a luz intestinal, mas também respondem a estímulos parácrinos, neurais e hormonais. O estímulo de secreção de GLP-1 pela glicose está associado à inibição dos canais para K^{+} , ativação do SGLT-1 e a ativação de receptores de sabor doce (T1R2 / T1R3) que ativam Gq e PLC. Os ácidos biliares estimulam a secreção de GLP-1 através dos receptores TGR5 e ativação da PKC. Os ácidos graxos atuam sobre os receptores GPR 40 e GPR 120, e as proteínas podem atuar através do receptor de detecção do Ca^{2+} (CaSR), que responde aos aminoácidos.

O número e a sensibilidade das células intestinais

A inibição das vias de sinalização NOTCH aumenta o número de células-L intestinais bem como a secreção de GLP-1 *in vitro* e *in vivo* (69). Ademais, o ciclo circadiano também interfere na secreção do GLP-1 em resposta a ingestão de alimentos, bem como os genes: fator embrionário tireotrófico e proteína tirosina fosfatase 4 a 1 (70).

1.3. A degradação do GLP-1

O GLP-1 tem curta meia vida plasmática (1,5-3 min), devido à rápida inativação enzimática pela dipeptidil peptidase 4 (DPP4). A DPP4, também conhecida como CD26 é uma peptidase multifuncional. A DPP4 pode estar ancorada na membrana ou na forma solúvel. Esta enzima transmite sinais através da membrana e interage com outros peptídeos de membrana. Sua complexidade é reforçada pela grande quantidade de substratos degradados por meio de sua atividade catalítica, os quais desempenham funções em diversos tecidos incluindo sistema imune e neuroendócrino (Figura 6) (71–77).

<u>Substratos da DPP4</u>
Peptídeo Atrial Natriurético (BNP)
Eritropoietina
Eotaxina
Peptídeo liberador de gastrina (GRP)
Glucagon
Peptideo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)
Peptideo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2)
Poli-peptídeo insulínico dependente de glucose (GIP)
Fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF)
CSF de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)
Hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e
Fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)
Proteína-1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1)
Quimiocina derivada de macrófago (MDC)

Proteína-1 inflamatória de macrófago (MIP-1), Quimiocina (C-C modificada) ligante 3- semelhante 1 (CCL3L1)
Oxintomodulina
Polipeptídeo ativado por adenilil ciclase pituitária (PACAP)
Neuropeptídeo Y (NPY)
Peptídeo tirosina (PYY)
Regulada sob ativação expressa e secretado por células T (Rantes)
Fator-1 derivado de estroma celular (SDF-1)
Substância P (SP)

Figura 6. Substratos da Dipeptidil Peptidase 4.

Entre os diversos substratos que da DPP4 atua, destaca-se o GLP-1. Este peptídeo tem sua atividade limitada pela degradação enzimática exercida pela DPP4. A DPP4 cliva os dois resíduos N-terminais deste peptídeo resultado na formas inativa do GLP-1, o GLP-1 (9-36 amida) (78) (Figura 7).

Figura 7. Degradação enzimática do GLP-1 pela dipeptidil peptidase 4. A DPP-4 inativa o GLP-1 ao clivar os peptídeos na região amino terminal e induzir a formação de GLP-1 (aminoácidos 9-36), essa rápida degradação pela DPP-4 limita os efeitos do GLP-1.

O metabólito inativo, GLP-1 (9-36 amida) é eliminado pelo fígado e pelos rins (79,80). Experimentos em ratos demonstraram que a superexpressão da DPP4 acarreta na redução dos níveis de GLP-1 ativo no plasma. A partir disso, abordagens terapêuticas foram desenvolvidas a fim de aumentar a biodisponibilidade do GLP-1, o papel delas será discutido posteriormente.

Além da clivagem pela DPP4, estudos *in vivo* demonstraram que a neuropeptidase neutra (NEP) também pode degradar, em menor escala, o GLP-1 (7-36) e o metabólito GLP-1 (9-36), gerando GLP-1 (28-36) (78). O principal produto da NEP é o GLP-1 (28-36)-amida e ele pode ser metabolizado pelos hepatócitos gerando dois produtos a partir da clivagem N-terminal, o GLP-1 (29-36) e o GLP-1 (31-36). O papel fisiológico destes peptídeos ainda não está elucidado(81,82).

1.4. O receptor de GLP-1

O receptor de GLP-1 (GLP-1R) é uma proteína de 64 kDa pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), classe B (secretina) e subclasse glucagon. Receptores deste tipo possuem 7 domínios α -helicoidais transmembrana (TM1-TM7), três alças extracelulares (EC1, EC2, EC3), três alças intracelulares (IC1, IC2, IC3), um grupo amino-terminal extracelular e um domínio carboxi-terminal intracelular(83,84).

Experimentos realizados em ratos e camundongos demonstraram que o GLP-1R é expresso no trato gastrointestinal (tecido glandular do estômago, íleo e colón, enterócitos, vilosidades do jejuno, células Paneth) células endócrinas, cromogranina A, pulmões, rins (glomérulo e túbulo proximal), SNC (hipotálamo, hipocampo córtex cerebral, gânglio nodoso, astrócitos e micróglia, amígdala, neurônios GABA e septo lateral), pâncreas (células- β pancreáticas), células do sistema imune (timócitos, células da medula óssea, células do nódulo linfático, esplenócitos, linfócito intestinal intra-epitelial), pele (predominantemente nos folículos pilosos), coração (cardiomiócitos, endocárdio, endotélio microvascular, células musculares da arterial coronária, endocárdio e vasos) (85–91). Em humanos a expressão do receptor de GLP-1 é semelhante à distribuição nos roedores. O GLP-1R em humanos está presente no trato gastrointestinal (células glandulares da mucosa gástrica, células parietais e células enteroendócrinas nas glândulas do piloro), nos pulmões, rins, cérebro, pâncreas (células- β e ductos pancreáticos) e no coração (endocárdio) (89,92–95).

A maior parte dos efeitos endócrinos do GLP-1 é mediada através da sua ligação da forma ativa do GLP-1 ao receptor GLP-1R. A ligação do GLP-1 ao seu receptor resulta na ativação da proteína G estimulatória (Gs), estimulação da adenilil ciclase, aumento dos níveis de AMPc intracelular e ativação da proteína quinase A, bem como da proteína de troca ativada diretamente pelo AMPc (EPAC) (Figura 8) (96–98).

Figura 8. Esquema representativo das principais vias de sinalização deflagradas pela ativação do GLP-1R. O GLP-1R é um GPCR, este receptor está acoplado à subunidade Gs e, portanto, quando ligado ao seu agonista, o GLP-1, existe a ativação de adenilil ciclase (AC), formação de AMP cíclico (cAMP) e este fenômeno ativa a proteína quinase A (PKA) e a proteína de troca diretamente ativada por AMPc (EPAC). A ativação da PKA e da EPAC estão envolvidas nos efeitos pancreáticos mediados pelo agonismo do GLP-1R.

1.5. As terapias baseadas em incretinas

Como o efeito insulínico do GLP-1 está parcialmente preservado na DMT2, diferente do GIP que não apresenta mais potencial insulínico nesta condição, muitos esforços foram empreendidos pela indústria farmacêutica, a fim de viabilizar o emprego terapêutico deste peptídeo (99). Tendo em vista contornar a limitação imposta pela curta meia vida do GLP-1, foram criadas duas estratégias terapêuticas denominadas terapias baseadas em incretinas, são elas:

- Os inibidores da DPP-IV, que aumentam a meia vida do peptídeo endógeno.

- Os incretinomiméticos são os agonistas do receptor de GLP-1R, conhecidos como incretinomiméticos de curta duração ou análogos do GLP-1 resistentes a inativação enzimática da DPP4, conhecidos como incretinomiméticos de longa duração;

1.5.1. Os inibidores da DPP4

O primeiro inibidor seletivo da DPP4 criado foi o sitagliptina, seguidamente a vildagliptina, saxagliptina, linagliptina e mais recentemente a alogliptina. Estes agentes são administrados via oral e formulados sozinhos ou combinados com outros agentes anti-hiperglicemiantes como a metformina (100). Abaixo encontra uma relação dos inibidores da DPP4 utilizados atualmente na prática clínica para tratamento da DMT2 (Figura 9).

<u>Inibidores da DPP4</u>						
Nome Genérico	Alogliptina	Linagliptina	Saxagliptina	Sitagliptina	Vildagliptina	Saxagliptina
Nome comercial	Nesina	Trajenta	Onglyza	Januvia	Galvus	Suiny
Via de Administração	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Frequência de Administração	1 vez ao dia	1 vez ao dia	1 vez ao dia	1 vez ao dia	1-2 vezes dia	2 vezes ao dia
Dose	25mg	5mg	5mg	100mg	100mg	100mg
Tempo de meia vida	21 horas	12 horas	2,5 horas	12,4 horas	2,96 horas	4,37 horas
Efeitos Adversos	Cefaleia, diarreia, prurido, mialgia, disfunção hepática, pancreatite			Cefaleia, infecção do trato respiratório, infecção urinária, pancreatite	Distúrbios neuropsiquiátricos, distúrbios neuropsiquiátricos, infecção do trato respiratório, pancreatite	Distúrbios neuropsiquiátricos, cefaleia, tontura, lombalgia, diarreia, angioedema, aumento das enzimas hepáticas, hepatite, pancreatite
		Distúrbios neuropsiquiátricos, pancreatite				Informação muito limitada

Figura 9. Os inibidores da DPP4 utilizados na prática clínica

1.5.2. Os Incretinomiméticos

Existem cinco representantes desta classe, usados frequentemente para o tratamento da DMT2: exenatida, liraglutida, lixenatida, dulaglutida a albiglutida. Todas as drogas

aprovadas até hoje, pertencentes a esta classe de medicamentos, são administradas por via subcutânea. Estas drogas foram subclassificadas em incretinomiméticos de curta (agonistas do receptor de GLP-1) ou longa ação (análogos do GLP-1) devido suas diferenças estruturais que afetam diretamente a meia vida e o intervalo dentre as doses administradas destes medicamentos (101). Na tabela abaixo estão relacionados os incretinomiméticos utilizados na prática clínica (Figura 10)

<u>Incretinomiméticos</u>				
Nome genérico	Exenatida	Exenatida (liberação extendida)	Liraglutida	Lixisenatida
Nome comercial	Byetta	Bydureon	Victoza	Lyxumia
Via de administração	Subcutanea	Subcutanea	Subcutanea	Subcutanea
Frequência de administração	2 x ao dia	1 x na semana	1x ao dia	1 vez ao dia
Dose	10ug	2mg	0,6mg	20ug
Tempo de meia vida	2.4 horas	2.4 horas	13 horas	1,5-4,5 horas
Efeitos adversos	Eventos gastrointestinais, tontura, hematoma no local de aplicação, infecção do trato respiratório, efeitos neuropsiquiátricos, angioedema, problemas dermatológicos, alopecia, sonolência, pancreatite.	Eventos gastrointestinais, neuropsiquiátricos, cefaleia, prurido no local de injeção, angioedema, problemas dermatológicos, alopecia, sonolência, pancreatite.	Eventos gastrointestinais, cefaleia, formação de anticorpo anti-liraglutida, pancreatite.	Eventos gastrointestinais, tontura, influenza, infecção do trato respiratório, infecção viral, sonolência, lombalgia, prurido no local de injeção, pancreatite.

Figura 10. Os Incretinomiméticos utilizados na prática clínica.

Os agonistas do GLP-1R são também chamados de incretinomiméticos de curta duração. Estas drogas foram desenvolvidas a partir da observação dos hábitos alimentares do monstro de Gila (*Heloderma suspectum*), um lagarto nativo do sudoeste dos Estados Unidos. Este animal apresenta uma frequência alimentar muito peculiar de forma que este só se alimenta quatro vezes ao ano. Durante os longos períodos de jejum o pâncreas deste animal não produz insulina, fica em estado dormente, entretanto nas raras ocasiões em que há presença de alimento, a secreção de insulina é reativada. Esta ação é desencadeada pela ação pancreática de um hormônio, secretado pelas glândulas salivares do animal, o exendin-4 (102), uma substância com efeitos muito semelhantes ao GLP-1 endógeno humano,

entretanto resistente à clivagem pela DPP4. A descoberta do exendin-4, influenciou a criação da exenatida (Byetta®) e do lixisenatida(103).

Os análogos do GLP-1 ou os também chamados incretinomiméticos de longa duração foram desenvolvidos baseados no GLP-1 humano. O liraglutida foi o primeiro incretinomimético de longa duração. Este peptídeo é um análogo do GLP-1 e possui 97% de homologia com a sequência do aminoácido humano nativo (101,104).

1.6. Ações pancreáticas do GLP-1

O GLP-1 foi primariamente descrito devido seu papel insulínico. Estes efeitos tem relação com a atuação deste hormônio sobre as células beta-pancreáticas, que são as responsáveis pela secreção de insulina (105).

Dentre as ações exercidas pelo GLP-1 que influenciam no controle glicêmico são citadas: o aumento da secreção de insulina, a melhora da sensibilidade à insulina e da captação periférica de glicose, além da redução do esvaziamento gástrico, da secreção de glucagon e da ingestão de alimentos(105).

A maioria das funções fisiológicas desempenhadas pelo GLP-1, como: o esvaziamento gástrico, a saciedade, a neuroproteção, as funções cardiovasculares bem como os mecanismos de sinalização ao nível molecular deste peptídeo, ainda não estão totalmente elucidadas pelos trabalhos científicos. Entretanto, as vias de sinalização que se referem à síntese e secreção de insulina bem como a proteção das células- β já estão esclarecidas. Os efeitos do GLP-1 sobre a célula β -pancreática estão representados em um esquema abaixo (Figura 11).

Figura 11. Os efeitos do agonismo farmacológico do GLP-1R sobre a célula beta pancreática. Adaptado de: Madeleine M. Fletcher, 2016. A sinalização de GLP-1R na célula-beta pancreática depende de mecanismos relacionados ao acoplamento a $G_{\alpha s}$ e ativação da PKA e da EPAC. Este processo leva a exocitose de insulina dependente do Ca^{2+} , a transcrição do gene da pró-insulina, ao sinal de sobrevivência da célula- β e a neogênese através da Ciclina D e ativação de CREB pela Bcl-2 e PI3K/PKB. O aumento do cálcio intracelular também aumenta a produção de ATP mitocondrial promovendo estocagem de insulina. A sinalização independente da proteína G ocorre através da regulação da β -arrestina a qual ativa a ERK, aumenta a produção de AMPc e estimula a atividade da CREB e a expressão de IRS-2.

As vias PKA e Epac2 e subsequente produção de AMPc, estão diretamente envolvidas na transcrição do gene da pro insulina e biossíntese/secreção de insulina (98). Além disso, a ativação da PKA inibe os canais KATP, aumentando Ca^{2+} intracelular, através do influxo de Ca^{2+} mediado pelos canais de Ca^{2+} voltagem dependente (VGCC), canais de cátion e mobilização do cálcio intracelular. Estes efeitos combinados levam ao aumento do Ca^{2+} citosólico e subsequente despolarização da membrana das células β -pancreáticas, resultando em exocitose da insulina. A Epac2 também está envolvida na exocitose de insulina dependente de Ca^{2+} , através da regulação da Rap1 pela fosfolipase-C- ϵ (106).

O GLP-1 favorece o armazenamento de insulina em células β -pancreáticas através do subexpressão de canais dependentes da voltagem de K^+ (kV) e correntes Kv o que leva ao aumento da produção de ATP mitocondrial e impede a repolarização da célula-beta (107,108). O processo de ativação da proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB) por Bcl-2, está envolvido na sobrevivência e proliferação de células β , ao passo que a neogênese de células- β está associada com a ativação de PKA de MAPK e ciclina D1. A

inibição da apoptose de células- β é regulada pela subexpressão de Akt / PKB mediado pela ativação de PI 3-quinase, através da inibição de capazes, NF κ B e FoxO1. O GLP-1 também promove a proliferação de células- β através da expressão de genes IRS-2 mediada por CREB, que levam à ativação da via PI3K/PKB. A proliferação e diferenciação de células- β está associada a PI3K e à atividade da ERK1/2 (109,110). Além disso, o estímulo do GLP-1R também ativa a β -arrestina, a qual aumenta a produção de AMPc e a secreção de insulina através da ativação da ERK/CREB e expressão do IRS2(111).

1.7. Ações Extra Pancreáticas do GLP-1

Estudos sugerem que o GLP-1 está associado à diversos efeitos pleiotrópicos, tais como: redução do esvaziamento gástrico, aumento da saciedade, estímulo à secreção de insulina pela célula- β pancreática, de maneira glicose dependente, bem como preservação da integridade e função destas células, além de desempenhar ações neuroprotetoras, cardioprotetoras, anti-inflamatórias e renoprotetoras (105) (Figura 12). Estas ações serão discutidas a seguir.

Figura 12. Os efeitos pleiotrópicos do GLP-1. O GLP-1 através do agonismo do seu receptor GLP-1R desempenha vários efeitos pleiotrópicos que vão além da atuação clássica sobre as células alfa pancreáticas e incluem: ações anti-inflamatórias, gastrointestinais, cerebrais, cardíacas e renais.

1.7.1. Ações gastrointestinais e neuronais do GLP-1

O GLP-1 é um mediador humoral do fenômeno chamado “*ileal brake*” ou freio íleal na sua tradução literal. Este fenômeno é desencadeado principalmente por gorduras e corresponde a desaceleração do trânsito intestinal, o que favorece a absorção dos nutrientes e inibe o aumento da secreção e da motilidade gástrica. Desta forma, o GLP-1 exerce ações humorais não somente através de seus efeitos como hormônio incretina, mas também através de ações no eixo entero-insular (112) (Figura 13).

Figura 13. Peptídeo-1 semelhante ao glucagon aumenta a secreção de insulina e reduz a glicemia e o apetite. Adaptado de Torekov et al, 2011 e Williams, 2009. Após a ingestão de alimento existe a secreção do GLP-1 pelas células L-intestinais a qual ativa a aferência vagal. O GLP-1 ativa os neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) projetados para o núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), para modular a saída do motor vagal ao pâncreas (e outros tecidos não representados na figura), aumenta a secreção de insulina em estados de hiperglicemia e suprime a secreção de o glucagon, reduzindo a glicemia. O GLP-1 sistêmico também pode acessar o cérebro através da passagem pela barreira hematoencefálica. No cérebro, a secreção de GLP-1 no NTS e projeções para os neurônios paraventricular (PVN) leva a ativação do receptor de GLP-1, o que promove a saciedade e anorexia.

A administração periférica de agonistas de GLP-1R exerce ações cerebrais através de vias humorais e adicionalmente através da via neural. Os agonistas do GLP-1R atuam

diretamente sobre o hipotálamo onde exercem efeitos locais primariamente em neurônios no núcleo arqueado (ARC), potencializando a saciedade e reduzindo a sinalização da fome (Figura 10) (113).

A injeção de liraglutida no ARC, PVN e LHA reduz o consumo de alimento, entretanto o núcleo ventromedial parece não estar envolvido neste fenômeno. A administração local de liraglutida no VMH estimula a termogênese do tecido adiposo marrom (114).

1.7.2. Ações hepáticas do GLP-1

O acúmulo de gordura no fígado induz a resposta inflamatória associada à esteato-hepatite não alcoólica. A administração de agonistas do receptor de GLP-1R está associada à redução dos valores de alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, além de favorecer o metabolismo lipídico e reduzir a massa gorda. O tratamento com liraglutida previne a doença hepática não alcoólica através da redução a apoptose mediada pelo estresse ocasionado por espécies reativas de oxigênio em ratos alimentados com dieta gorda (HFD). Além disso, neste modelo, o GLP-1 ainda demonstrou reduzir a esteatose e a inflamação lobular, provavelmente através do aumento da Sirtuina-1 (SIRT1). O em ratos HFD, o tratamento com exendin-4 reduz a expressão hepática de marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , e IL-6, bem como a infiltração de macrófagos. Em ensaios clínicos o tratamento com liraglutida durante 96 semanas reduziu a expressão de marcadores inflamatórios em 70 % dos pacientes (115).

1.7.3. Ações cardiorrenais do GLP-1

Cardioproteção

Estudos recentes têm demonstrado que os agonistas do GLP-1R possuem efeitos cardioprotetores. Estes fármacos diminuem a apoptose de cardiomiócitos

por meio da ativação de proteínas anti-apoptóticas, ativam vias de sinalização citoprotetoras, reduzem o tamanho do infarto e melhoram o fluxo coronariano por meio de ações vasodilatadoras (116–120). Camundongos nocaute para o GLP-1R exibem aumento da espessura da parede e aumento da pressão diastólica final no ventrículo esquerdo (VE) comparado a camundongos selvagens (121), sugerindo que a ativação endógena do GLP-1R pode desempenhar um importante papel sobre a função cardíaca. Estudos piloto avaliaram o efeito do GLP-1 em indivíduos diabéticos e não-diabéticos com insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Num estudo envolvendo 12 pacientes com insuficiência cardíaca avançada (estágios III e IV), a infusão de GLP-1, durante 5 semanas, melhorou significativamente a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e o consumo máximo de oxigênio destes indivíduos durante esforço físico (122). Efeitos benéficos semelhantes sobre a função do VE em pacientes com ICC foram corroborados por estudos subsequentes (123,124).

Além disso, os agonistas de GLP-1R desempenham efeitos benéficos como a redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. Sabe-se que o uso prolongado de agonistas de GLP-1R ocasiona redução de peso corpóreo e que este efeito parece estar associado com a diminuição da gordura tanto visceral como subcutânea (JENDLE et al., 2009). Recentemente foi aprovado pelo FDA o tratamento terapêutico obesidade com o liraglutida. Tal tratamento utiliza doses diárias de 3,0 mg/dia, a qual é superior a dose utilizada para o tratamento do DMT2 (entre 0,6 e 1,8 mg/dia)(CHRISTOU; KATSIKI; KIORTSIS, 2016; PI-SUNYER et al., 2015). Ademais, a terapia com agonistas de GLP-1R associa-se a redução dos valores de triglicérides, em como ao aumento do colesterol HDL (CHRISTOU; KATSIKI; KIORTSIS, 2016; PONZANI, 2013). O efeito descrito é resultante da melhora dos níveis lipídicos após a ingestão de alimento, o qual é mediado pelo GLP-1 (BANDSMA et al., 2010). Além dos efeitos descritos, o uso do liraglutida também está associado a menor risco de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral. (MARSO et al., 2016).

Vasoproteção

O GLP-1R é altamente expresso na vasculatura, sendo encontrado tanto em células endoteliais como em células musculares lisas vasculares humanas, bovinas e murinas (125,126). Em roedores, as ações vasodilatadoras dos agonistas de GLP-1R foram observadas em diversos leitos vasculares incluindo a artéria aorta, coronária, femoral, renal e pulmonar bem como em vasos de resistência (127–129). Ademais, tanto o GLP-1 nativo como os demais agonistas de GLP-1R sintéticos são capazes de melhorar a função endotelial em pacientes com DM2 por mecanismos independentes da glicemia (128–131). Os mecanismos pelos quais a ativação do GLP-1R medeia seus efeitos vasoprotetores envolve aumento da produção de óxido nítrico (NO), por meio da ativação da NO sintase endotelial (eNOS), bem como por meio do aumento dos níveis de AMPc em células musculares lisas(125,126). Efeitos vasoprotetores dos agonistas de GLP-1R foram relatados em modelos de injúria vascular aguda no qual a administração de exenatida inibiu a formação de neo-íntima e a proliferação de células musculares lisas após injúria mecânica (132). Além do mais, o tratamento crônico com exendina-4 reduziu a formação de lesão aterosclerótica em camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE) submetidos à dieta hiperlipídica (133). Ambos os estudos relataram redução da inflamação vascular em resposta ao tratamento com agonistas do GLP-1R que foi atribuído à diminuição da infiltração vascular de células inflamatórias. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o GLP-1 é capaz de reduzir a liberação de citocinas induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) em macrófagos, inibir a migração de linfócitos T, reprimir a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais e diminuir a proliferação de células musculares lisas (133–135). Em conjunto, estes efeitos foram responsáveis por reduzir a mortalidade em modelo experimental murino de sepse induzido por LPS (136).

Renoproteção

Os efeitos dos agonistas do GLP-1R e dos inibidores da DPP-IV tem sido extensivamente estudados em modelos de nefropatia diabética, onde atuam reduzindo a proteinúria, esclerose glomerular, expansão da matriz mesangial, estresse oxidativo e inflamação (137,138).

A inflamação é um fator de risco para nefropatia (139). O GLP-1R é expresso nos capilares e paredes vasculares do glomérulo de rins de camundongos, no glomérulo e túbulo contorcido proximais de ratos e porcos (85,140). A deficiência de GLP-1R contribui para a progressão da nefropatia diabética em camundongos C57BL/6-Akita, e o tratamento com liraglutida atenua a progressão da nefropatia neste modelo (141). Ademais estudos sugerem que o tratamento com agonista do receptor de GLP-1R, o exendin-4 está associado com a menor infiltração de macrófagos e moléculas inflamatórias em modelos de nefropatia diabética. O tratamento com exendin-4 diminui a expressão gênica de CD14, ICAM-1, e TGF β 1 em córtex renal, além de prevenir a infiltração de macrófagos e reduzir o estresse oxidativo em células tubulares renais de animais induzidos à diabetes por STZ (142–145).

Em um modelo experimental não diabético de dano glomerular o tratamento com alogliptina (20 mg/kg/dia), anagliptina (300 mg/kg/dia), ou exendin-4 (10 μ g/kg) reduziu a infiltração de macrófagos no rim (146). Em um modelo de doença renal induzido por cisplatina, o tratamento com alogliptina diminuiu o dano renal através de efeitos anti-apoptóticos (147). Adicionalmente o tratamento com exendin-4 ou sitagliptina reduziu significativamente a infiltração de macrófagos bem como a expressão de citocinas inflamatórias em um modelo de isquemia e reperfusão (148). Estes dados em conjuntos sugerem que as terapias baseadas em incretinas exercem um efeito renoprotetor através da redução da infiltração de macrófagos e de mediadores pró inflamatórios (142).

Evidências pré-clínicas sugerem que o complexo GLP-1/GLP-1R restringe a inflamação bem como atenua a hipertrofia renal e a hiperfiltração glomerular em diabéticos. Existem evidências que suportam a hipótese de que o complexo GLP-1/GLP-1R bem como

a ativação farmacológica do mesmo, estão associados à redução da hipertrofia e da hiperfiltração renal em modelos diabéticos, além da ação anti-inflamatória contra os efeitos citotóxicos da hiperglicemia (149).

Ações anti-hipertensivas dos incretinomiméticos

Além dos efeitos renoprotetores acima descritos, a administração farmacológica de GLP-1 está associada à homeostase de sódio e água. Em 1996, demonstrou-se, pela primeira vez, que a administração exógena de GLP-1 em ratos induzia diurese e natriurese (150). Este achado foi posteriormente confirmado em seres humanos e em numerosos modelos experimentais incluindo animais diabéticos e não diabéticos (151–153). Ademais, estudos apontam que a ocorrência de diurese e natriurese induzida pelo GLP-1 está associada a inibição da atividade da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) (85,152,154). De fato, estudos conduzidos em nosso laboratório, utilizando células da linhagem LLC-PK1 expostas ao exendin-4, mostraram que a ativação do receptor GLP-1R diminui significativamente a atividade do NHE3 *in vitro* (154). Investigamos também os efeitos do GLP-1 sobre a atividade do trocador NHE3 *in vivo*. Inicialmente, demonstramos por meio de RT-PCR e *immunoblotting* que o receptor de GLP-1R está expresso em túbulo proximal renal de ratos. A seguir, estudos de microperfusão estacionária *in vivo* demonstraram que o GLP-1 (20 nM) reduz significativamente a atividade do NHE3 em membrana apical de túbulo renal. Esta inibição da atividade do NHE3 induzida pelo GLP-1 é acompanhada por um aumento dos níveis de fosforilação dos resíduos de serina 552 e 605, sítios consenso para proteína quinase A (PKA), presentes na cauda citoplasmática do transportador (85).

Diversos estudos indicam que o tratamento com incretinomiméticos causa redução da pressão arterial em modelos de animais hipertensos (155–157). Em ratos Dahl sensíveis ao sal, a administração crônica de GLP-1 ou de seu análogo AC-3174 atenuou de modo significativo o desenvolvimento de hipertensão por meio do aumento do fluxo urinário e da fração de excreção de sódio confirmando que o GLP-1 possui propriedades natriuréticas e diuréticas que contribuem para o seu efeito anti-hipertensivo (155). O sistema renina

angiotensina aldosterona é um importante regulador do balanço hidroeletrolítico e da pressão arterial sistêmica através de sua atuação renal e/ou sistêmica (158). Apesar disso, estudos demonstraram que o agonismo do receptor de GLP-1 associa-se a menor atividade do SRA e que a administração de exendin-4 atenuou a progressão da hipertensão em camundongos obesos sensíveis ao sal infundidos com doses pressóricas de angiotensina-II (156,157).

Ensaios clínicos recentes demonstraram que a administração de GLP-1 ou seus análogos reduzem os níveis de pressão sanguínea (155,159,160). Um estudo envolvendo dados de seis estudos clínicos, verificou que o efeito anti-hipertensivo do exenatida persistiu durante pelo menos seis meses (155). Além disso, verificou-se que a utilização deste incretinomimético diminui a pressão arterial sistólica quando comparado com o tratamento com placebo ou com insulina, enquanto que os maiores efeitos anti-hipertensivos são mais elevados em pacientes com pressão sanguínea sistólica basal acima de 150 mmHg (161). Com base no exposto conclui-se que os agentes incretinomiméticos e inibidores da DPP-IV podem neutralizar mecanismos que induzem hipertensão sal-sensível em pacientes obesos, diabéticos, ou que sofrem de síndrome metabólica.

1.7.4. O efeito endógeno do GLP-1 sobre a função renal

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa foram dedicados a investigar o efeito da sinalização endógena do receptor de GLP-1 e a atividade do NHE3. Para esta observação utilizou-se o antagonista do receptor de GLP-1R, o exendin-9. Com base nos dados obtidos, sugere-se que o bloqueio da sinalização endógena do GLP-1R exerce efeitos antidiuréticos e anti-natriuréticos por reduzirem o RFG e inibirem a reabsorção de sódio dependente do NHE3 em túbulo proximal. Ademais, especula-se que a sinalização endógena GLP-1R exerce uma ação natriurética tônica que contribui para a regulação do equilíbrio de sódio e pode impedir a expansão do volume e manter a pressão do sangue dentro dos limites normais (162).

Está bem estabelecido que o agonismo farmacológico do GLP-1R está associado à redução da pressão arterial e a renoproteção, através de mecanismo que incluem a indução

de diurese e natriurese associada a inibição da atividade do trocador NHE3 em túbulo proximal renal, ações anti-inflamatórias e redução do estresse oxidativo intra-renal. No entanto ainda não se sabe se o GLP-1 endógeno pode desempenhar estes mesmos efeitos. O objetivo deste estudo é testar a hipótese de que o GLP-1 endógeno está associado à modulação dos níveis pressóricos em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Além disso, investigar se o agonismo do GLP-1R exerce ações renoprotetoras, ao passo que o bloqueio de GLP-1R piora a função renal nos SHR.

2. Objetivos

- Investigar se o bloqueio do GLP-1 endógeno é capaz de aumentar a pressão arterial e se este efeito está associado ao aumento da atividade do NHE3 em túbulo proximal renal em um modelo de hipertensão arterial essencial.
- Investigar se o bloqueio do GLP-1R piora o dano renal de ratos hipertensos ao passo que o agonismo farmacológico deste receptor exerce renoproteção em um modelo de hipertensão arterial essencial.

3. Métodos

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com os princípios éticos em pesquisa animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovadas pelo Comitê de Cuidado e Uso Institucional Animal, sessão de 21/08/2014, Protocolo de Pesquisa nº 094/14 (Anexo 1).

Os experimentos foram realizados em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) de 5 semanas de idade obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os ratos foram alojados no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em condições de temperatura controlada (22°C), o ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade relativa (60 %), com livre acesso à água e alimentos.

3.1. Desenho Experimental

Este trabalho foi conduzido com ratos espontaneamente hipertensos (SHRs), com 39 dias de vida, divididos em três grupos e tratados durante 4 semanas com:

- 1) SHR-CTRL= tratados com o veículo (solução salina)
- 2) SHR-Ex-9 = tratados com 25 µg /rato/dia de exendin-9 (antagonista de GLP-1R)
- 3) SHR-Ex-4= tratados com 1,0 µg/rato/dia de exendin-4 (agonista do receptor de GLP-1R).

O tratamento foi realizado através do implante subcutâneo de minibombas osmóticas no dorso dos ratos. A pressão arterial foi aferida por pletismografia caudal antes do início do tratamento e após, semanalmente. Na última semana de tratamento, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas para avaliação do consumo alimentar, ingestão de água e fluxo urinário e coleta de urina para análises posteriores. Ainda na última semana de tratamento foi realizada a coleta de sangue da artéria infra orbital para análise da glicemia e insulinemia de jejum. No último dia de tratamento a pressão arterial sistêmica foi aferida de maneira direta nos SHR anestesiados. Parte dos ratos foram encaminhados para a análise da hemodinâmica renal ou submetidos ao experimento de microperfusão estacionária. Após a eutanásia os tecidos renais e o sangue foram coletados para análises bioquímicas e moleculares (Figura 14).

Figura 14 Desenho experimental do estudo. Foi realizado tratamento de 4 semanas com ratos espontaneamente hipertensos com antagonista do receptor de GLP-1 (exendin-9), agonista do receptor de GLP-1 exendin-4) e veículo.

3.2. Avaliação Biométrica

Os ratos foram pesados antes do tratamento se iniciar e, semanalmente, durante todo o tratamento. A partir destes dados foi calculado o ganho de peso ponderal.

No dia da morte dos ratos, os rins foram seccionados, a cápsula renal foi removida e o peso do órgão foi aferido em balança analítica de precisão e expresso em miligramas. A partir da média obtida dos dois rins de cada animal, os dados do peso renal foram padronizados por quilograma de peso corpóreo.

3.3. Medida da pressão arterial

A pressão arterial caudal foi aferida antes do início do tratamento e após semanalmente de maneira indireta em ratos acordados, por meio de pletismografia caudal (BP Pressão Arterial Sistema de Análise -2000; Visitech Systems, Apex, NC). Antes do registro de tais medidas, os ratos foram treinados por 4 dias para se adaptar aos procedimentos experimentais. O procedimento foi realizado sempre no período matutino, pelo mesmo operador, durante cerca de 20 minutos.

No último dia de tratamento, a medida de pressão arterial foi realizada de maneira direta nos SHR anestesiados. A partir desta análise se obteve os valores de pressão arterial sistólica, diastólica e a frequência cardíaca. Os SHR foram anestesiados com xilazina e cetamina intraperitoneal (10mg/kg e 100mg/kg) em seguida houve a canulação da artéria femoral direita com um cateter de pressão de PE- 10 previamente preenchido por solução de salina e heparina e então, houve o registro das informações durante o período necessário para se obter um intervalo de aquisição de 15 minutos com o sistema Biopac (Biopac Systems Inc, EUA). Os dados obtidos foram avaliados com o programa Windaq.

3.4. Avaliação da função renal

Na última semana do tratamento, os SHRs foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas durante quatro dias consecutivos: o primeiro dia para acostumar os ratos nas gaiolas e os três dias seguintes para coletar a urina de 24 h. Durante este período, o registro do fluxo urinário, bem como do consumo alimentar e da ingestão de água foram monitorados diariamente.

As amostras de urina coletadas durante a realização da gaiola metabólica foram utilizadas para avaliar a função renal.

-Fluxo Urinário

O volume urinário foi medido e utilizado para calcular o fluxo urinário, corrigido pelo peso do rato e pelo tempo de coleta.

O fluxo urinário é expresso em ml/Kg/24h, fazendo-se o volume da urina em ml dividido pelo peso do animal em Kg.

-Ritmo de Filtração Glomerular

O ritmo de filtração glomerular foi estimado através do clearance de creatinina e foi expresso em ml/min/Kg. A creatinina urinaria foi determinada por meio de kit

(Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e a creatinina plasmática foi aferida pelo aparelho Beckman Coulter Synchron CX7 Analyser (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Para a determinação do ritmo de filtração glomerular (RFG) foi utilizado o valor do fluxo urinário (padronizado pelo peso do animal) multiplicado pelos dados obtidos pelo clearance de creatinina (mg/L), ou seja, o fluxo urinário multiplicado pela concentração da creatinina urinária, dividido pela concentração da creatinina plasmática.

$$\text{RFG} = \Phi \text{ urinário} \times \text{Creatina urinária} / \text{Creatinina plasmática (ml/min)}.$$

-Carga excretada de sódio e potássio urinários

A concentração urinária de sódio foi determinada pelo analisador de eletrólitos, ABL800 FLEX (Radiometer Copenhagen) e utilizada para calcular a carga excretada destes íons, expressos em mEq/kg/24h.

Para a calcular a carga excretada de sódio, o valor do fluxo urinário (padronizado pelo peso do animal) foi multiplicado pela quantidade de sódio presente na urina coletada de cada animal.

$$\text{CE Na}^+ = \Phi \text{ urinário} \times \text{Na}^+ \text{ urinário}$$

-Fração de excreção de Sódio

O cálculo da fração de excreção de sódio na urina foi obtido pela seguinte equação:

$$\text{FENa} = [(\text{UNa} \times \text{PCr}) / (\text{PNa} \times \text{UCr})] \times 100 (\%)$$

Onde:

UNa= Sódio urinário;

PCr= Creatinina plasmática;

PNa= Sódio plasmático e

UCr= Creatinina urinária.

- Clearance de Lítio

A concentração urinária de lítio foi aferida por fotômetro de chamas (Micronal B262, São Paulo, Brasil), os resultados foram expressos em ml/min/Kg.

O clearance de lítio representa a depuração plasmática do lítio por minuto e foi calculado pela seguinte fórmula:

$$CLi = ULi \times V / PLi$$

Onde:

ULi= concentração urinária de lítio;

V= fluxo urinário e

PLi= concentração plasmática de lítio.

-Excreção urinária de proteínas

A concentração de proteínas excretada na urina por dia foi determinada utilizando-se o kit sensiprot da Labtest. A análise da excreção de albumina urinária foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (Nephrot, Exocell). Os valores obtidos foram padronizados pela creatinina urinária.

3.5. Hemodinâmica Renal

Parte dos SHR foi destinada à avaliação do fluxo plasmático renal em colaboração com a Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu, do Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os SHR foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg) via intraperitoneal. Os SHR foram traqueotomizados para manutenção de ventilação eficiente com tubo de polietileno PE-240. A artéria carótida esquerda foi cateterizada com PE-60 para controle de Pressão arterial média por meio do aparelho Biopac Systems, Inc, Model MP100 (Santa Barbara, California, EUA). Foi então realizada uma incisão mediana abdominal, o pedículo renal esquerdo foi dissecado e a artéria renal isolada, nesta foi acoplada uma sonda de fluxo ultrassônico que estima o fluxo sanguíneo renal em ml/min (T110; Transonic Systems, Bethesda, MD, USA). Para estimar a resistência vascular

renal o valor da pressão arterial média aferida durante o experimento, foi dividida pelo valor do fluxo sanguíneo renal, o resultado foi expresso em mmHg/ml/min.

3.6. Microperfusão estacionária *in vivo*

Os experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* foram realizados em colaboração com o grupo de Biofísica Renal, coordenado pela Prof. Dr. Gerhard Malnic do Departamento de Fisiologia e Biofísica no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Estes experimentos visaram avaliar a atividade do NHE3 determinando-se o fluxo reabsortivo de bicarbonato (J_{HCO_3}), medido por meio de um microeletrodo de resina sensível a H^+ , em membrana apical de túbulo proximal de ratos SHR pertencentes aos três grupos experimentais (SHR, SHR+Ex-4 e SHR+Ex-9). Seguindo um protocolo previamente descrito por Malnic e Mello- Aires, 1971 e Amorim e Malnic, 2000, os ratos utilizados neste protocolo permaneceram alimentados com dieta normal de laboratório e com água a vontade até o momento do procedimento.

Para este procedimento, os SHR foram anestesiados com uma injeção intramuscular de Zoletil (tiletamina + zolazepam) e Xilazina nas doses de 50 e 5 mg/kg. Após serem devidamente anestesiados, os ratos foram levados a uma gaiola de Faraday e colocados em uma mesa cirúrgica aquecida a 37 °C, realizando-se uma traqueostomia para a melhor ventilação dos ratos. Em seguida, a jugular foi exposta e canulada para a infusão de uma solução fisiológica com manitol 3%, a 0,05 ml/min, com o intuito de tornar os túbulos mais visíveis, já que o manitol é um diurético osmótico.

Os ratos tiveram o rim esquerdo exposto através de uma incisão lombar, liberado da gordura perirrenal através de divulsão por meio de uma tesoura oftálmica e pinças pequenas. Depois de separado, o rim foi fixado e imobilizado com solução de Ringer Agar 5% *in situ* em um suporte para rim de Lucite. Posicionou-se um microscópio estereoscópio acima da mesa cirúrgica para que a superfície renal pudesse ser visualizada. Os túbulos renais foram observados utilizando-se um aumento de 40 à 100 vezes. O rim foi banhado por solução

Ringer à 37 °C durante todo o procedimento. A cauda do rato foi seccionada na extremidade e mergulhada em Becker contendo solução salina e fazia contato elétrico por ponte de ágar de KCl com uma hemicélula de Ag/AgCl. Desta forma, o compartimento extracelular do animal foi utilizado como nível de referência das medidas realizadas. Feito isto, iniciou-se de fato a microperfusão.

Com o auxílio de uma micropipeta dupla, um túbulo proximal foi puncionado. Um ramo da micropipeta foi utilizado para injetar solução de perfusão corada com verde-FDC, e o outro para injetar óleo de rícino corado com Sudan-black, utilizado para bloquear as colunas de fluido injetadas no lúmen. Para se injetar o conteúdo das micropipetas no lúmen do túbulo puncionado, estas foram conectadas, através de tubos de polietileno, a seringas de vidro para aplicação de ar sob pressão. No mesmo nefro, reconhecido pela perfusão com solução corada, foi implantado um microeletrodo de dois ramos, assimétrico, para a medida de pH a partir da variação do potencial elétrico. Os microeletrodos para a medida do pH foram calibrados antes e depois da perfusão do rim com solução tampão ringer-fosfato contendo 20 mM de fosfato e 130 mM de NaCl a 37 °C. Os valores de pH dos padrões foram ajustados para 6,5; 7,0 e 8,0 por meio de 0,1 N de NaOH ou HCl, obtendo-se a partir daí um valor de potencial para cada pH conhecido. Para cada túbulo se obteve um valor médio de pH estacionário, bicarbonato estacionário (HCO_3^-), meia-vida de acidificação ($t_{1/2}$) e fluxo de bicarbonato (JHCO_3). Para se medir o potencial elétrico utilizando-se o eletrodo de dois ramos, utilizou-se um sistema de medição experimental constituído por hemicélulas eletroquímicas ligadas a um voltímetro de alta impedância. Uma das hemicélulas era formada pelo ramo de maior diâmetro do eletrodo, seletivo ao H^+ e a outra era formada pelo ramo fino do microeletrodo. Em seu interior era colocado um fio de prata devidamente cloretado. Este ramo era preenchido de solução de KCl.

As medidas eram realizadas, para cada canal, comparando-se a diferença de potencial entre o eletrodo ligado ao canal e o terra do aparelho. O terra do aparelho estava conectado, através de um fio de cobre, à gaiola de Faraday que estava conectada, através de uma placa de liga de cobre e zinco e um fio de cobre, a uma terceira hemicélula. Esta terceira

hemicélula era constituída de um fio de prata cloretado submerso em uma solução de cloreto de potássio 3M. O valor da diferença de potencial (DDP) entre o ramo do microelétrodo preenchido com resina auxiliou na mensuração do pH da solução. O potencial de equilíbrio de um eletrodo íon-seletivo sensível à pH varia de acordo com a concentração de íon H⁺ na solução, para isto um dos eletrodos deve ter um potencial constante. Não foi considerado o potencial transmitido ao aparelho pelo terra, permanecendo apenas as variações por pH. Deste modo obteve-se um potencial para cada pH de calibração e, a partir desses potenciais é possível calcular o quanto o potencial medido no voltímetro varia para cada unidade de pH. As curvas de DDP foram obtidas a partir da solução perfusora inicial (pH₀) até um valor estacionário da DDP, correspondente ao nível mais ácido do pH luminal. Então, se originou uma curva que atinge um valor estacionário. Assim, a reabsorção de bicarbonato do túbulo proximal foi calculada através da medida contínua do pH luminal por meio de microelétrodos em uma coluna de fluido contendo bicarbonato isolada do fluído tubular (Malnic e Mello Aires, 1971).

O valor de pH obtido da maneira exposta acima foi utilizado para determinar a concentração de bicarbonato na solução tal como demonstra a equação de Henderson-Hasselbach, considerando a pCO₂ tubular igual ao do sangue arterial (Mello-Aires, et al., 1990 e Malnic; 1980). Após a obtenção das curvas experimentais e da aquisição de valores de t^{1/2}, JHCO₃⁻, HCO₃⁻ estacionário e pH estacionário foi realizada análise estatística para determinar a significância das diferenças entre os grupos experimentais.

Para medição do fluxo de reabsorção de bicarbonato (JHCO₃⁻) durante a microperfusão utilizou-se a equação de Henderson- Hasselbach na qual taxa de acidificação tubular foi expressa como a meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato (HCO₃⁻) ao nível estacionário (t^{1/2}), multiplicado pela metade do raio do túbulo (r/2)

$$JHCO_3^- = \frac{1n2}{t^{1/2}[(HCO_3^-)_0 - (HCO_3^-)_s]} \times \frac{r}{2}$$

3.7. Preparação do homogenato de córtex renal

A cápsula renal foi removida com o auxílio de uma pinça, o rim foi cortado ao meio longitudinalmente e o córtex renal foi removido. As porções referentes ao córtex foram imediatamente transferidas para um tubo contendo tampão PBS gelado (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; pH 7,4) com inibidores de proteases (0,7 µg/ml de pepstatina A; 0,5 µg/ml de leupeptina e 40 µg/ml de PMSF) e inibidores de fosfatases (50 mM de pirofosfato de sódio e 15 mM defluoreto de sódio). Seguidamente os córtices renais foram homogeneizados utilizando um homogeneizador de tecidos Potter-Elvehjem (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc., Lucerna, Suíça). Após este procedimento o homogenato obtido foi aliquoteado e armazenado em freezer à -80°C.

3.8 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração proteica no homogenato de córtex foi determinada pelo método de Lowry (163). O método se dá pela adição de hidróxido de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de cobre e tartarato de sódio a uma mistura com proteínas. Seguidamente adiciona-se Folin-fenol, composto que na presença de proteínas reage produzindo coloração azul com absorção máxima em 750nm.

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a quantificação proteica do homogenato obtido, quantidades equivalentes de proteína ou volumes iguais de plasma, foram ressuspensas em 50 µL de tampão de amostra para eletroforese (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 2,0% de SDS; 20% de glicerol; 1,96% de β-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol). Adicionou-se 10µL de padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad) para determinar a massa molecular aproximada das proteínas bem como monitorar o progresso da corrida. A eletroforese foi realizada segundo procedimento descrito por Laemmli (164). O gel de corrida constitui-se de 7,5% de acrilamida e o gel de empilhamento de 3%. Em seguida as

amostras foram aplicadas nos poços imersos em tampão de eletroforese (25 mM Tris-base; pH 7,4; 192 mM glicina) e após este procedimento se deu início a corrida. A corrida foi interrompida quando toda a linha do corante de bromofenol azul saiu do gel.

3.10 Coloração do Gel com nitrato de prata

A análise da excreção de proteínas urinárias foi realizada através da coloração do gel com nitrato de prata, para isso foi utilizado o kit Proteo Silver Plus Stain (Sigma Aldrich) de acordo com as indicações do fabricante.

3.11 Immunoblotting

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). Para isso a membrana foi hidratada em metanol, lavada em água MilliQ e equilibrada em tampão de transferência. Para a transferência utilizou-se um sistema tipo sanduíche (GE Healthcare, TE62) submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada voltagem de 350 mA durante toda a noite a temperatura de 4°C. Após este procedimento, a membrana foi corada por 10 minutos com Ponceau (Ponceau S – Sigma - 0,1%; ácido acético 10%) e lavada com água MilliQ, até que as bandas desejadas pudessem ser visualizadas.

Após a transferência, a membrana permaneceu em solução de bloqueio (150mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; 5% leite em pó desnatado e 0,1% Tween-20) durante uma hora. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário durante toda a noite, à temperatura de 4°C, sob leve agitação. Após este procedimento, as membranas foram lavadas com solução de bloqueio durante 10 minutos, este processo foi repetido por 5 vezes. Após as lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário à temperatura ambiente. Seguidamente, a membrana foi novamente lavada com solução de bloqueio por cinco vezes, durante 10 minutos cada lavagem. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de dois minutos cada, com PBS 1% e

logo após a membrana foi incubada sob leve agitação, durante 2 minutos com ECL (Luminol; ácido p-Cumárico; peróxido de hidrogênio à 30%; 1M de Tris-HCl e pH 8.5), um reagente para imuno-deteção através de quimiluminescência. Em seguida, a membrana foi exposta utilizando o digitalizador de imagens ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, USA) e posteriormente as imagens foram analisadas por densitometria por meio do ImageJ (Scion).

3.12 Análises Histológicas

Os rins foram fixados durante 24 horas em formalina 10% ou methacarn (60% metanol; 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) e depois deste período os tecidos foram armazenados em álcool 70 % até à data da incorporação em parafina em um processador de tecidos manual. Secções transversais dos rins foram cortados a espessura de 4 µm. Os tecidos previamente fixados em paraformaldeído foram coradas pela reação de tricrômico masson para avaliação de colágeno no tecido renal. Após isto 15 campos foram analisados sob microscopia de luz (aumento de 400x) utilizando o software Quantimet Leica, onde foi analisada a relação da área de tecido corada em azul (colágeno) pela área total de tecido do campo analisado, além disso, as marcações de colágeno perivasculares foram descontadas da análise. Os tecidos de rim de ratos que foram fixados em methacarn foram utilizados para realizar análises de infiltração de macrófagos através de imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal para CD68 (ED1) e para avaliação dos fibroblastos intersticiais através de anticorpo para actina de musculo liso (SMA). Para isso, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal para ED1 (1:200, por 12 horas, a 4°C; Abcam) ou anticorpo monoclonal para SMA (1:200, por 12 horas, a 4°C; Abcam). O produto desta reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina na presença de água oxigenada. A contra coloração foi feita com hematoxilina. Foram analisados 20 campos por lamina (aumento de 400x) com o software Quantimet Leica. O resultado foi expresso em média do número de

células CD68 positivas/campo por grupo e no caso do SMA os resultados foram expressos como a relação da área corada para SMA por área de tecido do campo analisado.

3.13 Avaliação estresse oxidativo

A análise do malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, foi verificado nas amostras de homogenato renal. A quantidade de MDA é determinada através de substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS), os valores foram determinados por kit colorimétrico da (CAY-10009055, Cayman). Os valores de MDA detectados pelo ensaio no tecido renal foram expressos em nmol/ μ g de proteína. Além disso, foi avaliada no homogenato renal a concentração de glutathiona reduzida (GSH) o principal antioxidante endógeno. O experimento em questão foi realizado por meio de kit colorimétrico de Glutathiona (CAY-703002, Cayman) de acordo com as orientações do fabricante. Os valores obtidos por meio desta análise foram expressos em μ mol/ μ g de proteína.

3.14 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

As concentrações de angiotensinogênio urinário (IBL), de insulina plasmática (Millipore) e de Angiotensina II (Phoenix Pharmaceutica) em córtex renal foram determinadas por ELISA, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.15 Anticorpos Utilizados

Tabela 1. Lista de Anticorpos Utilizados

Anticorpo	Marca	Diluição	Solução de Bloqueio
NHE3 (clone3H3)	PSA (Yale)	1:500	leite
NHE3- P552(clone 14D5)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	leite
Actina	Merck	1:50000	leite
P-Ser/Thr PKA	Cell Signaling Technology	1:2000	BSA
AGT	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	BSA
TGF-beta 1	Sigma	1:1000	Leite

3.16 Estatística

Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão, N indica o número da amostra. As comparações foram realizadas por análise de variância, ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 A modulação do GLP-1R altera o peso corporal e a ingestão de água em SHRs

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos a partir da análise dos parâmetros biométricos e bioquímicos dos SHRs tratados com veículo, exendin-9 (EX-9) ou exendin-4 (EX-4).

Conforme observado, o tratamento com agonista e antagonista do receptor de GLP-1 não alterou o consumo de ração ou de água dos ratos. Contudo, observou-se uma redução do

ganho de peso nos ratos tratados com Ex-4 em relação ao grupo controle. Não houve variação da relação peso do rim/peso corpóreo entre os três grupos estudados.

Tabela 2. Parâmetros biométricos, bioquímicos e função renal dos ratos espontaneamente hipertensos tratados com antagonista do receptor de GLP-1 (SHR-EX-9), agonista do receptor de GLP-1 (SHR-EX-4) e veículo (SHR-CTRL).

	<u>SHR-CTRL</u>	<u>SHR-EX-9</u>	<u>SHR-EX-4</u>
Peso inicial (g)	103 ± 1 (14)	103 ± 1 (20)	101 ± 2 (15)
Peso final (g)	208 ± 5 (14)	213 ± 2 (20)	202 ± 5 (15)
Ganho de peso (%)	126 ± 8 (14)	140 ± 9 (20)	96 ± 6* (15)
Ingestão de água (ml/24h/dia)	72 ± 2 (8)	77 ± 3 (8)	79 ± 4 (9)
Consumo de ração (mg/24h/kg)	100 ± 5 (8)	101 ± 4 (8)	104 ± 4 (9)
Peso do Rim/Peso Corpóreo (mg/g)	5,56 ± 0,81 (14)	4,91 ± 0,72 (20)	5,43 ± 0,51 (15)
Fluxo urinário (ml/24h/kg)	40 ± 6 (8)	42 ± 5 (8)	44 ± 7 (9)
Excreção de Na⁺ urinário (mEq/24h/kg)	5,4 ± 0,4 (8)	4,8 ± 0,5 (8)	5,2 ± 0,5 (9)
FE Na⁺ (%)	0,68 ± 0,08 (8)	0,74 ± 0,07 (8)	0,75 ± 0,04 (9)
Li⁺ Clearance (mL/min/kg)	2,08 ± 0,06 (8)	1,82 ± 0,05* (8)	2,52 ± 0,09*** (8)

4.2 O bloqueio crônico do GLP-1R reduz a sensibilidade à insulina em SHRs

Avaliamos a glicemia (Figura 15A) e a insulinemia de jejum (Figura 15B) nos três grupos de ratos. Conforme atesta a Figura 15A, não houve variação na glicemia de jejum entre os grupos. Por sua vez, observa-se que os SHRs tratados com o antagonista do GLP-1R EX-9 apresentam níveis plasmáticos de insulina de jejum aumentados em relação ao controle ($1,15 \pm 0,07$ vs. $0,78 \pm 0,02$ ng/ml, $P < 0,05$). De maneira oposta, os SHRs tratados com exendin -4 apresentam uma redução dos níveis plasmáticos de insulina ($0,60 \pm 0,03$ vs. $0,78 \pm 0,02$ ng/ml, $P < 0,05$) (Figura 15B).

Realizou-se também o cálculo do índice HOMA para verificar a sensibilidade à insulina dos ratos em questão. Os ratos tratados com exendin-9 têm índice HOMA1-IR superiores aos dos ratos controle ($2,91 \pm 0,09$ vs. $1,53 \pm 0,11$, $P < 0,05$) (Figura 12C).

Figura 15. Efeito da sinalização do GLP-1R sobre a glicemia e a insulinemia de jejum em SHRs. A) Avaliação dos níveis de glicose e B) Níveis de insulina plasmáticos, realizada após 8 horas de jejum em SHRs tratados com salina (SHR-CTRL), agonista do GLP-1R (SHR-Ex-4) ou antagonista do receptor GLP-1R (SHR-Ex-9). C) Índice HOMA1-IR (homeostasis model assessment insulin resistance). Os valores estão apresentados como médias de animal/grupo * $P < 0,05$ vs. CTRL.

4.3 A modulação crônica do GLP-1R altera a pressão arterial de SHRs

Com o intuito de investigar as possíveis alterações cardiovasculares associadas ao antagonismo e ao agonismo crônico do receptor de GLP-1, analisamos semanalmente a pressão arterial sistólica de forma indireta e ao final do tratamento aferimos a pressão arterial sistólica, diastólica e a frequência cardíaca de maneira invasiva nos três grupos de tratamento. No que diz respeito à medida indireta da pressão arterial sistólica durante o decorrer do tratamento, nota-se que o bloqueio do GLP-1R, através do tratamento com

antagonista do receptor de GLP-1, exendin-9, ocasiona um efeito tônico sobre os níveis de pressão arterial de ratos SHR durante todo o tratamento comparado ao controle. De maneira oposta o agonismo do receptor de GLP-1R atenua a elevação dos níveis de pressão arterial em SHR de maneira persistente durante as 4 semanas de tratamento comparado aos SHR tratados com veículo(Figura 16A).

Na última semana de tratamento a aferição da pressão arterial sistólica caudal corrobora com estes achados demonstrando que o bloqueio da sinalização do GLP-1R está associado ao aumento dos valores de pressão arterial comparado aos SHR tratados com veículo (182 ± 4 vs. 172 ± 1 , $P < 0.05$). De maneira oposta o agonismo do GLP-1R atenua a elevação da pressão arterial sistólica na última semana de tratamento (161 ± 4 vs. 172 ± 1 , $P < 0.01$). Além disso, o mesmo efeito ocorre no que se refere aos valores de pressão arterial sistólica aferidas de maneira invasiva, nos SHR anestesiados ao final do tratamento (SHR-Ctrl $139 \pm 2,6$; SHR-Ex-9 $149 \pm 0,86$; SHR-Ex-4 $127 \pm 1,44$) (Figura 16B).

Os valores de pressão arterial diastólica após as quatro semanas de tratamento, não diferem entre os grupos (Figura 16C). Ademais, a frequência cardíaca observada com a análise invasiva ao final do tratamento não constatou diferença entre os grupos de tratamento (Figura 16D).

Figura 16. Efeito endógeno e farmacológico do GLP-1 sobre a hemodinâmica de SHRs. A) Pressão sistólica da artéria caudal; B) Pressão arterial sistólica (PAS); C) Pressão arterial diastólica (PAD) e a D) Frequência cardíaca (FC). A pressão arterial sistólica caudal foi aferida por pletismografia caudal semanalmente. Os outros parâmetros foram aferidos de maneira invasiva, na última semana de tratamento nos SHR-Ctrl (n =6); SHR-Ex-4 (n =6) e SHR-Ex-9 (n =5). Dados expressos em média por grupo (ANOVA). *P<0.05, **P<0.001 vs SHR-Ctrl.

4.4 A modulação crônica do GLP-1R altera a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de SHRs

Avaliamos se a modulação crônica do receptor de GLP-1 neste modelo estaria associada a alterações da função renal. Os parâmetros de função renal avaliados, fluxo urinário, a carga excretada de sódio e o RFG não apresentaram diferença estatística entre os grupos de tratamento.

A atividade da isoforma 3 do trocador sódio e hidrogênio (NHE3) foi avaliada por meio de experimentos de microperfusão estacionária. As análises realizadas demonstraram que existe uma maior reabsorção de bicarbonato no grupo Ex-9, indicando assim uma maior

atividade do trocador NHE3 neste grupo de ratos comparando-se aos SHR controle ($1,78 \pm 0,08$ vs. $1,48 \pm 0,10$ nmol/cm²/s $P < 0,05$) enquanto que se observa uma menor reabsorção de bicarbonato nos SHR tratados com agonista do GLP-1R, o que indica menor atividade deste trocador neste grupo ($1,19 \pm 0,07$ vs. $1,48 \pm 0,10$ nmol/cm²/s $P < 0,01$)(Figura 17A).

A fosforilação da serina 552 na região C-terminal do NHE3 é necessária para que a PKA exerça inibição da troca de sódio e hidrogênio. Dada a importância da relação entre a fosforilação do sítio consenso para PKA, serina 552 com a atividade do NHE3, avaliamos esta modificação por meio da técnica de *immunoblotting* em tecidos de córtex renal de ratos SHR tratados com agonista e antagonista do receptor de GLP-1R. A expressão do NHE3 total em córtex renal não difere entre os grupos de tratamento. Os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 estão diminuídos nos SHR tratados com antagonista do receptor de GLP-1 indicando assim maior atividade do trocador e diferentemente a fosforilação do NHE3 na serina 552 encontra-se aumentada nos SHR tratados com agonista do GLP-1R (Figura 17B).

Figura 17. Atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos SHR tratados com Ex-4, Ex-9 ou veículo. A reabsorção de bicarbonato (J_{HCO_3}) foi avaliada por meio de microperfusão estacionária e por medição contínua do pH luminal n = número de túbulos perfundidos = 6 a 10/grupo. Amostras equivalentes (15 μ g para o NHE3, 5 μ g para o NHE3-PS552 e 2,5 μ g para actina) de proteínas de membrana isoladas de córtex renal foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para a membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". As membranas PVDF foram incubadas com anticorpo monoclonal contra o NHE3 total (1:1000), contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (1:1000) e contra actina (1:50,000). *P < 0,05 vs. CTRL.

4.5 A modulação crônica do GLP-1R altera a RVR em SHRs

Avaliou-se a seguir o efeito da administração crônica de antagonista ou agonista de GLP-1R sobre a hemodinâmica renal de SHR. Observou-se que o ritmo de filtração glomerular (Figura 18A) e o fluxo plasmático renal (Figura 18C) não diferem entre os três grupos experimentais. No entanto, a resistência vascular renal (RVR) é menor nos SHR tratados com exendin-4 e maior nos SHR tratados com exendin-9 comparados ao controle (Figura 18B).

Figura 18. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre a hemodinâmica renal de SHRs. SHR-Ctrl (n= 6), SHR-Ex-4 (n=8) e SHR-Ex-9 (n=7). *P<0.05, **P<0.01 vs. Ctrl.

4.6 Os efeitos da modulação crônica do GLP-1R sobre a estrutura renal de SHRs

A avaliação da excreção urinária de proteínas totais e de albumina foi realizada neste modelo. A partir desta avaliação observamos que o tratamento com exendin-9 é capaz de aumentar a excreção de proteínas urinárias em relação aos SHR tratados com veículos, enquanto que o agonismo farmacológico do receptor está associado a uma redução de excreção de proteínas urinárias comparado ao controle (Figura 19).

Figura 19. Avaliação quantitativa e qualitativa do efeito da sinalização crônica do GLP-1R sobre a excreção urinária de proteínas. A) Excreção de proteínas urinárias e B) Gel Silver Stain de urina. Os experimentos foram realizados com urinas de SHRs tratados com salina (SHR-CTRL), agonista do GLP-1R (SHR-Ex-4) ou antagonista do receptor GLP-1R (SHR-Ex-9) durante 4 semanas. Os valores estão apresentados como médias de animal/grupo *P <0,05 vs. CTRL.

Além disso, o tratamento com o antagonista do receptor de GLP-1 aumenta a excreção urinária de albumina ($0,34 \pm 0,02$ vs. $0,22 \pm 0,04$, $P < 0,05$), enquanto que de maneira oposta agonista do receptor de GLP-1 (Ex-4), reduz a excreção urinária de albumina em ratos SHR após 4 semanas de tratamento neste modelo ($0,10 \pm 0,02$ vs. $0,22 \pm 0,04$; $P < 0,05$) (Figura 20).

De acordo com os dados obtidos a partir da quantificação das células CD68 positivas em córtex renal, os SHR tratados com antagonista do receptor de GLP-1 possuem um aumento significativo da infiltração de macrófagos em relação ao controle (27 ± 3 vs. 18 ± 2 células/campo, $P < 0,05$), e de maneira oposta os SHR tratados com agonista do receptor de

GLP-1 possuem uma tendência a menor infiltração de células CD68+ no córtex renal, em comparação aos SHR tratados com veículo (13 ± 1 vs. 18 ± 2 células/campo).

Avaliamos também um marcador pró-fibrótico no córtex renal dos SHR, através de imunohistoquímica para SMA. Observamos que os SHR tratados com exendin-9 possuem aumento da expressão de actina de músculo liso comparado aos SHR controles ($1,24 \pm 0,23$ vs. $0,71 \pm 0,04\%$; $P < 0.05$) e inversamente os SHR tratados com exendin-4 possuem menor expressão deste marcador comparado aos SHR tratados com veículo ($0,27 \pm 0,04$ vs. $0,71 \pm 0,04\%$, $P < 0.05$). Além disso, realizamos a quantificação da fibrose em córtex renal através da histologia com coloração para tricrômico Masson e observamos que os SHR tratados com antagonista do receptor de GLP-1 apresentam uma tendência à maior fibrose do que os SHR tratados com veículo e contrariamente os SHR tratados com agonista do receptor de GLP-1 apresentam fibrose inferior ao controle (Figura 20).

Figura 20. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre a estrutura do córtex renal de SHRs. SHR-Ctrl (n= 5-8), SHR-Ex-4 (n=6-8) e SHR-Ex-9 (n=6-8). *P<0.05 vs. Ctrl.

4.7 A modulação crônica do GLP-1R altera componentes do SRAA intra-renal em SHRs

O angiotensinogênio plasmático não variou entre os grupos. Entretanto, os valores urinários de angiotensinogênio estão maiores nos SHR tratados com antagonista do receptor de GLP-1R ($218,0 \pm 28,22$ vs. $100,0 \pm 12,83$, $P < 0.05$) e de maneira contrária, a concentração de angiotensinogênio urinário encontra-se reduzida nos SHR tratados com exendin-4 em comparação aos SHR tratados com veículo ($27,77 \pm 9,695$ vs. $100,0 \pm 12,83$, $P < 0.05$) (Figura 21). A angiotensina II foi dosada por teste imunoenzimático e de acordo com a análise dos dados observamos que o antagonismo crônico do receptor de GLP-1 está associado ao aumento dos níveis de angiotensina II intra-renal comparado aos SHR tratados com veículo ($14,22 \pm 0,9259$ vs. $10,75 \pm 0,6483$, $P < 0.05$), enquanto que o tratamento com agonista do receptor de GLP-1R está associado a uma redução dos valores de angiotensina II intra-renal comparado ao controle ($6,971 \pm 0,3742$ vs. $10,75 \pm 0,6483$, $P < 0.05$) (Figura 21).

Figura 21. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre os níveis de Angiotensinogênio plasmático e urinário em SHRs. SHR-Ctrl (n=3-5), SHR-Ex-4 (n=3-5) e SHR-Ex-9 (n=3-5). *P<0.05 vs. Ctrl.

4.8 A modulação crônica do GLP-1R altera a expressão do TGF- β em córtex renal de SHRs.

A expressão do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), um parâmetro associado à higidez tecidual, foi avaliado no tecido renal por *imunoblotting*. A partir destas análises verificou-se aumento significativo na expressão de TGF- β no córtex renal de SHR tratados com antagonista do GLP-1R (Ex-9) em relação ao controle, bem como, uma menor expressão deste fator de crescimento nos SHRs tratados com agonista do GLP-1R (Ex-4) em relação aos tratados com veículo (Figura 22).

Figura 22. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre a expressão do TGF- β em homogenato de córtex renal. SHR-Ctrl (n= 6), SHR-Ex-4 (n=8) e SHR-Ex-9 (n=7). *P<0.05, **P<0.01 vs. Ctrl.

4.9 Os efeitos da modulação crônica do GLP-1R sobre o estresse oxidativo intra-renal em SHRs

Para testar a hipótese de que a piora do dano renal observada neste modelo, relacionada ao tratamento bloqueio da sinalização do GLP-1R, estaria associada ao aumento do estresse oxidativo intra-renal, bem como avaliar se a renoproteção observada neste estudo estaria relacionada com a redução deste processo, realizamos a dosagem do malonaldeído, um fator pró-oxidante e da glutathiona reduzida, um fator antioxidante. O bloqueio da sinalização do GLP-1R não altera os níveis de MDA intra-renal ($3,26 \pm 0,644$ vs. $2,94 \pm 0,63 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$) enquanto que o agonismo do GLP-1R está associado a menores níveis de MDA no tecido renal comparado ao controle ($0,84 \pm 0,30$ vs. $2,94 \pm 0,63 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$, $P<0.05$)(Figura 23A).

A partir da análise do GSH observa-se que o tratamento com antagonista de GLP-1R reduz os níveis de GSH intra-renal, enquanto que o tratamento com agonista do receptor de GLP-1 não altera a concentração de GSH em córtex renal em comparação aos SHR tratados com veículo(Figura 23B). No que diz respeito a relação entre o MDA e o GSH podemos observar um aumento significativo nesta relação nos SHR tratados com antagonista do

receptor de GLP-1 comparado aos SHR tratados com veículo ($8,37 \pm 1,59$ vs. $2,74 \pm 0,86$, $P < 0.05$) (Figura 23).

Figura 20. Efeito da modulação crônica do GLP-1R sobre o estresse oxidativo renal de SHRs. A) Análise dos níveis de malonaldeído estimado por Kit TBARS, dosado em homogenato de córtex de rins de SHRs tratados com salina (SHR-CTRL), agonista do GLP-1R (SHR-Ex-4) ou antagonista do receptor GLP-1R (SHR-Ex-9) durante 4 semanas. Dados expressos em média por grupo (ANOVA). SHR-Ctrl (n= 6), SHR-Ex-4 (n=8) e SHR-Ex-9 (n=8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ vs. Ctrl.

4.10 Os efeitos da modulação crônica do GLP-1R sobre a sinalização intra-renal deste receptor

A Figura 24 mostra que o antagonismo crônico do GLP-1R reduz a fosforilação de substratos específicos de PKA no córtex renal comparado ao controle, enquanto que o

agonismo farmacológico do GLP-1R está associado a um aumento da fosforilação destes substratos.

Figura 21. Sinalização intra-renal do receptor do GLP-1 em SHRs tratados durante 4 semanas com agonista do GLP-1R (SHR-ex-4), antagonista do GLP-1R (SHR-ex-9) e veículo (SHR-Ctrl).

5. Discussão

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez, que o antagonismo crônico do receptor de GLP-1R intensifica o aumento da pressão sanguínea neste modelo, sugerindo que o GLP-1 endógeno modula a pressão arterial. Em contraste, nos SHR tratados com o agonista do receptor de GLP-1R observou-se uma atenuação no incremento dos valores pressóricos, sendo estes menores do que o do grupo controle. A literatura sugere que os efeitos do GLP-1 sobre a pressão arterial estão associados à diurese e natriurese (155–157,160,165). Curiosamente, em outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, os ratos normotensos agudamente infundidos com o antagonista de GLP-1R, demonstraram

uma redução significativa da excreção urinária de sódio e de água acompanhadas por um aumento na resistência vascular renal (162). Com base nisso, podemos inferir que existe uma associação entre o GLP-1, a função renal e os níveis de pressão arterial.

Existem vários modelos experimentais para estudar a hipertensão arterial, entretanto nenhum dos modelos disponíveis até o momento representa todos os aspectos clínicos da doença nos humanos. O estudo fisiopatológico da hipertensão arterial se desenvolveu com o advento de modelos experimentais de hipertensão espontânea, entre os quais encontra-se a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos os chamados ,SHRs, linhagem a qual foi utilizada neste estudo. Os ratos SHRs constituem o modelo mais utilizado para o estudo da hipertensão arterial e este modelo não depende de intervenção fisiológica, farmacológica ou cirúrgica. Os ratos SHRs foram desenvolvidos por Okamoto e Aoki em 1950, através de cruzamento entre irmãos de uma população heterogênea de ratos Wistar que apresentavam maiores valores de pressão arterial. Após 20 gerações destes cruzamentos entre irmãos, surgiu então a nova linhagem, o SHR, que desenvolve hipertensão de maneira espontânea entre as 7 e 15 semanas de vida.

O SHR, é o único modelo experimental para o estudo da hipertensão arterial que desenvolve além da própria hipertensão, outras doenças cardiovasculares como, infarto do miocárdio, nefroesclerose e acidente vascular cerebral. Sendo assim a linhagem SHR é um excelente modelo para estudo da hipertensão essencial , hipertensão a qual é definida por ser uma doença não comunicante crônica complexa , que é o maior risco de doenças cardiovasculares e mortalidade determinada por múltiplos fatores genéticos e ambientais (166). As características hemodinâmicas comumente notadas em SHR e humanos com hipertensão essencial estabelecida são aumento da resistência vascular periférica e da frequência cardíaca (167); a predisposição genética para a hipertensão sem etiologia específica e a igual resposta a tratamentos com drogas (168).

A partir de estudos anteriores realizados neste laboratório observamos que a fase pré hipertensiva do SHR situa-se até o 39º dia de vida deste animal, onde este encontra-se em

balanço positivo de sódio. Tendo em vista que o trabalho em questão busca elucidar se a sinalização endógena do GLP-1 pode alterar a progressão da hipertensão arterial em um modelo de hipertensão essencial tal como SHR, o tratamento destes animais teve início justamente na fase inicial da progressão da hipertensão arterial, ou seja, não 39º dia de vida deste animais.

Sabe-se que o rim tem papel crucial na manipulação de sódio e água, e que a hipertensão arterial e o funcionamento renal se associam em uma estreita relação. De acordo com Guyton o rim desempenha um importante papel sobre a regulação da pressão arterial este órgão é o responsável pela gênese da hipertensão essencial devido a um déficit intrínseco sobre a capacidade do rim em excretar sódio e água adequadamente. Segundo esta teoria existe uma relação entre o aumento da pressão arterial e o proporcional aumento da excreção de sal e água pela urina, tal fenômeno é nomeado natriurese pressórica. Na condição de hipertensão arterial essencial o rim necessita de uma pressão arterial mais elevada para a manutenção do volume de líquido do espaço extracelular adequado e portanto a curva da relação pressão natriurese desvia-se para a direita. A elevação adicional da pressão arterial, finalmente atingindo um certo nível reajustado, restabeleceria o equilíbrio de volume e de sódio, mas à custa de uma pressão permanentemente elevada(168).

Ainda tratando-se do importante papel do rim sobre a determinação dos valores de pressão arterial, sabe-se que o túbulo proximal é um segmento renal que possui papel crucial no manuseio de sal e água renal, ademais neste segmento encontra-se o NHE3 que é a isoforma do trocador Na^+/H^+ mais abundante em membrana apical, sendo responsável pela reabsorção de grande parte do NaCl e NaHCO_3 filtrados nos glomérulos (169–171). Esta isoforma de trocador tem, portanto, papel essencial na homeostase de volume, na homeostase ácido-base e na determinação dos níveis de pressão arterial sistêmica. Camundongos nocaute para este transportador apresentam fenótipo hipotenso e acidótico o que reforça a importância do NHE3 para a manutenção da pressão arterial (172).

No presente estudo, encontramos uma associação entre o agonismo farmacológico do GLP-1 e a inibição da atividade do NHE3 no túbulo proximal renal, e que de forma oposta, o antagonismo crônico do GLP-1 está associado a uma maior atividade do NHE3 no TP. Estes resultados suportam ainda a ideia de que os agentes terapêuticos baseados no GLP-1 também possuem uma potencial utilidade clínica no tratamento da hipertensão e outros distúrbios relacionados à retenção de sódio. Um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a infusão sistêmica de concentrações farmacológicas de GLP-1 em ratos Wistar, aumenta a FPR e o ritmo de filtração glomerular e reduz à reabsorção tubular proximal de água, sódio e bicarbonato, estes efeitos estão parcialmente relacionados, à inibição do NHE3 (85). Além disso, outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa demonstra que em ratos normotensos, infundidos agudamente com antagonista do GLP-1R existe um aumento da atividade de trocador de NHE3.

A literatura sugere que os efeitos do GLP-1 sobre a pressão arterial estão associados à diurese e natriurese (155–157,160). Curiosamente, em outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, os ratos normotensos agudamente infundidos com o antagonista de GLP-1R, demonstraram uma redução significativa da excreção urinária de sódio e de água acompanhadas por um aumento na resistência vascular renal (173). Com base nisso, podemos inferir que existe uma associação entre o GLP-1, a função renal e os níveis de pressão arterial.

Um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a infusão sistêmica de GLP-1 em ratos SHR, aumenta a FPR e o ritmo de filtração glomerular e reduz à reabsorção tubular proximal de água, sódio e bicarbonato, estes efeitos estão parcialmente relacionados, a inibição do NHE3(85,154). Além disso, outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa demonstra que em ratos normotensos, infundidos agudamente com antagonista do GLP-1R existe um aumento da atividade de trocador de NHE3 e da RVR, o que leva a redução do FPR e do RFG. No presente estudo, encontramos uma associação entre o agonismo farmacológico do GLP-1 e a inibição da atividade do NHE3 no túbulo

proximal renal, e que de forma oposta, o antagonismo crônico do GLP-1 está associado a uma maior atividade do NHE3 no TP, estes dados corroboram com os achados anteriores de nosso grupo de pesquisa. Além disso, estudos realizados por laboratórios de McDonough e Yip (174–176) sugerem que a redistribuição do NHE3 no túbulo proximal renal está associada à diminuição da reabsorção de sódio no PT. Desta forma, sugere-se que o NHE3 ao invés de contribuir para o desenvolvimento e manutenção de hipertensão, desempenha um papel protetor ao se contrabalancear aos níveis de pressão arterial em ascensão no SHR adulto (177). Estes resultados suportam ainda a ideia de que os agentes terapêuticos baseados no GLP-1 também possuem uma potencial utilidade clínica no tratamento da hipertensão e outros distúrbios relacionados à retenção de sódio.

Os efeitos diuréticos e natriuréticos do GLP-1 também estão associados a alterações hemodinâmicas renais (85). O fato de que este peptídeo aumenta, quando administrado agudamente, tanto o ritmo de filtração glomerular quanto o FPR, sugere que o GLP-1 pode exercer um efeito direto na vasculatura renal, provavelmente por diminuição da resistência dos capilares pré-glomerulares. As ações vasoativas do GLP-1 têm sido demonstradas em vários leitos vasculares incluindo vasos de condutância e de resistência. Os efeitos vasodilatadores induzidos por esse peptídeo parecem ocorrer tanto por mecanismos dependentes de endotélio (116,127) quanto por mecanismos não dependentes de endotélio (130,178). Além disso, estudos do nosso laboratório ainda em andamento mostraram que o GLP-1 induz um efeito vasodilatador dose dependente em anéis isolados de artéria renal de ratos, este efeito parece ser mediado, ao menos em parte, pela estimulação de AMPc (manuscrito submetido). Nestes estudos, observou-se que o tratamento com antagonista de GLP-1R aumentou a RVR, e de forma oposta que o agonismo do GLP-1R neste modelo resultou na diminuição da RVR em comparação ao CTRL. No presente estudo, o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração glomerular não foram alterados com o tratamento crônico, entretanto, o bloqueio da sinalização crônica do GLP-1R está associado a um aumento da RVR enquanto que o agonismo deste receptor relaciona-se a uma redução da RVR neste modelo.

A literatura sugere que o GLP-1 desempenha ações renoprotetoras (137,138). Dentre estas as ações protetoras renais associadas ao agonismo do GLP-1R e independentes de alterações glicêmicas, destacam-se: redução de albuminúria, menor fibrose tubular, glomerular e intersticial, redução da hipertrofia glomerular e menor infiltração de macrófagos nos glomérulos (137), além disso, possui propriedades anti-inflamatórias, exerce efeito antioxidante (151). Neste estudo foi demonstrado que o tratamento com exendin-4, agonista do GLP-1R reduziu o número de célula CD68-positivas nos glomérulos, além de reduzir o dano glomerular, estes achados corroboram com os dados da literatura.

É estabelecida por muitos estudos uma associação entre o aumento da pressão arterial e a lesão renal (179–181). Em um estudo com ratos Dahl sensíveis ao sal, o tratamento com exendin-4 atenuou a hipertensão, a morbidade cardíaca, a resistência à insulina, e a disfunção renal induzida por sal (155). Os mecanismos fisiopatológicos desta associação não estão completamente elucidados, no entanto, está bem estabelecido que a identificação e quantificação de proteinúria, particularmente da albumina, é um indicador importante para o prognóstico da doença renal e cardiovascular (130,182,183). Neste estudo, foi observado que após 4 semanas de tratamento com o antagonista do receptor de GLP-1 (Ex-9) existe um aumento da excreção urinária de proteína e de albumina em SHR, e que de maneira oposta, o agonismo do receptor (Ex-4), reduz significativamente a excreção urinária de proteínas.

Além da importância clínica da proteinúria, postula-se uma associação entre a lesão renal e a fibrose tecidual (183). Tal como esperado, houve um aumento significativo de α -SMA e colágeno intersticial nos SHR tratados com antagonista de GLP-1R (EX-9) em relação ao CTRL, e de maneira oposta, em SHR tratados com o agonista de GLP-1R (ex-4) houve uma tendência à menor expressão de marcadores fibróticos em relação ao Ctrl. Este dado corrobora com os achados anteriores (137,138,146,184) e indica que o agonismo GLP-1R desempenha um papel anti-fibrótico no córtex renal de SHR.

Recentemente, tem sido considerado o papel da inflamação subclínica na progressão de doenças degenerativas crônicas (137). Os dados mostrados nesta tese indicam que o antagonista do receptor de GLP-1 aumenta a infiltração de macrófagos nos rins de ratos hipertensos, enquanto o agonista deste receptor ,tende a reduzir a infiltração destas células inflamatórias no rim em comparação aos ratos controle.

Estudos realizados por Russo e por Gekle demonstraram que existe uma relação entre a microalbuminúria e a expressão do fator transformador de crescimento beta. Estes estudos sugerem uma associação entre o aumento pressórico coma a redução proteica de componentes do aparelho endocítico em túbulo proximal renal por meio do aumento da expressão do TGF- β . Ademais se sabe que a angiotensina II estimula a ação do TGF- β e este por sua vez ativa o SRA em túbulo proximal renal (185,186).

Sabe-se que os componentes do SRAA estão intimamente associados à inflamação, danos nos tecidos e alterações da pressão arterial(187,188). Sabe-se também que a ativação do SRA intra-renal pode contribuir para a hipertensão e a lesão renal em vários modelos experimentais e em pacientes com hipertensão e doença renal crônica. Trabalhos desenvolvidos pelo laboratório do Prof. Gabriel Navar e reproduzidos por outros grupos de pesquisa, estipularam como marcador da atividade do SRA intrarenal a dosagem do angiotensinogênio (AGT) urinário (189). Os nossos dados mostram que os níveis de AGT urinário nos SHR tratados com EX-9 encontra-se aumentado em comparação aos ratos CTRL, enquanto os SHRs tratados com EX-4 apresentam uma redução significativa da excreção de AGT. De maneira similar, a concentração de Ang II em córtex renal encontra-se aumentada em SHR tratados com EX-9 e reduzida em SHR tratados com EX-4, sugerindo que a ativação do receptor de GLP-1R renal é capaz de reduzir a atividade do SRA intra-renal.

Recentemente foi demonstrado in vitro que agonismo do GLP-1R reduz o dano celular mediado por Ang II em células justa medular através da prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (190). Seguindo esta linha de raciocínio, resolvemos avaliar

o estresse oxidativo neste modelo. Segundo a comparação entre os dados obtidos e o grupo controle, o bloqueio da sinalização do GLP-1R intrarenal está associado a maiores níveis da relação MDA/GSH enquanto que o agonismo do GLP-1R parece estar associado a menores níveis de MDA/GSH no tecido renal. Estes dados sugerem que o antagonismo do GLP-1R está associado a maiores níveis de estresse oxidativo comparado ao controle, enquanto que o agonismo farmacológico do GLP-1R reduz este fenômeno neste modelo. Este efeito corrobora achados na literatura que demonstram que o GLP-1 exerce renoproteção associada à indução de diurese e natriurese, redução da excreção de proteínas urinária, propriedades anti-inflamatórias e redução das espécies reativas de oxigênio e apoptose. Nosso trabalho é o primeiro estudo que demonstra este contrabalanço entre a atividade do SRA e a sinalização do GLP-1R *in vivo*.

Diversos estudos tentam desvendar se os efeitos anti-hipertensivos e renoprotetores mediados pelo agonismo do GLP-1R estão associados aos benefícios metabólicos desempenhados por ele. Tratando-se disto vale a pena ressaltar que o tratamento com troglitazona, uma droga usada para o tratamento do diabetes, reduziu os níveis de pressão arterial em ratos do tipo Zucker obesos (191), mas não foi capaz de reduzir os valores pressóricos em ratos SHR (192). Além disso, diversos estudos tem demonstrado o potencial renoprotetor do GLP-1 em modelos não diabéticos, através da redução da apoptose, inflamação e aumento de fatores antioxidantes (147,193,194).

Os resultados obtidos com este estudo demonstraram que o agonismo farmacológico do GLP-1R associa-se a menores níveis de insulinemia do que os animais controle e que de maneira oposta o bloqueio da sinalização endógena do GLP-1R relaciona-se a maiores valores de insulina de jejum do que os animais tratados com veículo. Desta forma conclui-se que parte dos benefícios renoprotetores observados neste modelo dependem do benefício metabólico exercido pela sinalização do GLP-1R.

O GLP-1 foi inicialmente descrito por exercer ações sobre a secreção e melhora da sensibilidade à insulina. Existe uma forte correlação entre altos níveis de pressão arterial e

resistência à insulina em humano (195,196). A hiperinsulinemia pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão, promover disfunção endotelial e estimular a reabsorção tubular de sódio. De maneira oposta, a melhora da sensibilidade à insulina está associada à proteção cardíaca, a normalização da função endotelial e redução da pressão arterial média (197). Dentre os mecanismos associados a estes efeitos, a hiperinsulinemia associa-se a piora renal e inibe a atividade do NHE3, um importante trocador presente no túbulo proximal renal que influencia os níveis de pressão arterial, interessante apesar de o GLP-1 ser um peptídeo que estimula a secreção de insulina, neste modelo o agonismo farmacológico do GLP-1R associa-se a menor atividade do NHE3, enquanto que o antagonismo deste receptor relaciona-se a maior atividade deste.

Pacientes hipertensos apresentam frequentemente intolerância à glicose e/ou hiperinsulinemia de jejum e de forma parecida ratos espontaneamente hipertensos na idade adulta, os quais também apresentam hiperinsulinemia embora sejam normoglicêmicos. Esse fato se deve a um prejuízo na sensibilidade à glicose pela célula beta pancreática e menor expressão de GLUT4 no músculo esquelético (198). Estudos demonstraram que o tratamento com inibidor da DPP4 e com agonista do receptor de GLP-1R, esta associado a maior expressão de GLUT4 no músculo cardíaco e esquelético e a melhora a sensibilidade a glicose pela célula beta pancreática o que sugere que o agonismo do GLP-1R esteja associado à melhora a sensibilidade a glicose (199,200). No presente trabalho, mostramos que SHR tratados com exendin-9 apresentam maiores valores de insulina plasmática do que os SHR controle e de maneira oposta, o agonismo do GLP-1R reduziu os níveis plasmáticos de insulina de jejum. Além disso, SHR tratados com exendin-9 tem índice HOMA1-IR maior do que o controle.

Desta forma sugere-se que o agonismo do GLP-1R exerce menor efeito sobre a secreção de insulina e bem como a ativação do NHE3 e que de maneira posta o antagonismo deste receptor relaciona-se a maior secreção de insulina para a manutenção da normoglicemia e bem como estimule a maior atividade do NHE3. É sabido que existe uma

correlação entre a diabetes mellitus tipo 2 a hipertensão arterial e que tanto a obesidade quanto a diabetes mellitus tipo 2 associam-se a expansão de volêmica devido ao aumento da reabsorção de sódio no túbulo renal (201). Segundo esta linha de raciocínio pode-se pensar que a menor secreção de GLP-1 em indivíduos diabéticos e obesos pode ao menos em parte relacionar-se a maior reabsorção de sódio no túbulo renal e que este efeito resulte em uma expansão da volemia sendo um e potencial risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial. Neste cenário, o GLP-1, protegeria o organismo do excesso de sódio ingerido na dieta através da natriurese por ele desempenhada. Estudos seguindo estas hipóteses precisam ser realizados para verificar se o GLP-1 pode estar envolvido no link entre alteração glicêmica e insulinêmica e aumento da pressão arterial sistêmica.

O GLP-1R é um receptor acoplado à proteína Gs, e, quando ativado por seu ligante, ativa a adenil ciclase, levando a um aumento dos níveis de cAMP intracelular e aumenta a atividade da PKA e da EPAC. Entretanto a EPAC, parece ser órgão dependente e um trabalho anterior publicado pelo nosso grupo de pesquisa utilizou a infusão aguda sistêmica de exendin-9 um bloqueador da sinalização endógena do GLP-1R demonstrou que não houve alteração na expressão de EPAC1 no rim dos animais tratados, sugerindo que a via GLP-1R/AMPC/ EPAC não está envolvida nos efeitos renais do GLP-1 endógeno. Ademais, este mesmo estudo demonstrou que a sinalização do GLP-1R no rim ao administrarmos exendin-9 por via sistêmica, reduz os níveis de cAMP urinário e a atividade da PKA comparados aos que receberam veículo (173).

Tendo em vista elucidar se os efeitos renais mediados pelo GLP-1 são ao menos em parte independentes dos efeitos pressóricos mediados por este peptídeo em SHR avaliamos a sinalização intra-renal do GLP-1R através da análise da atividade da PKA em tecidos de córtex renal. Com base nestas análises, observou-se que o antagonismo crônico do GLP-1R associa-se à menor fosforilação de substratos de PKA no córtex renal comparado ao controle, enquanto que o agonismo farmacológico do GLP-1R está associado a um aumento da ativação desta quinase. Este dado sugere que os efeitos sobre a função e

estrutura renais observados neste estudo podem ser mediados, ao menos em parte, pela modulação (agonismo ou antagonismo) do GLP-1R renal e não apenas pelas alterações pressóricas mediadas pelo EX-4 ou EX-9.

6. Conclusão

Esta investigação demonstra, pela primeira vez, que o bloqueio do GLP-1R, por meio da administração sistêmica de exendin-9, intensifica o aumento da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos e exacerba o dano renal. Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar se esta exacerbação do dano renal é um efeito direto do bloqueio do GLP-1 no rim, ou se estes efeitos são secundários ao aumento da pressão arterial. Além disso, neste estudo foi demonstrado pela primeira vez, que a sinalização intrarenal do GLP-1R se contrapõe a atividade do SRA intrarenal.

7. Referências Bibliográficas

1. Kazafeos K, Elrick H, Stimmler L, Hlad C, Arai Y, Dupre J, et al. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2011 Aug [cited 2016 Jun 27];93 Suppl 1:S32–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864749>
2. Baumgard LH, Hausman GJ, Sanz Fernandez M V. Insulin: Pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2016;54:76–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.07.001>
3. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 1986 Jan [cited 2016 Jun 28];29(1):46–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3514343>
4. Wang X-L, Ye F, Li J, Zhu L-Y, Feng G, Chang X-Y, et al. Impaired secretion of glucagon-like peptide 1 during oral glucose tolerance test in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Saudi Med J* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 Jun 27];37(1):48–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739974>
5. Fukase N, Manaka H, Sugiyama K, Takahashi H, Igarashi M, Daimon M, et al. Response of truncated glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide to glucose ingestion in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol* [Internet]. 1995 [cited 2016 Jun 27];32(3):165–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00838486>
6. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1986 Aug [cited 2016 Jun 28];63(2):492–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522621>
7. Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, et al. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* [Internet]. 2008 May [cited 2016 Jun 28];57(5):1340–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162504>
8. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Additive

insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1993 Apr [cited 2016 Jun 28];76(4):912–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8473405>

9. Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* [Internet]. 2002 Aug [cited 2016 Jun 28];45(8):1111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12189441>

10. Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrière B, Gluud LL, Vilsbøll T, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia* [Internet]. 2013 May [cited 2016 Jun 28];56(5):965–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377698>

11. Kjems LL, Holst JJ, Vølund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* [Internet]. 2003 Feb [cited 2016 Jun 28];52(2):380–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540611>

12. Habib AM, Richards P, Cairns LS, Rogers GJ, Bannon CAM, Parker HE, et al. Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology* [Internet]. 2012 Jul [cited 2016 Jun 28];153(7):3054–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685263>

13. Baggio LL, Drucker DJ, Bayliss WM, Starling EH, Moore B, Edie ES, et al. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 May [cited 2016 Jun 28];132(6):2131–57. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850700580X>

14. Sandoval DA, D'Alessio DA, Abbott C, Monteiro M, Small C, Sajedi A, et al. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2015 Apr [cited 2016 Jun 28];95(2):513–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834231>

15. Little TJ, Doran S, Meyer JH, Smout AJPM, O'Donovan DG, Wu K-L, et al. The release of GLP-1 and ghrelin, but not GIP and CCK, by glucose is dependent upon the

length of small intestine exposed. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2006 Sep [cited 2016 Jun 28];291(3):E647–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684852>

16. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* [Internet]. 1995 [cited 2016 Jun 28];56(2):117–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750665>

17. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* [Internet]. 2007 Oct [cited 2016 Jun 28];87(4):1409–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928588>

18. Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* [Internet]. 1999 Apr [cited 2016 Jun 28];140(4):1687–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098504>

19. Balks HJ, Holst JJ, von zur Mühlen A, Brabant G. Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1997 Mar [cited 2016 Jun 28];82(3):786–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062483>

20. Anini Y, Hansotia T, Brubaker PL. Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* [Internet]. 2002 Jun [cited 2016 Jun 28];143(6):2420–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021207>

21. Anini Y, Brubaker PL. Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology* [Internet]. 2003 Jul [cited 2016 Jun 28];144(7):3244–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810581>

22. Spreckley E, Murphy KG. The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front Nutr* [Internet]. 2015 [cited 2016 Jun 28];2:23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26258126>

23. Ahlkvist L, Vikman J, Pacini G, Ahrén B. Synergism by individual macronutrients explains the marked early GLP-1 and islet hormone responses to mixed

meal challenge in mice. *Regul Pept.* 2012;178(1):29–35.

24. Wu T, Rayner CK, Jones K, Horowitz M. Chapter Three – Dietary Effects on Incretin Hormone Secretion. In: *Vitamins & Hormones*. 2010. p. 81–110.

25. Sugiyama K, Manaka H, Kato T, Yamatani K, Tominaga M, Sasaki H. Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption. *Digestion* [Internet]. 1994 [cited 2016 Jun 28];55(1):24–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112493>

26. Ritzel U, Fromme A, Oettleben M, Leonhardt U, Ramadori G. Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetol* [Internet]. 1997 Mar [cited 2016 Jun 28];34(1):18–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134052>

27. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* [Internet]. 2003 May [cited 2016 Jun 28];52(5):1147–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716745>

28. Pais R, Gribble FM, Reimann F. Stimulation of incretin secreting cells. *Ther Adv Endocrinol Metab* [Internet]. 2016 Feb [cited 2016 Jun 28];7(1):24–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885360>

29. Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, et al. Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Jun 28];61(1):187–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124465>

30. Parker HE, Adriaenssens A, Rogers G, Richards P, Koepsell H, Reimann F, et al. Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetologia* [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Jun 28];55(9):2445–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22638549>

31. Stephens JW, Bodvarsdottir TB, Wareham K, Prior SL, Bracken RM, Lowe GD, et al. Effects of short-term therapy with glibenclamide and repaglinide on incretin hormones and oxidative damage associated with postprandial hyperglycaemia in people with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2011 Nov [cited 2016 Jun

28];94(2):199–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835486>

32. Kuhre RE, Bechmann LE, Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Holst JJ. Glucose stimulates neurotensin secretion from the rat small intestine by mechanisms involving SGLT1 and GLUT2, leading to cell depolarization and calcium influx. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2016 Jun 28];308(12):E1123–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25898949>

33. Röder P V, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2016 Jun 28];9(2):e89977. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587162>

34. Diakogiannaki E, Pais R, Tolhurst G, Parker HE, Horscroft J, Rauscher B, et al. Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. *Diabetologia* [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Jun 28];56(12):2688–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24045836>

35. Pais R, Gribble FM, Reimann F. Signalling pathways involved in the detection of peptones by murine small intestinal enteroendocrine L-cells. *Peptides* [Internet]. 2016 Mar [cited 2016 Jun 28];77:9–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215048>

36. Liou AP, Sei Y, Zhao X, Feng J, Lu X, Thomas C, et al. The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Jun 28];300(4):G538–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252045>

37. Mace OJ, Schindler M, Patel S. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *J Physiol* [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2016 Jun 28];590(12):2917–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22495587>

38. Reimer RA. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by

extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Endocrinol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2016 Jun 28];191(1):159–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065399>

39. Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, et al. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Jun 28];89(1):106–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056578>

40. Samocha-Bonet D, Wong O, Synnott E-L, Piyaratna N, Douglas A, Gribble FM, et al. Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients. *J Nutr* [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 Jun 28];141(7):1233–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593352>

41. Gameiro A, Reimann F, Habib AM, O'Malley D, Williams L, Simpson AK, et al. The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. *J Physiol* [Internet]. 2005 Dec 15 [cited 2016 Jun 28];569(Pt 3):761–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223757>

42. Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F, Tsuboi T. The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2016 Jun 28];288(7):4513–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269670>

43. Feltrin KL, Little TJ, Meyer JH, Horowitz M, Smout AJPM, Wishart J, et al. Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2016 Jun 28];287(3):R524–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166004>

44. Little TJ, Feltrin KL, Horowitz M, Smout AJPM, Rades T, Meyer JH, et al. Dose-related effects of lauric acid on antropyloroduodenal motility, gastrointestinal hormone release, appetite, and energy intake in healthy men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2016 Jun 28];289(4):R1090–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961531>

45. Feinle C, O'Donovan D, Doran S, Andrews JM, Wishart J, Chapman I, et al. Effects of fat digestion on appetite, APD motility, and gut hormones in response to duodenal fat infusion in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2003 May [cited 2016 Jun 28];284(5):G798–807. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684211>
46. Ellrichmann M, Kapelle M, Ritter PR, Holst JJ, Herzig K-H, Schmidt WE, et al. Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Jun 28];93(10):3995–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18647814>
47. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Mar 28 [cited 2016 Jun 28];278(13):11303–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496284>
48. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, Whiteside CI, Brubaker PL. Protein kinase Czeta is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 Jun 28];148(3):1089–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110421>
49. Okawa M, Fujii K, Ohbuchi K, Okumoto M, Aragane K, Sato H, et al. Role of MGAT2 and DGAT1 in the release of gut peptides after triglyceride ingestion. Vol. 390, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009.
50. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Jun 28];61(2):364–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22190648>
51. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 May 28 [cited 2016 Jun 28];110(22):9066–71. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1219451110>

52. Chimere C, Emery E, Summers DK, Keyser U, Gribble FM, Reimann F. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Nov 20 [cited 2016 Jun 28];9(4):1202–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25456122>
53. Ullmer C, Alvarez Sanchez R, Sprecher U, Raab S, Mattei P, Dehmlow H, et al. Systemic bile acid sensing by G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1) promotes PYY and GLP-1 release. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2016 Jun 28];169(3):671–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488746>
54. Harach T, Pols TWH, Nomura M, Maida A, Watanabe M, Auwerx J, et al. TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* [Internet]. 2012 [cited 2016 Jun 28];2:430. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666533>
55. DA SILVA LM. MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO de *Arctium lappa* L. EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS [Internet]. 2010 [cited 2016 Jun 28]. Available from: [http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/25835/Disseratacao Luisa Mota da Silva.pdf](http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/25835/Disseratacao_Luisa_Mota_da_Silva.pdf)
56. Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*. 2004;25(3):511–20.
57. Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [Internet]. 2006 Apr [cited 2016 Jun 28];5(2):197–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611092>
58. Plaisancie P, Bernard C, Chayvialle JA, Cuber JC. Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide secretion by intestinal neurotransmitters and hormones in the isolated vascularly perfused rat colon. *Endocrinology* [Internet]. 1994 Dec [cited 2016 Jun 28];135(6):2398–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7988423>
59. Dumoulin V, Dakka T, Plaisancie P, Chayvialle JA, Cuber JC. Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by

neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* [Internet]. 1995 Nov [cited 2016 Jun 28];136(11):5182–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7588257>

60. Glassmeier G, Höpfner M, Buhr H, Lemmer K, Riecken EO, Stein H, et al. Expression of functional GABAA receptors in isolated human insulinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1998 Nov 17 [cited 2016 Jun 28];859:241–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9928397>

61. Adriaenssens A, Yee B, Lam H, Billing L, Skeffington K, Sewing S, et al. A Transcriptome-Led Exploration of Molecular Mechanisms Regulating Somatostatin-Producing D-Cells in the Gastric Epithelium.

62. Moss CE, Marsh WJ, Parker HE, Ogunnowo-Bada E, Riches CH, Habib AM, et al. Somatostatin receptor 5 and cannabinoid receptor 1 activation inhibit secretion of glucose-dependent insulintropic polypeptide from intestinal K cells in rodents. *Diabetologia* [Internet]. 2012 Nov [cited 2016 Jun 28];55(11):3094–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22872212>

63. Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulintropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* [Internet]. 1993 Jul [cited 2016 Jun 28];133(1):233–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8319572>

64. Damholt AB, Buchan AM, Kofod H. Glucagon-like-peptide-1 secretion from canine L-cells is increased by glucose-dependent-insulintropic peptide but unaffected by glucose. *Endocrinology* [Internet]. 1998 Apr [cited 2016 Jun 28];139(4):2085–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528997>

65. Gagnon J, Sauvé M, Zhao W, Stacey HM, Wiber SC, Bolz S-S, et al. Chronic Exposure to TNF α Impairs Secretion of Glucagon-Like Peptide-1. *Endocrinology* [Internet]. 2015 Nov [cited 2016 Jun 28];156(11):3950–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26270730>

66. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, et al. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* [Internet]. 2011 [cited 2016 Jun

28];17(11):1481–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037645>

67. Martins C, Morgan LM, Bloom SR, Robertson MD. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. *J Endocrinol* [Internet]. 2007 May [cited 2016 Jun 28];193(2):251–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470516>

68. Ramesh N, Mortazavi S, Unniappan S. Nesfatin-1 stimulates glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion from STC-1 cells in vitro. Vol. 462, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015.

69. Petersen N, Reimann F, van Es JH, van den Berg BM, Kroone C, Pais R, et al. Targeting development of incretin-producing cells increases insulin secretion. *J Clin Invest* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Jun 28];125(1):379–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500886>

70. Gil-Lozano M, Mingomataj EL, Wu WK, Ridout SA, Brubaker PL. Circadian secretion of the intestinal hormone GLP-1 by the rodent L cell. *Diabetes* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Jun 28];63(11):3674–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789917>

71. Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr Rev*. 2014;35(6):992–1019.

72. Lambeir A-M, Durinx C, Scharpé 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* [Internet]. 2003 Jun [cited 2016 Jun 28];40(3):209–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892317>

73. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* [Internet]. 1993 Jul 23 [cited 2016 Jun 28];261(5120):466–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101391>

74. López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007 Oct [cited 2016 Jun 28];7(10):800–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2228>

75. Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D.

Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int J Mol Med* [Internet]. 1999 Jul [cited 2016 Jun 28];4(1):3–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10373631>

76. Davidson JA. The placement of DPP-4 inhibitors in clinical practice recommendations for the treatment of type 2 diabetes. *Endocr Pract* [Internet]. [cited 2016 Jun 28];19(6):1050–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126227>

77. Hopsu-Havu VK, Mäkinen KK, Glenner GG. Formation of bradykinin from kallidin-10 by aminopeptidase B. *Nature* [Internet]. 1966 Dec 10 [cited 2016 Jun 28];212(5067):1271–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21090475>

78. Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept*. 2005;128(2):117–24.

79. Velasquez-Mieyer PA, Cowan PA, Umpierrez GE, Lustig RH, Cashion AK, Burghen GA. Racial differences in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentrations and insulin dynamics during oral glucose tolerance test in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. 2003 Nov [cited 2016 Jun 28];27(11):1359–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574347>

80. Baggio LL, Drucker DJ, Drucker DJ, Brubaker PL, Drucker DJ, Estall JL, et al. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Dec [cited 2016 Jun 28];18(4):531–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X04000521>

81. Hupe-Sodmann K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Göke R, Göke B, Thole H, et al. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7–36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul Pept*. 1995;58(3):149–56.

82. Zhou B, Ji K, Peng A, Yang X, Huang K. GLP-1(28-36)amide, a Long Ignored Peptide Revisited. *Open Biochem J* [Internet]. 2014 [cited 2016 Jun 28];8:107–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598850>

83. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther*. 2007;113(3):546–93.

84. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Aug [cited 2016 Jun 28];287(2):E199–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271645>
85. Crajoinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BPM, Lessa LMA, Malnic G, et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2016 Jun 28];301(2):F355–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593184>
86. Kedees MH, Guz Y, Grigoryan M, Teitelman G. Functional activity of murine intestinal mucosal cells is regulated by the glucagon-like peptide-1 receptor. *Peptides*. 2013;48:36–44.
87. Yusta B, Baggio LL, Koehler J, Holland D, Cao X, Pinnell LJ, et al. GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R. *Diabetes* [Internet]. 2015 Jul [cited 2016 Jun 28];64(7):2537–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25735732>
88. List JF, He H, Habener JF. Glucagon-like peptide-1 receptor and proglucagon expression in mouse skin. *Regul Pept*. 2006;134(2):149–57.
89. Tornehave D, Kristensen P, Rømer J, Knudsen LB, Heller RS. Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2008 Sep [cited 2016 Jun 28];56(9):841–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541709>
90. Hadjiyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. *Diabetologia* [Internet]. 2010 Apr [cited 2016 Jun 28];53(4):730–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225396>
91. Harasta AE, Power JM, von Jonquieres G, Karl T, Drucker DJ, Housley GD, et al. Septal Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Expression Determines Suppression of Cocaine-Induced Behavior. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2015 Jul [cited 2016 Jun 28];40(8):1969–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25669605>
92. Axtell AE, Kelley JL, Fader AN, Gupta D, Schwartz B, Comerci JT, et al.

Percent surface area involvement is a predictor of lymph node metastasis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2016 Jun 28];107(3):482–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850853>

93. Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kastrup P, et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology* [Internet]. 2014 Apr [cited 2016 Jun 28];155(4):1280–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467746>

94. Waser B, Blank A, Karamitopoulou E, Perren A, Reubi JC. Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas. *Mod Pathol* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Jun 28];28(3):391–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25216224>

95. Hattori A, Kawamura I, Yamada Y, Kanamori H, Aoyama T, Ushikoshi H, et al. Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors as markers of left ventricular systolic dysfunction: a cross-sectional study. *BMJ Open* [Internet]. 2013 [cited 2016 Jun 28];3(9):e003201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002982>

96. Drucker DJ, Philippe J, Jepeal L, Habener JF. Glucagon gene 5'-flanking sequences promote islet cell-specific gene transcription. *J Biol Chem* [Internet]. 1987 Nov 15 [cited 2016 Jun 28];262(32):15659–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316202>

97. Fehmann HC, Janssen M, Göke B. Interaction of glucagon-like peptide-I (GLP-I) and galanin in insulin (beta TC-1)- and somatostatin (RIN T3)-secreting cells and evidence that both peptides have no receptors on glucagon (INR1G9)-secreting cells. *Acta Diabetol* [Internet]. 1995 Oct [cited 2016 Jun 28];32(3):176–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8590787>

98. Holz GG. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* [Internet]. 2004 Jan [cited 2016 Jun 28];53(1):5–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693691>

99. Drucker DJ. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-

derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* [Internet]. 2005 Nov [cited 2016 Jun 28];1(1):22–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16929363>

100. López Simarro F. Fármacos incretín miméticos: posicionamiento terapéutico. *Semer - Med Fam* [Internet]. 2014 Jul [cited 2016 Aug 6];40:25–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1138359314743874>

101. Nauck M, Rizzo M, Johnson A, Bosch-Traberg H, Madsen J, Cariou B. Once-Daily Liraglutide Versus Lixisenatide as Add-on to Metformin in Type 2 Diabetes: A 26-Week Randomized Controlled Clinical Trial. *Diabetes Care* [Internet]. 2016 Jun 16 [cited 2016 Jun 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311491>

102. Willian T, Cefalu MD. *Stop Diabetes now: A groundbreaking Program for Controlling Your Disease and Staying Healthy*. New York: Penguin; 2008. 272 p.

103. Waugh N, Cummins E, Royle P, Clar C, Marien M, Richter B, et al. Newer Agents for Blood Glucose Control in Type 2 Diabetes (Supplement) [Internet]. Newer Agents for Blood Glucose Control in Type 2 Diabetes (Supplement). National Institute for Health and Clinical Excellence (UK); 2009 [cited 2016 Aug 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220324>

104. Bjerre Knudsen L, Madsen LW, Andersen S, Almholzt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. Glucagon-like Peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. *Endocrinology* [Internet]. 2010 Apr [cited 2016 Jun 28];151(4):1473–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203154>

105. Campbell JE, Drucker DJ, Abbas T, Faivre E, Hölscher C, Ahern T, et al. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* [Internet]. 2013 Jun 4 [cited 2016 Jun 28];17(6):819–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684623>

106. Dzhura I, Chepurny OG, Leech CA, Roe MW, Dzhura E, Xu X, et al. Phospholipase C- ϵ links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans. *Islets* [Internet]. [cited 2016 Aug 6];3(3):121–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478675>

107. Kang G, Holz GG. Amplification of exocytosis by Ca^{2+} -induced Ca^{2+}

release in INS-1 pancreatic beta cells. *J Physiol* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2016 Aug 6];546(Pt 1):175–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509487>

108. Tsuboi T, da Silva Xavier G, Holz GG, Jouaville LS, Thomas AP, Rutter GA. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca²⁺ and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem J* [Internet]. 2003 Jan 15 [cited 2016 Aug 6];369(Pt 2):287–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410638>

109. Quoyer J, Longuet C, Broca C, Linck N, Costes S, Varin E, et al. GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2016 Aug 6];285(3):1989–2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915011>

110. Portha B, Tourrel-Cuzin C, Movassat J. Activation of the GLP-1 receptor signalling pathway: a relevant strategy to repair a deficient beta-cell mass. *Exp Diabetes Res* [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 6];2011:376509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716694>

111. Sonoda N, Imamura T, Yoshizaki T, Babendure JL, Lu J-C, Olefsky JM. Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 May 6 [cited 2016 Jun 28];105(18):6614–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445652>

112. Schirra J, Göke B. The physiological role of GLP-1 in human: incretin, ileal brake or more? *Regul Pept*. 2005;128(2):109–15.

113. Knudsen LB, Secher A, Hecksher-Sørensen J, Pyke C. Long-acting glucagon-like peptide-1 receptor agonists have direct access to and effects on pro-opiomelanocortin/cocaine- and amphetamine-stimulated transcript neurons in the mouse hypothalamus. *J Diabetes Investig* [Internet]. 2016 Apr [cited 2016 Jun 28];7 Suppl 1(Suppl Suppl 1):56–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186357>

114. Katsurada K, Yada T. Neural effects of gut- and brain-derived glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist. *J Diabetes Investig* [Internet]. 2016 Apr [cited 2016 Jun 28];7 Suppl 1(Suppl Suppl 1):64–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186358>

115. Eguchi Y, Kitajima Y, Hyogo H, Takahashi H, Kojima M, Ono M, et al. Pilot study of liraglutide effects in non-alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic fatty liver disease with glucose intolerance in Japanese patients (LEAN-J). *Hepatol Res* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Jun 28];45(3):269–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796231>
116. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz S-S, 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* [Internet]. 2008 May 6 [cited 2016 Jun 28];117(18):2340–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18427132>
117. 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* [Internet]. 2010 [cited 2016 Jun 28];9:76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080957>
118. 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* [Internet]. 2008 Sep [cited 2016 Jun 28];1(3):153–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19727407>
119. Ravassa S, Zudaire A, Carr RD, Díez J. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Jun 28];300(4):H1361–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278133>
120. Timmers L, Henriques JPS, de Kleijn DPV, 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.
121. Gros R, You X, Baggio LL, Kabir MG, Sadi AM, Mungrue IN, et al. Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* [Internet]. 2003 Jun [cited 2016 Jun 28];144(6):2242–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12746281>

122. Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP, Association AH, et al. Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Jun 28];12(9):694–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174230>
123. Thrainsdottir I, Malmberg K, Olsson A, Gutniak M, Rydén L. Initial experience with GLP-1 treatment on metabolic control and myocardial function in patients with type 2 diabetes mellitus and heart failure. *Diabetes Vasc Dis Res* [Internet]. 2004 May [cited 2016 Jun 28];1(1):40–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305055>
124. 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* [Internet]. 2004 Mar 2 [cited 2016 Jun 28];109(8):962–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981009>
125. Ding L, Zhang J. Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Jun 28];33(1):75–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120969>
126. Erdogdu O, Eriksson L, Xu H, Sjöholm A, Zhang Q, Nyström T. Exendin-4 protects endothelial cells from lipoapoptosis by PKA, PI3K, eNOS, p38 MAPK, and JNK pathways. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Jun 28];50(2):229–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343509>
127. Nyström T, Gonon AT, Sjöholm Å, Pernow J. Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regul Pept*. 2005;125(1):173–7.
128. Torimoto K, Okada Y, Mori H, Otsuka T, Kawaguchi M, Matsuda M, et al. Effects of exenatide on postprandial vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2015 [cited 2016 Jun 28];14:25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25849903>

129. Forst T, Michelson G, Ratter F, Weber MM, Anders S, Mitry M, et al. Addition of liraglutide in patients with Type 2 diabetes well controlled on metformin monotherapy improves several markers of vascular function. *Diabet Med* [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Jun 28];29(9):1115–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288732>
130. Nyström T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Ahrén B, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Dec [cited 2016 Jun 28];287(6):E1209–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353407>
131. Basu A, Charkoudian N, Schrage W, Rizza RA, Basu R, Joyner MJ. Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 Jun 28];293(5):E1289–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17711996>
132. Goto H, Nomiya T, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Komiya K, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. Vol. 405, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011.
133. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, et al. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes* [Internet]. 2010 Apr [cited 2016 Jun 28];59(4):1030–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068138>
134. Marx N, Burgmaier M, Heinz P, Ostertag M, Hausauer A, Bach H, et al. Glucagon-like peptide-1(1-37) inhibits chemokine-induced migration of human CD4-positive lymphocytes. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Jun 28];67(20):3549–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495843>
135. Liu H, Hu Y, Simpson RW, Dear AE. Glucagon-like peptide-1 attenuates tumour necrosis factor-alpha-mediated induction of plasminogen [corrected] activator inhibitor-1 expression. *J Endocrinol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Jun 28];196(1):57–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180317>
136. Ku H-C, Chen W-P, Su M-J. GLP-1 signaling preserves cardiac function in

endotoxemic Fischer 344 and DPP4-deficient rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Jun 28];382(5-6):463–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852989>

137. Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Jun 28];54(4):965–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21253697>

138. Park CW, Kim HW, Ko SH, Lim JH, Ryu GR, Chung HW, et al. Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2016 Jun 28];18(4):1227–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360951>

139. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* [Internet]. 2010 Aug [cited 2016 Jun 28];30(3):245–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665377>

140. Schlatter P, Beglinger C, Drewe J, Gutmann H. Glucagon-like peptide 1 receptor expression in primary porcine proximal tubular cells. *Regul Pept.* 2007;141(1):120–8.

141. Fujita H, Morii T, Fujishima H, Sato T, Shimizu T, Hosoba M, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int.* 2014;85(3):579–89.

142. Lee Y-S, Jun H-S. Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 28];2016:3094642. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27110066>

143. Zhou S-J, Bai L, Lv L, Chen R, Li C-J, Liu X-Y, et al. Liraglutide ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by activating endothelial nitric oxide synthase activity via the downregulation of the nuclear factor- κ B pathway. *Mol Med Rep* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Jun 28];10(5):2587–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25215431>

144. Liu WJ, Xie SH, Liu YN, Kim W, Jin HY, Park SK, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Jun 28];340(2):248–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025647>
145. Ojima A, Ishibashi Y, Matsui T, Maeda S, Nishino Y, Takeuchi M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist inhibits asymmetric dimethylarginine generation in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats by blocking advanced glycation end product-induced protein arginine methyltransferase-1 expression. *Am J Pathol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Jun 28];182(1):132–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159951>
146. Higashijima Y, Tanaka T, Yamaguchi J, Tanaka S, Nangaku M. Anti-inflammatory role of DPP-4 inhibitors in a nondiabetic model of glomerular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2015 Apr 15 [cited 2016 Jun 28];308(8):F878–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25656369>
147. Katagiri D, Hamasaki Y, Doi K, Okamoto K, Negishi K, Nangaku M, et al. Protection of glucagon-like peptide-1 in cisplatin-induced renal injury elucidates gut-kidney connection. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Jun 28];24(12):2034–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092928>
148. Chang M, Chen C, Chen Y, Wu Y, Zhen Y, Leu S, et al. Sitagliptin protects rat kidneys from acute ischemia-reperfusion injury via upregulation of GLP-1 and GLP-1 receptors. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Jun 28];36(1):119–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500876>
149. Vallon V, Docherty NG. Intestinal regulation of urinary sodium excretion and the pathophysiology of diabetic kidney disease: a focus on glucagon-like peptide 1 and dipeptidyl peptidase 4. *Exp Physiol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Jun 28];99(9):1140–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085841>
150. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, et al. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol* [Internet]. 1996 Oct [cited 2016 Jun 28];271(4 Pt 2):R848–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897973>

151. von Websky K, Reichetzeder C, Hocher B. Physiology and pathophysiology of incretins in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jun 28];23(1):54–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24257158>
152. Gutzwiller J-P, 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* [Internet]. 2004 Jun [cited 2016 Jun 28];89(6):3055–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181098>
153. Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002;434(3):163–7.
154. Carraro-Lacroix LR, Malnic G, Girardi ACC. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 Jun 28];297(6):F1647–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776173>
155. Yu M, Moreno C, Hoagland KM, Dahly A, Ditter K, Mistry M, et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* [Internet]. 2003 Jun [cited 2016 Jun 28];21(6):1125–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777949>
156. Hirata K, Kume S, Araki S, Sakaguchi M, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, et al. Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model. Vol. 380, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009.
157. Laugero KD, Stonehouse AH, Guss S, Landry J, Vu C, Parkes DG. Exenatide improves hypertension in a rat model of the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* [Internet]. 2009 Aug [cited 2016 Jun 28];7(4):327–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320558>
158. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* [Internet]. 1977 Apr [cited 2017 Jan 19];57(2):313–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/191856>
159. Malone J, Trautmann M, Wilhelm K, Taylor K, Kendall DM. Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Jun 28];18(3):359–67. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243286>

160. Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel APC, Lessa LM, Rossoni L V, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 Jun 28];29(3):520–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21150640>

161. MORETTO T, MILTON D, RIDGE T, MACCONELL L, OKERSON T, WOLKA A, et al. Efficacy and tolerability of exenatide monotherapy over 24 weeks in antidiabetic drug—naïve patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Clin Ther* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Jun 28];30(8):1448–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291808002725>

162. Farah LXS, Valentini V, Pessoa TD, Malnic G, McDonough AA, Girardi ACC. The physiological role of glucagon-like peptide-1 in the regulation of renal function. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2016 Jun 28];310(2):F123–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447224>

163. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 Nov [cited 2016 Jun 28];193(1):265–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>

164. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 Aug 15 [cited 2016 Jun 28];227(5259):680–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>

165. 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* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Jun 28];303(7):F963–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832924>

166. Peiris D, Thompson SR, Beratarrechea A, Cárdenas MK, Diez-Canseco F, Goudge J, et al. Behaviour change strategies for reducing blood pressure-related disease burden: findings from a global implementation research programme. *Implement Sci* [Internet]. 2015 Dec 9 [cited 2017 Jan 19];10(1):158. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553092>

167. Kawasaki T, Delea CS, Bartter FC, Smith H. The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension. *Am J Med* [Internet]. 1978 Feb [cited 2017 Jan 19];64(2):193–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/629267>

168. Guyton AC, Cowley AW, Coleman TG, DeClue JW, Norman RA, Manning RD. Hypertension: a disease of abnormal circulatory control. *Chest* [Internet]. 1974 Mar [cited 2017 Jan 19];65(3):328–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4360524>

169. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, et al. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* [Internet]. 1993 Nov [cited 2017 Jan 19];265(5 Pt 2):F736–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238556>

170. Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS. Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol* [Internet]. 1997 Aug [cited 2017 Jan 19];273(2 Pt 2):F289–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9277590>

171. Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M. Role of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2000 Mar [cited 2017 Jan 19];278(3):F375–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710541>

172. 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* [Internet]. 1998 Jul [cited 2016 Jun 28];19(3):282–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662405>

173. Farah LXS, Valentini V, Pessoa TD, Malnic G, McDonough AA, Girardi ACC. The physiological role of glucagon-like peptide-1 in the regulation of renal function. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2016;310(2):F123–7. Available from: <http://ajprenal.physiology.org/content/310/2/F123.full>

174. Magyar CE, Zhang Y, Holstein-Rathlou NH, McDonough AA. Proximal

tubule Na transporter responses are the same during acute and chronic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2000 Aug [cited 2016 Aug 6];279(2):F358–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919857>

175. Yang LE, Leong PKK, McDonough AA. Reducing blood pressure in SHR with enalapril provokes redistribution of NHE3, NaPi2, and NCC and decreases NaPi2 and ACE abundance. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2016 Aug 6];293(4):F1197–208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652375>

176. Yip KP, Tse CM, McDonough AA, Marsh DJ. Redistribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubules induced by acute and chronic hypertension. *Am J Physiol* [Internet]. 1998 Oct [cited 2016 Aug 6];275(4 Pt 2):F565–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755128>

177. Crajoinas RO, Lessa LMA, Carraro-Lacroix LR, Davel APC, Pacheco BPM, Rossoni L V, et al. Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Jun 28];299(4):F872–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630932>

178. Green BD, Hand K V., Dougan JE, McDonnell BM, Cassidy RS, Grieve DJ. GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch Biochem Biophys*. 2008;478(2):136–42.

179. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* [Internet]. 1996 Jan 4 [cited 2016 Aug 6];334(1):13–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494564>

180. Rao M V, Qiu Y, Wang C, Bakris G. Hypertension and CKD: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2004.

181. Yamagata K, Ishida K, Sairenchi T, Takahashi H, Ohba S, Shiigai T, et al. Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. *Kidney Int*. 2007;71(2):159–66.

182. Mogensen CE, Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical

diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 1987 Feb [cited 2016 Aug 6];31(2):673–89. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381533920X>

183. Remuzzi G, Mecca G, Cavenaghi AE, Donati MB, De Gaetano G. PROSTACYCLIN-LIKE ACTIVITY AND BLEEDING IN RENAL FAILURE. *Lancet* [Internet]. 1977 Dec [cited 2016 Aug 6];310(8050):1195–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673677904378>

184. Liu WJ, Xie SH, Liu YN, Kim W, Jin HY, Park SK, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2012 Feb [cited 2016 Aug 6];340(2):248–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025647>

185. Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 1999 Jul [cited 2017 Jan 19];77(7):556–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494801>

186. Brezniceanu M-L, Wei C-C, Zhang S-L, Hsieh T-J, Guo D-F, Hébert M-J, et al. Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* [Internet]. 2006 Jun [cited 2017 Jan 19];69(11):1977–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815514099>

187. Riccioni G. Aliskiren in the treatment of hypertension and organ damage. *Cardiovasc Ther* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Aug 6];29(1):77–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106033>

188. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III up-regulates genes involved in kidney damage in mesangial cells and renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 1998 Dec [cited 2016 Aug 6];68:S41–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839282>

189. Wu H, Liang Y, Zheng Y, Bai Q, Zhuang Z, A L, et al. Up-regulation of intrarenal renin-angiotensin system contributes to renal damage in high-salt induced hypertension rats. *Kidney Blood Press Res* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 6];39(6):526–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531334>

190. Ishibashi Y, Matsui T, Ojima A, Nishino Y, Nakashima S, Maeda S, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits angiotensin II-induced mesangial cell damage via protein kinase A. Vol. 84, *Microvascular Research*. 2012.
191. Yoshioka S, Nishino H, Shiraki T, Ikeda K, Koike H, Okuno A, et al. Antihypertensive effects of CS-045 treatment in obese Zucker rats. *Metabolism* [Internet]. 1993 Jan [cited 2016 Aug 6];42(1):75–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446053>
192. Katayama S, Abe M, Kashiwabara H, Kosegawa I, Ishii J. Evidence against a role of insulin in hypertension in spontaneously hypertensive rats. CS-045 does not lower blood pressure despite improvement of insulin resistance. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* [Internet]. 1994 Jun [cited 2016 Aug 6];23(6 Pt 2):1071–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8206597>
193. Glorie LLF, Verhulst A, Matheeußen V, Baerts L, Magielse J, Hermans N, et al. DPP4 inhibition improves functional outcome after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2016 Aug 6];303(5):F681–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718884>
194. Joo KW, Kim S, Ahn S, Chin HJ, Chae D-W, Lee J, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in rat remnant kidney. *BMC Nephrol* [Internet]. 2013 [cited 2016 Aug 6];14:98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621921>
195. Shehata MF. Genetic and dietary salt contributors to insulin resistance in Dahl salt-sensitive (S) rats. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2008 [cited 2016 Aug 6];7:7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397529>
196. van Heerebeek L, Somsen A, Paulus WJ. The failing diabetic heart: focus on diastolic left ventricular dysfunction. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2009 Feb [cited 2016 Aug 6];9(1):79–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19192429>
197. Kashyap SR, DeFronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diabetes Vasc Dis Res* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 Aug 6];4(1):13–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17469039>
198. Buchanan TA, Youn JH, Campese VM, Sipos GF. Enhanced glucose

tolerance in spontaneously hypertensive rats. Pancreatic beta-cell hyperfunction with normal insulin sensitivity. *Diabetes* [Internet]. 1992 Jul [cited 2016 Aug 6];41(7):872–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1612202>

199. Giannocco G, Oliveira KC, Crajoinas RO, Venturini G, Salles TA, Fonseca-Alaniz MH, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition upregulates GLUT4 translocation and expression in heart and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1):74–86.

200. Ding WG, Kitasato H, Matsuura H. Involvement of calmodulin in glucagon-like peptide 1(7-36) amide-induced inhibition of the ATP-sensitive K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Exp Physiol* [Internet]. 2001 May [cited 2016 Aug 6];86(3):331–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11429650>

201. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ. Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* [Internet]. 1993 Sep [cited 2017 Jan 19];22(3):292–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8349321>

8. Anexos:

Anexo I

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 21/08/2014, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 094/14 intitulado: "Mecanismos moleculares da ação anti-hipertensiva dos agentes incretinomiméticos e dos inibidores da Dipeptidil Peptidase IV" que utilizará 75 animais da espécie rato, apresentado pela Comissão Científica do INCOR.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Adriana Castello Costa Girardi

Pesquisador (a) Executante: Gabriela Cozin Aragão

CEUA-FMUSP, 21 de Agosto de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais