Daniel Francisco de Arruda Junior

A inibição da enzima dipeptidil peptidase
IV melhora a função cardiorrenal de ratos
com insuficiência cardíaca

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo

Orientadora: Dra. Adriana Castello
Costa Girardi

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Arruda Junior, Daniel Francisco

A inibição da enzima dipeptidil peptidase IV melhora a função cardiorrenal de ratos com insuficiência cardíaca / Daniel Francisco de Arruda Junior. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Dipeptidil peptidase 3.Inibidores da dipeptidil peptidase IV 4.Vildagliptina 5.Peptídeo -1 semelhante ao glucagon 6.Insuficiência cardíaca/fisiopatologia 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-036/15

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Regiane, com todo meu amor, admiração e gratidão por seu carinho, apoio, dedicação e compreensão nos momentos de ausência.

À minha irmã, Jéssica, pela força e apoio em todas as etapas vividas.

Aos meus maiores incentivadores, meus pais, Daniel e Silvana, cuja história de vida me faz melhorar a cada dia. Vocês me ensinaram a ter caráter, dignidade, perseverança e acreditar nos sonhos.

Todos vocês sempre me ajudaram e vibraram a cada conquista...

A Deus, que me carregou quando faltaram forças, não permitindo que eu me afastasse de meu propósito.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Adriana Castello Costa Girardi, mulher de convicções firmes, mente brilhante e líder com habilidades inspiradoras. Minha eterna gratidão pelos preciosos ensinamentos, confiança, apoio, dedicação, por todo incentivo e incansáveis esforços durante a realização de cada etapa deste trabalho e acima de tudo pela amizade e oportunidade de contribuir em minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger por possibilitar a realização desse trabalho em um ambiente profissional de excelência em pesquisa.

Ao Ednei, Léo e Rafa pelas indispensáveis colaborações e incansáveis esforços para realização deste trabalho e, principalmente pela amizade.

A todos meus colegas e pós-graduandos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, em especial ao grupo renal, pela colaboração, muitas vezes representada por indispensáveis palavras de incentivo, com grandes demonstrações de amizade.

À FAPESP pelo apoio financeiro, tornando viável o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os que incentivaram e colaboraram de modo direto ou indireto, para o início e a concretização desse trabalho, muito obrigado!

“Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida, ou
como um resultado que aponta uma nova direção.”

Steve Jobs

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus.”

Aristóteles

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</i>	<i>i</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>iv</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>vi</i>
<i>RESUMO</i>	<i>vii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>ix</i>
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca (IC)	2
1.2 Conceito e etiologia da IC	3
1.3 Fisiopatologia da IC	3
1.4 Tratamentos da IC	4
1.5 Mecanismos adaptativos renais na IC	6
1.6 Dipeptidil Peptidase IV (DPPIV)	12
1.7 Inibidores da DPPIV	14
2. OBJETIVO	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Material	22
3.3 Cirurgia de Ablação por Radiofrequência do Ventrículo Esquerdo para Indução de Insuficiência Cardíaca.....	23
3.4 Grupos Experimentais	25
3.5 Desenho Experimental	26
3.6 Avaliação Biométrica e Morfométrica	28
3.7 Imunohistoquímica	30
3.8 Avaliação da Função Cardíaca por Ecodopplercardiograma	32
3.9 Avaliação da Função Renal	34
3.10 Isolamento de proteínas de membrana córtex renal	35
3.11 Isolamento de proteínas de coração.....	36
3.12 Determinação da concentração de proteínas	36

3.13	Determinação da atividade da DPPIV	37
3.14	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)	37
3.15	Immunoblotting	38
3.16	Reação em cadeia da polimerase em tempo real	41
3.16.1	Extração de RNA total	41
3.16.2	Transcrição do DNA complementar	42
3.16.3	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).....	42
3.17	Determinação das concentrações plasmáticas de GLP-1, insulina e BNP total.....	44
3.18	Teste Oral de Tolerância à Glicose	45
3.19	Análise Estatística	46
4.	RESULTADOS.....	48
4.1	Efeitos da Vildagliptina sobre a função cardíaca de ratos com IC.....	48
4.2	Efeitos da Vildagliptina sobre parâmetros biométricos de ratos com IC	53
4.3	Efeitos da Vildagliptina sobre a atividade, expressão protéica e gênica da DPPIV	55
4.4	Efeitos do tratamento com Vildagliptina sobre o remodelamento cardíaco.....	60
4.5	Efeitos da Vildagliptina sobre a homeostase da glicose em ratos com IC ..	64
4.6	Efeitos da Vildagliptina sobre os níveis circulante de GLP-1 e de expressão do receptor de GLP-1 (GLP-1R) no coração e rim.....	66
4.7	Efeitos da Vildagliptina sobre a função renal de ratos com IC	70
4.8	Efeitos da Vildagliptina sobre atividade da PKA em córtex renal de ratos com IC	72
4.9	Efeitos da Vildagliptina sobre a expressão total do NHE3 e sobre os níveis de fosforilação da serina 552 deste transportador em córtex renal de ratos com IC.....	74
5.	DISCUSSÃO	76
5.1	Evidências clínicas versus evidências experimentais.....	80
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPC – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

BNP – Peptídeo Natriurético Cerebral

BSA – Albumina de soro bovino

°C – grau Celsius

µg – microgramas

µl – microlitros

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DPPIV – Dipeptidil peptidase IV

DO – densidade óptica

ECL – “Enhanced chemiluminescence”

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EPM – Erro padrão da média

FAC – “Fractional Area Change”

g – gramas

GIP – Peptídeo gástrico insulínico

GLP-1 – Peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GLP-1 – Receptor de GLP-1

h – hora

H⁺ – Íon hidrogênio

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HF – “Heart Failure”

HRP – Anticorpo secundário conjugado à peroxidase

IC – Insuficiência Cardíaca

IDPPIV – Inibidor da DPPIV

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

KCl – Cloreto de potássio

kDa – quilodalton

kg – quilogramas

M – molar

mg – miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

mv – milivolts

Na⁺ – Íon sódio

NaCl – Cloreto de sódio

ng – nanogramas

NHE3 – isoforma 3 do trocador Na⁺/H⁺

nm – nanômetros

nM – nanomolar

PA – Pressão arterial

PBS – Tampão fosfato-salino

P_{Cr} – Concentração plasmática de creatinina

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

Pg - picogramas

PKA – Proteína cinase A

pM – picomolar

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PVDF – Polímero de Fluoreto de Polivinilideno

r – Coeficiente de determinação de correlação de Pearson

RFG - Ritmo de filtração glomerular

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RPM – Rotações por minuto

SDF-1 α – Fator derivado do estroma-1 alfa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

TOTG – Teste oral de tolerância à glicose

TRIV - Tempo de relaxamento isovolúmico

U – Unidade internacional para quantificação de atividade enzimática

UCr – Concentração urinária de creatinina

V – Fluxo urinário

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

v/v – volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da retenção de sal e água na IC.....	8
Figura 2. Modelo representativo da modulação do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal renal na IC.	11
Figura 3. Distribuição de frequência da atividade da DPPIV circulante em pacientes com insuficiência cardíaca (HF) e indivíduos normais (Control).....	17
Figura 4. Interação molecular da Vildagliptina com a dipeptidil peptidase IV	23
Figura 5. Cortes representativos de corações de ratos Sham e com IC induzida por meio de cirurgia de ablação por radiofrequência do ventrículo esquerdo (VE)	24
Figura 6. Injúria Miocárdica por Ablação do VE	25
Figura 7. Desenho Experimental.....	27
Figura 8. Representação esquemática da divisão do coração para análises histológicas e moleculares.....	29
Figura 9. Localização da enzima DPPIV por imunohistoquímica em córtex renal de ratos Wistar.	31
Figura 10. Avaliação da função cardíaca em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.....	51
Figura 11. Níveis circulantes e expressão gênica do BNP no coração de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina	52
Figura 12. Atividade da DPPIV no soro, coração e rim dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina	56
Figura 13. Abundância da DPPIV no soro, coração e rim dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.	57
Figura 14. Avaliação da distribuição da DPPIV no coração dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina	58

Figura 15. Avaliação da expressão gênica da DPPIV no coração dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.	59
Figura 16. Efeitos da Vildagliptina sobre a hipertrofia cardíaca	61
Figura 17. Efeitos da Vildagliptina sobre a fibrose miocárdica.....	62
Figura 18. Avaliação da expressão do colágeno tipo 1 no coração dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina	63
Figura 19. Homeostase glicêmica de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.....	65
Figura 20. Níveis circulantes de GLP-1 ativo e total em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.....	68
Figura 21. Expressão protéica do GLP-1R no coração e rim de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.	69
Figura 22. Função renal de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina	71
Figura 23. Atividade da PKA em córtex renal dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.....	73
Figura 24. Expressão total do NHE3 e níveis de fosforilação do resíduo de serina 552 em córtex renal de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação sintomática da insuficiência cardíaca de acordo com a “New York Heart Association”	5
Tabela 2. Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de “immunoblotting”	40
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real	44
Tabela 4. Parâmetros biométricos em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.....	54

RESUMO

Arruda Junior, DF. *A inibição da enzima dipeptidil peptidase IV melhora a função cardiorrenal de ratos com insuficiência cardíaca* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Dados recentes do nosso laboratório sugerem que a enzima dipeptidil peptidase IV (DPPIV), uma serino-protease que pode ser encontrada ancorada na membrana celular de diversos tipos celulares ou na forma solúvel no plasma, possui um papel importante na fisiopatologia da insuficiência cardíaca (IC). Mais especificamente, demonstramos que a atividade da DPPIV circulante está associada com piores desfechos cardiovasculares em modelo experimental e pacientes com IC. Ademais, observamos que a inibição crônica da DPPIV atenua o desenvolvimento e/ou a progressão da IC em ratos submetidos à injúria do miocárdio. Entretanto, não é sabido se a inibição desta peptidase é capaz de reverter a disfunção cardiorrenal em ratos com IC estabelecida. Assim, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese que a inibição da DPPIV exerce efeitos terapêuticos em ratos com IC. Para tal, ratos com IC foram tratados diariamente com o inibidor da DPPIV Vildagliptina (80 ou 120 mg/kg/dia) ou veículo (HF) durante quatro semanas. Ratos Sham não-tratados foram utilizados como controle. Análises ecocardiográficas demonstraram que ratos HF exibiram área fracional (FAC) menor e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) maior que ratos Sham. Por sua vez, o tratamento com a dose maior de Vildagliptina foi capaz de aumentar a FAC e diminuir o TRIV. Esta melhora funcional foi acompanhada por melhoras estruturais, visto que a inibição da DPPIV foi capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca e a deposição de colágeno intersticial no miocárdio remanescente de ratos tratados com Vildagliptina em comparação aos ratos HF. Adicionalmente, ratos com IC exibiram maior teor de água nos pulmões, menor excreção urinária de sódio, menor fluxo urinário e menor ritmo de filtração glomerular em comparação ao grupo Sham. Por sua vez, o manuseio renal de sal e água foi completamente restaurado pelo tratamento crônico com 120 mg/kg/dia Vildagliptina. A normalização da função renal induzida pela inibição crônica da DPPIV foi associada com um aumento da expressão do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e maior ativação da proteína cinase A em córtex renal, isto é, da via de sinalização deflagrada pela ligação GLP-1/GLP-1R. Além disso, os níveis pós-prandiais do GLP-1, principal substrato da DPPIV que exerce ações insulínótropicas, cardio e renoprotetoras, estavam mais baixos em ratos HF que em ratos Sham. Esta diminuição dos níveis circulantes de GLP-1 (ativo e total) em ratos HF foi acompanhada de intolerância à glicose bem como de maiores níveis plasmáticos de insulina. A inibição da DPPIV com Vildagliptina melhorou a biodisponibilidade e a secreção de GLP-1 após carga oral de glicose. Em conjunto, estes resultados sugerem que a inibição da DPPIV melhora a função cardiorrenal e metabólica de ratos com IC. Além disso, a secreção e a biodisponibilidade do GLP-1

encontram-se prejudicadas em ratos com IC e o tratamento com Vildagliptina é capaz de restaurar a sinalização mediada por este peptídeo. Assim, os inibidores da DPPIV podem ser eficazes não apenas para a prevenção, mas também para o tratamento da insuficiência cardíaca em ratos.

Descritores: Insuficiência cardíaca; Dipeptidil peptidase; Inibidores da dipeptidil peptidase IV; Vildagliptina; Peptídeo-1 semelhante ao glucagon; Insuficiência cardíaca/fisiopatologia; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Arruda Junior, DF. *Dipeptidyl peptidase IV inhibition ameliorates cardiorenal function of heart failure rats* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Recent data from our laboratory suggest that the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), a serine protease that can be found anchored in the cell membrane of different cell types or in the soluble form in plasma, plays an important role in the pathophysiology of heart failure (HF). More specifically, we have demonstrated that the activity of circulating DPPIV is associated with poorer cardiovascular outcomes in an experimental model and patients with HF. In addition, we have found that chronic inhibition of DPPIV attenuates the development and/or progression of HF in rats with myocardial injury. However, it is unknown whether the inhibition of this peptidase is able to reverse the cardiorenal dysfunction in rats with established HF. Therefore, this study aimed to test the hypothesis that inhibition of DPPIV exerts therapeutic effects in rats with HF. To this end, HF rats were treated daily with the DPPIV inhibitor vildagliptin (80 or 120 mg/kg/day) or vehicle (HF) for four weeks. Untreated Sham rats were used as controls. Echocardiographic analysis demonstrated that HF rats exhibit lower fractional area change (FAC) and higher isovolumetric relaxation time (IVRT) than Sham rats. On the other hand, treatment with the highest dose of vildagliptin was able to increase FAC and decrease IVRT. These functional improvements were accompanied by structural improvements, since inhibition of DPPIV was also able to reduce cardiac hypertrophy and interstitial collagen deposition in the remaining myocardium of rats treated with vildagliptin rats compared to HF. In addition, HF rats exhibited higher water content in the lungs, lower urinary sodium excretion, lower urinary flow and lower glomerular filtration rate compared to the Sham group. In turn, the renal handling of salt and water was completely restored by chronic treatment with vildagliptin 120 mg/kg/day. Normalization of the renal function induced by chronic inhibition of DPPIV was associated with an increase in the expression of the glucagon like peptide-1 receptor (GLP-1R) and enhanced protein kinase A activation in the renal cortex, the signaling pathway triggered by bind between GLP-1/GLP-1R. In addition, the postprandial levels of GLP-1, the main substrate of DPPIV that exerts insulinotropic, cardio and renoprotective actions, were lower in HF rats than in Sham. This decrease in circulating levels of GLP-1 (active and total) in HF rats was accompanied by impaired glucose tolerance and higher plasma insulin levels. The inhibition of the DPPIV with vildagliptin improved the bioavailability and secretion after an oral glucose load. Taken together, these results suggest that the inhibition of DPPIV ameliorates the cardiorenal and metabolic function of rats with HF. Furthermore, bioavailability and secretion of GLP-1 are impaired in HF rats and vildagliptin is

able to restore the signaling mediated by this peptide. Therefore, DPPIV inhibitors can be effective not only in preventing but also for the treatment of HF in rats.

Keywords: Heart failure; Dipeptidyl peptidase IV; Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV; vildagliptin; Glucagon-like peptide-1; Heart Failure/pathophysiology; Wistar rats.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca (IC)

A insuficiência cardíaca (IC) representa um problema grave de saúde pública, constituindo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo. Estima-se que a IC acomete cerca de 23 milhões de pessoas no mundo e que dois milhões de casos novos são diagnosticados anualmente [1]. No Brasil, estima-se que haja cerca de 6,4 milhões de portadores de IC, sendo diagnosticados 240 mil casos por ano. Segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS), entre janeiro de 2008 e dezembro de 2010, houve 803.782 internações devidas à IC, que atingiram o custo global de R\$ 847.767.926,75 (DATASUS). Entre os pacientes com mais de 60 anos, a IC é a principal causa de morte e internação hospitalar. As projeções do IBGE indicam que no ano de 2050, o Brasil terá um cenário populacional total de 230.000.000 de habitantes, sendo destes, aproximadamente 20%, ou 50.000.000, de indivíduos acima de 65 anos de idade [2]. O aumento da expectativa de vida das populações e o fato da IC ser a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares sugere fortemente que o encargo econômico associado a esta síndrome continuará a progredir. Tais aspectos justificam o empenho em se obter um maior conhecimento sobre a síndrome da IC, notadamente no que se refere a viabilizar o desenvolvimento de novos procedimentos preventivos, diagnósticos e terapêuticos.

1.2 – Conceito e etiologia da IC

A IC é uma síndrome clínica, classicamente definida como falência do coração em propiciar suprimento adequado de sangue em relação ao retorno venoso e às necessidades metabólicas teciduais. Caracterizada pela deterioração progressiva do músculo cardíaco e perda da função de bomba dos ventrículos com conseqüente diminuição do débito cardíaco, a IC tem como principais etiologias: a doença isquêmica, hipertensiva, e idiopática [3].

Existem dois mecanismos responsáveis pela redução do débito cardíaco na IC: 1) disfunção sistólica e 2) disfunção diastólica. As causas mais comuns de disfunção sistólica (definida por uma fração de ejeção ventricular esquerda menor que 50%) são as doenças cardíacas isquêmicas, cardiomiopatia dilatada idiopática, hipertensão e doença cardíaca valvar. Disfunção diastólica (definida como disfunção de enchimento-ventricular esquerdo) pode ocorrer em até 40-50% dos pacientes com insuficiência cardíaca, é mais prevalente nas mulheres, e aumenta em frequência a cada década da vida. Disfunção diastólica pode ocorrer pelas mesmas condições que levam à disfunção sistólica. No entanto, as causas mais comuns são hipertensão, doença cardíaca isquêmica, cardiomiopatia hipertrófica e miocardiopatia restritiva.

1.3 – Fisiopatologia da IC

Em resposta à injúria do miocárdio ou à sobrecarga hemodinâmica sobre o ventrículo, diversos mecanismos compensatórios são acionados com o fim de manterem a função de bomba do coração, e conseqüentemente, o débito cardíaco e a perfusão tecidual. Dentre estes mecanismos inclui-se a ativação de sistemas neuro-humorais tais como o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina, o mecanismo de “Frank-Starling” e o remodelamento cardíaco. Todos estes

mecanismos, em um curto período de tempo, sustentam a função cardíaca mantendo o débito cardíaco adequado. Contudo, quando cronicamente mantidos, estes mecanismos tornam-se deletérios, exacerbando a disfunção cardíaca e levando ao estabelecimento de um quadro de IC.

1.4 – Tratamentos da IC

A estratificação de pacientes com IC para determinar a necessidade de intervenção clínica, é baseada no sistema de classificação da “New York Heart Association” (NYHA), que separa os pacientes com base nas limitações que apresentam na realização de certas atividades (Tabela 1). Um paciente com IC classe I não tem quase nenhuma evidência de limitação no desempenho diário das atividades, enquanto que um paciente com IC classe IV apresenta sintomas graves, mesmo em estado de repouso. Este sistema também fornece um ponto de referência para adotar a modalidade de tratamento de acordo com o grau de IC [4]

Tabela 1. Classificação sintomática da insuficiência cardíaca de acordo com a “New York Heart Association” (Fonte: “American Heart Association - AHA”) [4].

Classe	Capacidade Funcional: Como um paciente com doença cardíaca se sente durante a atividade física
I	Pacientes com doença cardíaca, mas que não apresentam nenhuma limitação durante atividade física. A atividade física normal não causa fadiga, palpitação, dispnéia ou dor anginosa.
II	Pacientes com doença cardíaca, apresentando ligeira limitação durante atividade física. Confortáveis em repouso. A atividade física normal resulta em fadiga, palpitação, dispnéia ou dor anginosa.
III	Pacientes com doença cardíaca, apresentando limitação acentuada durante atividade física. Confortáveis em repouso. Pouco tempo de atividade física resulta em fadiga, palpitação, dispnéia ou angina.
IV	Pacientes com doença cardíaca, apresentando incapacidade de exercer qualquer atividade física sem desconforto. Os sintomas de IC podem estar presentes mesmo em repouso.

Compreender a fisiopatologia da IC permite alcançar os objetivos do tratamento, que visam aliviar os sintomas, evitar internações hospitalares, e prolongar o tempo de vida do paciente. O tratamento para IC consiste em uma combinação de terapias farmacológicas e não-farmacológicas. Os tratamentos básicos geralmente se concentram em: 1) interferir no sistema renina-angiotensina-aldosterona para reduzir a pós-carga através de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), 2) reduzir os níveis de catecolaminas e normalizar a frequência cardíaca com beta-bloqueadores, 3) aumentar a contratilidade miocárdica através de digitálicos e 4) reduzir a pré-carga com diuréticos [5, 6]. Os inibidores da ECA reduzem a produção de angiotensina II (ANG II) e exercem um efeito biológico que melhora os sintomas, reduz internações, e prolonga a sobrevida [7]. Inibidores da

Introdução

ECA são recomendados para todos os pacientes com IC com função sistólica reduzida. Os principais efeitos adversos dos inibidores da ECA são tosse (até 20%), hipotensão sintomática, e disfunção renal. Os beta-bloqueadores protegem o coração dos efeitos prejudiciais da norepinefrina e epinefrina. Intolerância aos beta-bloqueadores é incomum e ocorre geralmente devido a bradicardia ou vertigens. Beta-bloqueadores podem piorar a função pulmonar em pacientes com doença pulmonar obstrutiva, mas a maioria dos pacientes são bem toleráveis a beta-bloqueadores cardio-seletivos, quando cuidadosamente monitorados. Os digitálicos são usados no tratamento da IC para aumentar a força de contração ventricular quando diuréticos e inibidores da ECA não são suficientes. Diuréticos são essenciais para o alívio da dispnéia e retenção de sódio e água (edema). Cada modalidade terapêutica apresenta limitações para determinados tipos de pacientes, uma vez que pacientes com disfunção diastólica desenvolvem frequentemente tonturas, hipotensão, arritmias, perda de potássio e magnésio como efeitos adversos aos diferentes tipos de tratamentos utilizados [8]. Embora ensaios clínicos tenham demonstrado mortalidade significativamente menor com as múltiplas intervenções terapêuticas, a taxa de mortalidade global por IC continua a aumentar [9].

1.5 – Mecanismos adaptativos renais na IC

Uma das principais manifestações clínicas da IC é a formação de edema, sendo este decorrente, primordialmente, da excessiva retenção de sal e água pelos rins [10]. No caso de doenças edematosas como a IC e a cirrose hepática, a causa primária da retenção de sódio e água não é uma disfunção renal. Ao contrário, os rins são funcionalmente competentes e fazem o que deles se espera, ou seja, respondem

Introdução

como se o organismo estivesse diante de uma hipovolemia real. De fato, é a redução crônica do volume arterial efetivo, também denominada subpreenchimento arterial, o determinante primário dos distúrbios hidroeletrólíticos presentes na IC [11, 12] (Figura 1). O subpreenchimento arterial desencadeia a ativação de barorreceptores no arco aórtico, seio carotídeo e arteríolas aferentes renais, que promovem, por sua vez, uma maior ativação do sistema nervoso simpático (SNS). O decorrente aumento de catecolaminas circulantes e nos terminais sinápticos eleva o cronotropismo e inotropismo cardíacos e a resistência vascular periférica e renal [13]. O aumento do tônus adrenérgico renal estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que promove, por conseguinte, ávida retenção de sal e água pelos rins. Ademais, a ativação do SNS estimula os núcleos paraventricular e supraóptico no hipotálamo, aumentando a liberação de vasopressina, que via ativação de receptores V_2 , aumenta a reabsorção renal de água em nefro distal [14].

Figura 1. Fisiopatologia da retenção de sal e água na IC. Descarga de barorreceptores de alta pressão (círculos azuis) no ventrículo esquerdo, seio carotídeo e arco aórtico gera sinais aferentes (linhas pretas) que estimulam o centro cardiorregulatório no cérebro, o que resulta na ativação de vias eferentes no SNS (linhas verdes). A ativação de nervos simpáticos renais estimula a liberação de renina e ANG II, ativando assim o SRAA. Concomitantemente, a estimulação simpática dos núcleos supra-ópticos e paraventriculares no hipotálamo resulta na liberação não osmótica de AVP. A ativação simpática, bem como a liberação de ANG II, também provoca vasoconstrição periférica e renal. A ANG II constri os vasos sanguíneos e estimula a liberação de aldosterona a partir da glândula supra-renal, aumentando a reabsorção tubular de sódio. As linhas azuis correspondem aos hormônios circulantes (Fonte: Cadnapaphornchai MA, et al. 2001) [11].

Introdução

Os mecanismos responsáveis pelas alterações do manuseio renal de sal e água que favorecem a formação de edema na IC podem envolver um decréscimo do ritmo de filtração glomerular, um aumento na reabsorção tubular de sódio e água, ou ambos. A entrada de sódio pela membrana apical das células tubulares renais constitui o passo limitante para o transporte transepitelial de sódio e fluido. Logo, mudanças tanto no número como na atividade intrínseca das proteínas que medeiam a entrada desse íon podem afetar a taxa de reabsorção tubular renal [15]. Estudos publicados recentemente forneceram evidências convincentes de que o aumento da expressão dos principais transportadores de sódio na membrana apical desempenha um papel importante na retenção renal de sódio e água contribuindo para a gênese do edema associado à IC [16-19].

O túbulo proximal exerce papel central na regulação do volume extracelular, uma vez que é responsável por cerca de dois terços da reabsorção do sódio filtrado nos glomérulos. A maior parte da reabsorção de sódio neste segmento do nefro faz-se através da troca de Na^+ por H^+ em membrana apical, mediada pela isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) [20-23]. Considerando a importância quantitativa desse mecanismo de transporte na mediação da reabsorção de sódio em túbulo proximal renal, mudanças, ainda que discretas, na atividade do NHE3 podem causar grande impacto sobre a homeostase volêmica. Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que na IC a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal encontra-se aumentada, contribuindo potencialmente para expansão do volume extracelular e formação de edema (Figura 2). Neste estudo, a atividade do NHE3 foi determinada *in vivo* e *ex-vivo* em um modelo experimental de IC desenvolvido por Antonio e colaboradores no qual ratos são submetidos à injúria do miocárdio por meio de

Introdução

ablação por correntes de radiofrequência no ventrículo esquerdo [24]. Foi verificado que a troca Na^+/H^+ mediada por NHE3 encontra-se significativamente aumentada em túbulo proximal de ratos com IC quando comparados aos ratos Sham que sofreram cirurgia fictícia ($58 \pm 3\%$, $P < 0.001$). Este aumento na atividade de transporte do NHE3 foi acompanhado por um aumento da expressão protéica ($68 \pm 8\%$ vs. Sham, $P < 0.01$) e dos níveis de RNAm-NHE3 ($145 \pm 18\%$ vs. Sham, $P < 0.01$) em córtex renal. Adicionalmente, observamos que a fosforilação basal do NHE3 na serina 552, sítio consenso para proteína cinase A, associada com a diminuição da atividade do trocador, encontra-se diminuída em córtex renal de ratos com IC ($64 \pm 4\%$ vs. Sham, $P < 0.01$) [25].

Figura 2. Modelo representativo da modulação do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal renal na IC. Os níveis de NHE3-mRNA e a abundância protéica do NHE3 estão aumentados na IC enquanto os níveis de fosforilação da serina 552 localizada na região carboxi-terminal do NHE3, estão diminuídos quando comparados ao controle. Isso leva ao aumento da atividade transportadora do NHE3. Este aumento na reabsorção de sódio mediada pelo NHE3 em túbulo proximal pode contribuir para o aumento do edema (Fonte: Girardi AC& Di Sole F. 2012) [26].

Por outro lado, vale destacar que existem outros transportadores ao longo do néfron que estão envolvidos na retenção renal de sal e água na IC. Lutken SC e colaboradores demonstraram anteriormente que a IC está associada com desregulação de AQP2 no ducto coletor medular renal. Neste trabalho, ratos com IC induzida por ligadura da artéria coronária descendente anterior, apresentaram um aumento na abundância de aquaporina 2 (AQP2) e p-AQP2 em células principais do ducto coletor medular, uma redistribuição acentuada de AQP2 e p-AQP2 na membrana plasmática apical. Além disso, foi observado regulação positiva do co-transportador NHE3, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) e do canal pra sódio α -epitelial (ENaC), evidenciando que tais alterações podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de retenção de sódio e água [19].

As conclusões obtidas enfatizam e reiteram que o tratamento adequado para conter a progressão das doenças cardiovasculares requer uma abordagem cardiorrenal, tendo em vista que pequenas modificações da função renal encontram-se estreitamente associadas com a morbidade e mortalidade cardiovasculares. Deste modo, interferir no eixo cardiorrenal constitui um importante objetivo terapêutico. Novas estratégias terapêuticas devem focar, portanto, no conhecimento aprofundado dos mecanismos adaptativos e compensatórios renais frente à doença cardiovascular.

1.6 – Dipeptidil Peptidase IV (DPPIV)

A enzima dipeptidil peptidase IV (DPPIV) (EC 3.4.14.5), também conhecida como CD26, é uma serino-protease que cliva a região amino-terminal de polipeptídeos que contêm preferencialmente uma prolina ou alanina como segundo resíduo. É expressa na superfície de células epiteliais, endoteliais, linfócitos e

Introdução

fibroblastos. Uma forma solúvel da DPPIV é também encontrada no plasma e em outros fluidos corporais [27].

A DPPIV é uma proteína multifuncional. Além de sua ação como exopeptidase, esta enzima atua como “binding protein”, interagindo de maneira específica com outras proteínas na superfície celular. Na matriz extracelular, a DPPIV associa-se diretamente ao colágeno [28] e à fibronectina [29]. Em linfócitos T, a DPPIV interage com a adenosina deaminase (ADA) [30], com CD45, uma tirosina fosfatase [31] e com o receptor de quimiocinas CXCR4 [32]. Foi demonstrado anteriormente que a DPPIV encontra-se fisicamente associada com o NHE3 em membrana apical de túbulo proximal renal [33]. Estudos realizados *in vitro* [34] e *in vivo* [35] mostraram haver uma relação entre a inibição da atividade catalítica da DPPIV e a atividade do NHE3, podendo-se constatar, portanto, a existência de uma interação física e funcional entre estas duas proteínas.

Um grande número de hormônios peptídeos é clivado pela DPPIV entre eles, as incretinas peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e peptídeo gástrico insulínico (GIP). Ambos são substratos fisiológicos da DPPIV e a atividade catalítica desta enzima resulta na degradação desses peptídeos em poucos minutos. Hormônios incretinas são liberados pelas células endócrinas do intestino e estimulam potencialmente a secreção de insulina após a ingestão de alimentos. GIP é um peptídeo com 42 aminoácidos sintetizado pelas células K enteroendócrinas do intestino delgado proximal. O GLP-1 é originado a partir do pró-glucagon por meio de regulação pós-traducional. GLP-1 amido (7-36), a forma predominante secretada, e GLP-1 (7-37), comumente referido como GLP-1 bioativo intacto, são sintetizados e secretados a partir das células L enteroendócrinas distribuídas ao longo dos intestinos

Introdução

delgado (íleo distal) e grosso (cólon). O GLP-1 também contribui para a homeostase da glicose através da estimulação da biossíntese de proinsulina, inibição da secreção de glucagon, retardando o esvaziamento gástrico e redução do apetite [36-38]. O GLP-1 é constantemente secretado pelo intestino e seus níveis plasmáticos normais em jejum e após a ingestão de nutrientes são respectivamente 5-10 pmol/L e 15-50 pmol/L.

As ações do GLP-1 são compreendidas através da ativação de receptores acoplados à proteína G, expressa em células- α e β -pancreáticas e nos tecidos periféricos, incluindo o sistema nervoso central, trato gastrointestinal, coração e pulmões. A ativação do receptor de GLP-1 (GLP-1R) aumenta os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e estimula a secreção de insulina de maneira dependente de glicose [39].

1.7 – Inibidores da DPPIV

A inibição farmacológica da atividade catalítica da DPPIV previne a degradação e aumenta o tempo de meia vida das incretinas. Adicionalmente, a inibição sustentada da DPPIV contribui para a homeostase da glicose promovendo a estimulação de secreção de insulina e inibição da secreção de glucagon e está também associada com maior preservação de células beta em estudos pré-clínicos [27, 40]. Diante disso, os inibidores da DPPIV, também chamados de gliptinas, constituem uma classe farmacológica promissora de agentes anti-hiperglicemiantes utilizados para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 [41]. Vários inibidores da DPPIV já estão sendo comercializados, a sitagliptina (aprovada pela “Food and Drug Administration” (FDA) em Outubro de 2006) [42], a Vildagliptina (não aprovada pela FDA nos Estados Unidos, mas disponível na maioria dos outros países,

Introdução

incluindo a Europa), [43, 44] a saxagliptina (aprovada pela FDA em julho de 2009) [45], a linagliptina (aprovada pela FDA em maio de 2011), [46] e a alogliptina (aprovada pela FDA em janeiro de 2013) [47, 48]. Embora os inibidores da DPPIV produzam uma redução um pouco menos acentuada ou reduções semelhantes nos níveis de glicose e hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue em comparação com outros agentes anti-hiperglicêmicos, [49, 50] eles podem oferecer várias vantagens clínicas, [49, 51, 52], incluindo um risco menor de hipoglicemia (especialmente quando comparados com as sulfoniluréias [53-55] e uma ausência de ganho de peso (em vez disso, pode ocorrer uma ligeira redução do peso) [54-57].

Contudo, devido à miríade de ações fisiológicas dos diferentes peptídeos que são clivados por esta enzima in vivo e ao estabelecimento de interações do tipo proteína-proteína em uma série de tecidos, o efeito da inibição da atividade da DPPIV pode ir muito além do benefício glicêmico.

Estudos recentes têm mostrado que o GLP-1 e seus análogos possuem efeitos cardioprotetores e renoprotetores e estas ações benéficas podem ser atribuídas, pelo menos parcialmente, ao aumento da biodisponibilidade do GLP-1. Estes agentes 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 [58-62]. GLP-1 e seus análogos exercem também efeitos natriuréticos em humanos e em modelos experimentais, e acredita-se que esse mecanismo esteja relacionado, ao menos em parte, com a função tubular proximal [63-65]. Corroborando as ações natriuréticas do GLP-1 em túbulo proximal, nosso grupo demonstrou que o agonista do receptor de GLP-1 exendin-4, inibe a atividade do NHE3 neste segmento do néfron [66]. Nosso

grupo também demonstrou anteriormente que GLP-1 medeia diurese e natriurese por meio de alterações na hemodinâmica renal e por “downregulation” da atividade do NHE3 no túbulo proximal renal [67].

Por outro lado, além dos hormônios incretinas, uma variedade de peptídeos que exercem efeitos cardioprotetores são inativados pela DPPIV, incluindo o fator derivado do estroma-1 alfa (SDF-1 alfa) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP) [68, 69]. O SDF-1 α é um potente fator angiogênico e o BNP possui diversas ações anti-hipertróficas, vasodilatadoras e natriuréticas.

O BNP é um dos mais conhecidos biomarcadores de estresse biomecânico cardíaco. Secretado pelos ventrículos em resposta ao estiramento dos cardiomiócitos, o BNP se liga e ativa receptores, causando diminuição da resistência vascular sistêmica, pressão venosa central e natriurese. O BNP tem sido estudado extensivamente e fornece informações prognósticas na sequência de um infarto do miocárdio. Níveis plasmáticos elevados de BNP é um forte indicador de IC [70]. No entanto, apesar de pacientes com IC apresentarem níveis circulantes de BNP extremamente elevados, os efeitos mediados pelo BNP a nível renal estão frequentemente prejudicados. Este paradoxo endócrino pode ser parcialmente explicado pelo fato de que existe no plasma de pacientes com IC formas truncadas do BNP com atividade fisiológica renal reduzida [71, 72]. Evidências recentes demonstraram *in vitro* e *in vivo* que a DPPIV cliva o dipeptídeo N-terminal do BNP intacto (1-32), produzindo BNP (3-32) [68], que apresenta atividade renal e vascular reduzida [73]. Deste modo, o aumento da inativação de BNP mediada pela atividade catalítica aumentada da DPPIV na IC pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento desse complexo paradoxo.

Introdução

Demonstramos recentemente que a atividade e abundância da DPPIV circulante estão aumentadas em ratos com IC e em pacientes com IC (Figura 3) e correlaciona negativamente com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) em ratos e humanos e correlaciona positivamente com a pressão diastólica final do VE e congestão pulmonar em ratos.

Figura 3. Distribuição de frequência da atividade da DPPIV circulante em pacientes com insuficiência cardíaca (HF) e indivíduos normais (Control). (Fonte: dos Santos L, et al. 2013) [74].

Além disso, observamos que o tratamento com o inibidor da DPPIV, sitagliptina, atenua significativamente a disfunção cardíaca em ratos submetidos à injúria miocárdica por meio de ablação com radiofrequência. Esta melhora inclui diminuição da pressão final diastólica do ventrículo esquerdo, aumento do desempenho sistólico e diminuição da rigidez da câmara cardíaca. O tratamento com sitagliptina também atenua a hipertrofia cardíaca e a fibrose intersticial do miocárdio remanescente. Além disso, a inibição da DPPIV foi capaz de melhorar tanto a

Introdução

hemodinâmica renal, quanto a função tubular, assim como minimizar a congestão pulmonar. Em conjunto, os resultados do nosso trabalho anterior demonstram que a atividade da DPPIV circulante está associada com piores resultados cardiovasculares em humanos e modelo experimental com IC e demonstra que a inibição da DPPIV em longo prazo atenua o desenvolvimento e/ou a progressão da insuficiência cardíaca nos ratos. No entanto, ainda não foi estabelecido se os inibidores da DPPIV são capazes de reverter a disfunção cardiorrenal em ratos com insuficiência cardíaca estabelecida.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar se a inibição da DPPIV exerce efeitos terapêuticos em ratos com insuficiência cardíaca estabelecida.

Objetivo

2. OBJETIVO

- ✓ Testar a hipótese que a inibição da DPPIV melhora a função cardíaca e renal de ratos com insuficiência cardíaca estabelecida e investigar os possíveis mecanismos envolvidos.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Todos os procedimentos realizados foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo de Pesquisa N° 486/13), de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos Wistar com idade entre três e quatro meses, pesando 250 ± 50 g, comprados no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em gaiolas, sob condições controle de temperatura (22°C), de umidade (60%) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação.

3.2 – Material

Os reagentes químicos utilizados neste estudo foram, em grande parte, adquiridos da empresa Sigma Aldrich.

O inibidor da dipeptidil peptidase IV Vildagliptina foi gentilmente cedido pela empresa Novartis (Basel, Suíça). A Vildagliptina foi administrada por via oral (gavagem) duas vezes ao dia, tendo em vista suas características farmacocinéticas. Fundamentalmente, após a administração oral, a Vildagliptina é absorvida rapidamente atingindo sua concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) em aproximadamente 1 hora. Sua ação enzimática inibitória é atingida após 15 minutos de sua ingestão e aumenta de maneira dose-dependente, atingindo até 95% de inibição, que é mantida por aproximadamente 12 horas [75]. Além disso, a ligação da

Vildagliptina às proteínas plasmáticas é baixa e sua excreção é realizada principalmente pela urina (85%) e o restante pelas fezes. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) é curta ($\sim 2,8h$), porém, devido sua característica de se ligar covalentemente ao sítio catalítico da DPP-4 (Figura 4), provoca inibição prolongada e efetiva [75].

Figura 4. Interação molecular da Vildagliptina com a dipeptidil peptidase IV. (Fonte: Azuma K, et al.2008) [76].

3.3 – Cirurgia de Ablação por Radiofrequência do Ventrículo Esquerdo para Indução de Insuficiência Cardíaca

O modelo mais comumente utilizado em pesquisa experimental para desenvolver a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é a oclusão da artéria coronária interventricular anterior. No entanto, há duas grandes desvantagens neste modelo: a alta taxa de mortalidade pós-oclusão coronária e a discrepante variabilidade no tamanho dos infartos [77].

Recentemente, Antonio e colaboradores desenvolveram um modelo experimental de IC, no qual ratos são submetidos à injúria do miocárdio por meio de

ablação por correntes de radiofrequência no ventrículo esquerdo, que possibilitou a obtenção de infartos com menor variabilidade de tamanho ($45 \pm 8\%$ da circunferência ventricular) (Figura 5), e menor ocorrência de mortalidade imediata (7%) [24]. Tais características justificaram a utilização deste modelo em nosso estudo.

Figura 5. Cortes representativos de corações de ratos Sham e com IC induzida por meio de cirurgia de ablação por radiofrequência do ventrículo esquerdo (VE). (Fonte: Inoue BH, et al.2011) [25].

Para realização do procedimento cirúrgico, os ratos foram submetidos à anestesia com ketamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, em seguida foram colocados em posição de decúbito dorsal e submetidos à tricotomização do tórax no quarto espaço intercostal (Figura 6A). O pericárdio foi aberto e o fórceps posicionado de forma a envolver o coração gentilmente, com o intuito de manter o mesmo na posição desejada (Figura 6B). O cateter responsável por produzir correntes de radiofrequência (1000 kHz; 12 watts) foi então posicionado na parede anterolateral do ventrículo esquerdo, perpendicularmente ao tecido e sob constante pressão manual (Figura 6C). A corrente foi aplicada por 12 segundos. A área atingida foi imediatamente observada pela presença de um disco claro indicando a região de necrose (Figura 6D). Ao término deste procedimento os ratos foram

suturados. Na cirurgia dos ratos Sham o mesmo procedimento foi realizado, porém estes ratos não foram submetidos à radiofrequência e, portanto, não sofreram lesões.

Figura 6. Injúria Miocárdica por Ablação do VE. Sequência de eventos para promoção da injúria miocárdica por meio de radiofrequência do ventrículo esquerdo. A) Exposição do coração após colocação dos afastadores; B) Fixação do coração com a pinça-eletrodo; C) Eletrodo positivo posicionado na área livre do ventrículo esquerdo; D) Área lesionada imediatamente após corrente ablativa (Fonte: Antonio EL, et al. 2008) [24].

3.4 – Grupos Experimentais

Seis semanas após a cirurgia de ablação por radiofrequência do VE ou fictícia, os ratos foram divididos em quatro grupos de acordo com o procedimento cirúrgico e com o tipo de tratamento administrado:

- 1) HF: ratos que foram submetidos à ablação por correntes de radiofrequência no ventrículo esquerdo, com a intenção de induzir insuficiência cardíaca congestiva, tratados com veículo (água) por quatro semanas.
- 2) SHAM: ratos que sofreram os mesmos estresses cirúrgicos que os HF, porém não foram submetidos à injúria do miocárdio propriamente dita ou qualquer outra lesão semelhante.
- 3) HF + IDPPIV 80: ratos submetidos à ablação por radiofrequência no ventrículo esquerdo e tratados por via oral com 80 mg/kg/dia do inibidor da DPPIV (IDPPIV) Vildagliptina, durante quatro semanas.

4) HF + IDPPIV 120: ratos submetidos à ablação por radiofrequência no ventrículo esquerdo e tratados por via oral com 120 mg/kg/dia do inibidor da DPPIV (IDPPIV) Vildagliptina, durante quatro semanas.

3.5 – Desenho Experimental

A Figura 7 ilustra o desenho experimental deste estudo desde a cirurgia de ablação do VE ou cirurgia fictícia, divisão dos grupos, início do tratamento até o término do tratamento, eutanásia dos ratos, e posteriores análises.

Desenho Experimental

Figura 7. Desenho Experimental. A cirurgia de ablação do VE ou cirurgia fictícia foi realizada na semana “zero” (0) em seguida os ratos foram mantidos em gaiolas no biotério do InCor (conforme citado no texto). Seis semanas após a cirurgia, foram realizadas as análises ecocardiográficas e dosagem de BNP circulante para verificar se os ratos atenderam os critérios de inclusão no estudo. Subsequentemente, os ratos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento administrado. No final do estudo os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas para avaliação da função renal, teste oral de tolerância a glicose (TOTG), análise ecocardiográfica e, por fim, foram sacrificados para remoção do sangue e tecidos para posteriores análises biométrica, histológica e molecular.

3.6 – Avaliação Biométrica e Morfométrica

No final dos estudos funcionais cardíacos, foi retirado sangue arterial por punção na aorta abdominal. Os ratos foram sacrificados por decapitação 10 semanas após a cirurgia de ablação do VE.

Após o sacrifício dos ratos, o primeiro órgão a ser removido foi o pulmão direito, o qual foi isolado por ponto com fio de algodão em torno do hilo pulmonar para evitar perdas de fluidos durante a manipulação. Em seguida, o pulmão foi imediatamente pesado em balança analítica obtendo-se assim o peso úmido deste órgão (PU). A fim de se obter o peso seco do pulmão (PS), o órgão foi colocado em estufa a 70°C durante 48 h e, em seguida, pesado novamente em balança analítica. A relação peso úmido e seco do pulmão foi utilizada para estabelecer o teor de água do pulmão, padrão este usado tradicionalmente como marcador de congestão pulmonar e foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\%H_2O = [(PU-PS)/PU] \times 100$$

Em seguida, o coração foi removido, os átrios e vasos da base do coração foram retirados e descartados, enquanto que os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados em balança analítica. O septo interventricular foi considerado como parte do ventrículo esquerdo. O peso total ventricular foi corrigido pelo peso corporal para estimar a hipertrofia cardíaca. Conforme atesta o esquema representativo na Figura 8, realizou-se um corte transversal na região mediana do ventrículo esquerdo, a parte superior correspondente à base do coração foi armazenada a -80°C para ser utilizada nas análises moleculares e a parte inferior

correspondente ao ápice foi fixada em formalina tamponada (10%) por 24h para colorações histopatológicas. A análise histológica foi realizada no miocárdio remanescente. Para este fim, o tecido cardíaco foi processado por técnicas histológicas habituais, embebido em parafina e seccionados em cortes com cinco micrômetros de espessura. As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina (para determinação de volume nuclear da célula) ou *picrosírius red* (para determinação de colágeno intersticial). Um sistema computadorizado de aquisição de imagens (Leica Imaging Systems, Bannockburn, IL, EUA) foi utilizado para as análises.

Figura 8. Representação esquemática da divisão do coração para análises histológicas e moleculares. Após o coração ser removido, os átrios e os vasos da base foram descartados, em seguida os ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) foram separados e imediatamente pesados em balança analítica para obtenção da massa ventricular. O VD não foi utilizado para as análises. O septo foi considerado como parte do VE, o qual foi cortado na região mediana de maneira transversal. A região correspondente ao ápice foi colocada em formol 10% para análises histológicas e a região correspondente à base foi congelada a -80°C para análises moleculares.

Como uma estimativa de hipertrofia dos miócitos, o volume nuclear médio foi determinado em 50-70 cardiomiócitos cortados longitudinalmente. As imagens foram adquiridas em 5 campos randomizados com ampliação de $400\times$ por animal. O volume nuclear foi estimado medindo o diâmetro nuclear mais curto (d) e o diâmetro nuclear mais longo (D) de acordo com a seguinte equação [74, 78, 79].

$$\text{Volume Nuclear} = \pi \times D \times d^2 / 6$$

A fibrose intersticial no miocárdio remanescente foi avaliada como a área ocupada por fibras de colágeno, excluindo a área de cicatriz/ablação e fibras perivasculares. As áreas manchadas de vermelho foram quantificadas como a porcentagem média da área total de cada um dos cinco campos aleatórios com ampliação de $200 \times$ por animal.

3.7 – Imunohistoquímica

Os corações foram colocados em formalina tamponada 10% durante um período de 24 horas. Após esse período, o tecido foi embebido em parafina e cortado em micrótomo com uma espessura de 5 μm . Os tecidos foram desparafinizados em xilol, reidratados em graduações decrescentes de álcool e água. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através de lavagens de 3 minutos em H_2O_2 a 3% (sete vezes à temperatura ambiente) e, em seguida, feita a recuperação antigênica por panela a vapor Pascal em solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 por 50 minutos. As reações inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado 2% durante 20 minutos. Em seguida os tecidos foram incubados com anticorpo primário anti-DPP-IV diluído em solução de BSA 5%. Depois de 18h de incubação a 4°C , os tecidos foram lavados 3 vezes durante 5 minutos com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM, Na_2HPO_4 10 mM e KH_2PO_4 176 mM, pH 7,4) e incubados com anticorpo secundário. Depois de lavados em PBS, os tecidos foram incubados com a solução 2 do kit LSAB HRP Universal contendo o complexo biotina estreptavidina para

amplificação do sinal do anticorpo primário. As reações imunológicas foram detectadas com solução de diaminobenzidina tetrahydroclorida (DAB) por 7 minutos. Inicialmente, o método para detecção da DPPIV por imunohistoquímica foi padronizado em tecido renal de ratos, onde a DPPIV é altamente expressa. A Figura 9 atesta que a marcação para DPPIV foi específica.

Figura 9. Localização da enzima DPPIV por imunohistoquímica em córtex renal de ratos Wistar. Amostras de tecido renal foram processadas de maneira semelhante aos corações, conforme descrito no texto, e incubadas ou não com anticorpo contra DPPIV. O painel da esquerda representa o controle negativo onde não foi adicionado anticorpo primário contra a DPPIV. O painel da direita representa o controle positivo, onde se observa imunomarcação para DPPIV (marrom) na membrana apical do túbulo proximal.

3.8 – Avaliação da Função Cardíaca por Ecodopplercardiograma

As análises ecocardiográficas foram realizadas seis semanas após a cirurgia, juntamente com medidas de BNP circulante, para examinar se os ratos submetidos à lesão miocárdica tinham preenchido os critérios de inclusão, ou seja, se haviam desenvolvido IC. Após quatro semanas de tratamento com Vildagliptina 80 ou 120 mg/kg/dia ou veículo, ou seja, 10 semanas após a cirurgia, as análises ecocardiográficas foram realizadas novamente para avaliar os efeitos do tratamento sobre a função cardíaca dos ratos com IC experimental. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia [80], com adaptação para o modelo de roedor.

Após anestesia com ketamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, a região torácica foi tricotomizada e então os ratos foram colocados em posição supina para a aquisição das imagens. As imagens foram adquiridas por meio do sistema de ultrassom SONOS 5500 (Philips Medical Systems, EUA) que permite a obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos mono e bidimensional, além da velocidade de fluxo por efeito Doppler espectral com transdutor de 14 MHz.

As medidas lineares foram realizadas a partir de imagens bidimensionais obtidas na janela paraesternal, no plano de corte longitudinal (eixo longo), ao nível dos músculos papilares, sendo estas as medidas lineares de espessura de parede posterior na diástole (PPD), septo interventricular na diástole (SIVD), diâmetro diastólico final (DDF) e diâmetro sistólico final (DSF), além dos diâmetros da aorta

(Ao), átrio esquerdo (AE) e o comprimento longitudinal (L) do ventrículo esquerdo em diástole e sístole (VE). A fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEncVE%) foi derivada das medidas de DDF e DSF aplicadas a fórmula:

$$\text{FEncVE} = (\text{DDF} - \text{DSF}) / \text{DDF} * 100$$

As medidas de área foram realizadas a partir de imagens ecocardiográficas da janela paraesternal, no plano de corte transversal (eixo curto), ao nível dos músculos papilares. A partir destas foram realizadas medidas planimétricas das áreas diastólica final (ADF) e sistólica final (ASF) do ventrículo esquerdo (VE). A variação da área fracional (FAC) foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{FAC} = (\text{ADF} - \text{ASF}) / \text{ADF} * 100$$

As medidas de fluxo sanguíneo mitral foram realizadas a partir de imagens bidimensionais obtidas na janela paraesternal, no plano de corte longitudinal (eixo longo) e foram adquiridas com doppler do fluxo sanguíneo abaixo da válvula mitral. A velocidade de fluxo mitral foi estimada através da medida das ondas E e A. Também foram medidos o tempo de desaceleração (TD) e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

Todas as medidas foram realizadas em três ciclos cardíacos representativos de cada animal. A medida final de cada parâmetro foi dada pelas médias dos resultados obtidos a cada ciclo. Todas as imagens ecocardiográficas foram obtidas e analisadas por dois observadores experientes e cegos para os grupos experimentais.

Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo como ratos com insuficiência cardíaca aqueles que após seis semanas de cirurgia de ablação por radiofrequência apresentaram concentração sérica de BNP total maior que 100 pg/mL e área fracional (FAC) inferior a 35%.

Critérios de exclusão:

Foram excluídos do protocolo os ratos que apresentaram lesões que não ultrapassaram o terço apical do ventrículo esquerdo, ou seja, lesões pequenas que provavelmente não progrediriam para a IC, assim como ratos que apresentaram aneurismas, pseudo-aneurismas ou qualquer massa ou nódulo não caracterizado como morfolologicamente normal do coração.

3.9 – Avaliação da Função Renal

A função renal dos quatro grupos experimentais foi avaliada cinco dias antes do término do estudo. Os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas durante 24 horas para coleta de urina. O consumo de água e ração foi monitorado diariamente e este procedimento foi realizado por três dias consecutivos.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- **Fluxo urinário:** o fluxo urinário foi obtido dividindo-se o volume urinário obtido pelo tempo de coleta, e este valor foi corrigido pelo peso do rato. Os resultados foram expressos em ml/dia/kg.

- **Ritmo de filtração glomerular (RFG):** o RFG foi estimado por meio da depuração da creatinina endógena, calculado pela fórmula ($UCr \times V/PCr$), sendo UCr correspondente à concentração urinária de creatinina, V o fluxo urinário e PCr a concentração plasmática de creatinina. As concentrações sérica e urinária de creatinina foram determinadas por um método cinético, utilizando-se um kit colorimétrico da Labtest (Lagoa Santa, MG). Os resultados foram expressos em ml/min/kg.
- **Carga excretada de sódio:** O sódio urinário foi medido pelo analisador de eletrólitos (ABL800 FLEX, Radiometer Copenhagen). Os valores obtidos foram padronizados pelo fluxo urinário e pelo peso corporal dos ratos. Os resultados foram expressos em mEq/dia/kg.

3.10 – Isolamento de proteínas de membrana córtex renal

Após remoção dos rins, a cápsula renal foi retirada, o rim foi cortado ao meio e as regiões correspondentes ao córtex renal foram isoladas e imediatamente transferidas para um frasco contendo tampão PBS gelado (140 mM de cloreto de sódio; 2,8 mM de fosfato de sódio monobásico 7,2 mM de fosfato de sódio dibásico, pH 7,4), inibidores de protease (1 mM de pepstatina, 1 mM de leupeptina e 230 mM de PMSF) e inibidores de fosfatase (50 mM de fluoreto de sódio e 15 mM de pirofosfato de sódio). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com o homogeneizador Polymix® PX-SR 50E (Kinematica, AG, Suíça). Para isolar as frações de proteínas de membrana de córtex renal, o homogenato foi centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e submetido a centrifugação a 28.000 rpm durante 90 min a 4°C para sedimentar a fração

enriquecida em proteínas de membrana. O “pellet” final obtido foi ressuspenso em tampão PBS, aliquoteado em tubos para microcentrífuga e acondicionado em -80°C.

3.11 – Isolamento de proteínas de coração

A região do coração correspondente ao septo + ventrículo esquerdo (desprezando a região lesionada) foi homogeneizada com o homogeneizador Polymix PX-SR 50E (Kinematica, AG, Suíça) em um tampão PBS gelado (140 mM de cloreto de sódio; 2,8 mM de fosfato de sódio monobásico 7,2 mM de fosfato de sódio dibásico, pH 7,4), inibidores de protease (1 mM de pepstatina, 1 mM de leupeptina e 230 mM de PMSF) e inibidores de fosfatase (50 mM de fluoreto de sódio e 15 mM de pirofosfato de sódio), mais inibidor de fosfatase “Cocktail 2” (diluição 1:300). O homogenato foi então aliquoteado em tubos para microcentrífuga. Para isolar as frações de proteínas de membrana de coração, o homogeneizado foi centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e submetido a centrifugação a 28.000 rpm durante 90 min a 4°C para sedimentar a fração enriquecida em proteínas de membrana. O “pellet” final obtido foi ressuspenso em tampão PBS, aliquoteado em tubos para microcentrífuga e acondicionado em -80°C.

3.12 – Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em tecido cardíaco e renal foi determinada pelo método de Lowry [81]. O método consiste na adição de hidróxido de sódio, de carbonato de cálcio, de sulfato de cobre e de tartarato de sódio a uma mistura contendo proteínas. Adiciona-se ainda Folin-fenol Ciocalteau no qual há um

constituente ativo que sofre redução quando reage com proteínas na presença do cobre em solução alcalina produzindo um complexo de coloração azul com absorbância máxima em 750 nm.

3.13 – Determinação da atividade da DPPIV

A atividade da enzima DPPIV foi medida colorimetricamente em plasma, rim e coração por meio da liberação de nitroanilina, resultante da hidrólise do composto tosilato de glicil-prolil-p-nitroanilida. O método consiste na adição de 15 µL de soro ou tecido homogeneizado em 185 µL de tampão Tris HCL (10 mM pH 7.6) contendo 4 mM do substrato da DPPIV glicil-prolil-p-nitroanilida (Bachem), leva-se ao banho-maria 37°C por 1 hora. Em seguida, adiciona-se 500 µL de tampão acetato (1 mmol/L pH 4.2) para parar a reação. A liberação enzimática da p-nitroanilina foi determinada em espectrofotômetro com absorbância em 405 nm. A atividade enzimática foi expressa como densidade óptica do plasma (DO/ml) ou DO/mg de proteína.

3.14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

As proteínas foram solubilizadas em 50 µL de tampão de amostra SDS (SDS a 2%, 10% de glicerol, 0,1% de azul de bromofenol, 50 mM de Tris-HCL, pH 6,8), em seguida as amostras foram aplicadas no gel imerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,4; glicina 192 mM) e submetidas a SDS - PAGE utilizando 7,5 ou 10% de gel de poliacrilamida. Um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope, Bio-Rad) foi adicionado ao gel para estimar a massa das

proteínas. A corrida foi interrompida de acordo com o tamanho das proteínas de interesse, tomando como base o padrão de massa molecular.

3.15 – “immunoblotting”

Após SDS-PAGE, as proteínas contidas no gel foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). Antes disso as membranas foram tratadas com metanol 100% por 2 minutos e equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, metanol 20%) por pelo menos 5 minutos. Utilizamos um sistema tipo sanduíche (GE Healthcare, TE62 - Piscataway, NJ) submerso em tampão de transferência, onde aplicamos uma voltagem de 350 mA overnight a 4°C. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau (Ponceau S – Sigma - 0,1%; ácido acético 10%). Em seguida, as membranas de PVDF contendo as proteínas transferidas são incubadas em primeiro lugar em solução de bloqueio (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; leite em pó desnatado 5%, Tween20 0,1% ou albumina de soro bovino (BSA) 150 mM NaCl; 50 mM Tris-base; BSA 5%, Tween20 0,1%) durante 1 hora para bloquear ligações inespecíficas de anticorpos, seguido de incubação overnight a 4°C com anticorpo primário conforme Tabela 2. As membranas de PVDF foram, em seguida, lavadas durante 10 minutos cinco vezes em solução de bloqueio e incubadas durante 1 hora com um anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado [goat anti-mouse ou goat anti-rabbit da Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA)] diluído 1:2000 em solução de bloqueio. Após lavagem (5X) em solução de bloqueio e (2X) em PBS ou TBS um reagente para detecção de quimioluminescência aumentada (ECL) foi usado

para visualização de anticorpos ligados. As bandas foram visualizadas por meio de um fotodocumentador (GE Healthcare) e as imagens digitalizadas pelo software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Para quantificação das bandas por densitometria utilizamos o software Image J (Scion).

Tabela 2. Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de “immunoblotting”.

Anticorpo	Empresa	Diluição (v/v)	Solução de Bloqueio
DPPIV (clone 5E8)	Santa CruzBiotechnology	1:1000	Leite
GLP-1R	Santa CruzBiotechnology	1:500	Leite
Colágeno tipo 1	Abcam	1:5000	Leite
NHE3 (clone 3H3)	Dr. Peter Aronson Yale Univerity	1:500	Leite
NHE3 - pS552 (clone 14D5)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Leite
Actina (clone JLA20)	Merck	1:50000	Leite
pSer/Thr PKA	Cell Signaling Technology	1:2000	BSA
HRP-cabra-anti Camundongo IgG	Life Technologies Corporation	1:2000	-
HRP-cabra-anti Camundongo IgM	Life Technologies Corporation	1:2000	-
HRP-cabra-anti Coelho IgG	Life Technologies Corporation	1:2000	-

3.16 – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

3.16.1 – Extração de RNA total

A extração e a preparação do RNA total de amostras de coração dos ratos compreenderam quatro fases:

1) 100 mg de tecido cardíaco armazenado congelado em freezers -80°C foram transferidos para um tubo de 50 ml (Falcon) e homogeneizados com 1 ml de TRIzol® (Gibco/BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA) por aproximadamente 30 segundos no gelo;

2) Depois de homogeneizadas, as amostras foram colocadas em tubos de 1,5 ml (Eppendorf) e receberam 200 µl de clorofórmio, sendo vigorosamente misturadas. Estas, então, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C para que o RNA total fosse separado do DNA e das proteínas. A fase aquosa superior que continha o RNA total foi retirada e transferida para um novo tubo de 1,5 ml previamente identificado;

3) Para a precipitação do RNA foi adicionado a cada tubo 500 µl de isopropanol que, em seguida, foram invertidos suavemente, para serem centrifugados a 10.000 rpm por 45 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram lavadas com 1 ml de etanol 75% gelado diluído em água isenta de RNase, sendo novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e os tubos foram invertidos e colocados para secar a 4°C;

4) Depois de seco, o RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em 150 µl de água tratada com DEPC, sua concentração foi determinada a partir da medida de absorbância a 260 nm em

espectrofotômetro (ND-1000 spectrophotometer - NanoDrop Technologies, Inc.). As soluções de RNA foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até o uso.

A integridade das amostras de RNA foi verificada através da eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Apenas as preparações íntegras e sem indício de degradação, como falta de integridade das bandas 28S RNAr e 18S RNAr e diminuição da razão de fluorescência das bandas ribossomais 28S RNAr/18S RNAr (razão para o RNA intacto igual aproximadamente a 2), foram utilizadas na etapa subsequente.

3.16.2 – Transcrição do DNA complementar

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 5 µg de RNA total. Amostras de RNA foram incubadas com 1,5 µl água isenta de RNases; 4,0 µl 5X First Strand Buffer (concentração final de 1X); 1,0 µl DTT (concentração final de 0,01M); 1,0 µl dNTP (concentração final de 0,5 mM); 1,0 µl de Oligo-dT (concentração final de 0,025 mM); 0,5 µl de RNasin (concentração final de 1U/µl) e 1,0 µl da enzima SuperScriptase reversa (concentração final de 10U/µL) para cada amostra. Incubou-se estas amostras a 50°C por 2 horas, e, em seguida, as mesmas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. Ao final da reação obteve-se um estoque de cDNA na concentração de 250 ng/µl. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

3.16.3 – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A reação de qRT-PCR foi realizada com auxílio do aparelho ABI Prism® 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA).

A amplificação consistiu em: 95°C por 10 minutos para a ativação da AmpliTaq DNA Polymerase, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos

(desnaturação) e 60°C por 60 segundos (associação do primer e extensão). A coleta do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo. Para excluir a possibilidade de contaminação, foi realizado um controle negativo para cada gene que consistiu em uma reação com ausência de cDNA.

Os primers oligonucleotídicos utilizados para detectar DPPIV, BNP e os controles internos GAPDH, beta actina, ciclofilina e 28S são mostrados na Tabela 3. A ciclofilina foi utilizada como melhor normalizador. O método comparativo “cycle threshold” (CT) foi utilizado para as análises de dados. Todas as reações foram processadas em triplicata.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA
GAPDH	S - ATG GTG AAG GTC GGT GTG AS - GAA CTT GCC GTG GGT AGA G
ACTb	S - CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC AS - GCC ACC AAT CCA CAC AGA
Cyclo	S - AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA AS - CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA
28S	S - TCA TCA GAC CCC AGA AAA GG AS - GAT TCG GCA GGT GAG TTG TT
DPPIV	S - CCAACTCCAGAGGACAACCT AS - TCTTCGTCCGTGTACCACAT
Nppb	S - GATTCTGCTCCTGCTTTTCC AS - TCTTTTGTAGGGCCTTGGTC

GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; ACTb, beta actina; Cyclo, Ciclofilina; 28S, RNA ribossomal 28S; DPPIV, Dipeptidil peptidase IV; Nppb, Peptídeo natriurético Cerebral (BNP); S, Sense; AS, Antisense.

3.17 – Determinação das concentrações plasmáticas de GLP-1, insulina e BNP

total

O GLP-1 foi medido no estado de jejum (8h) e cinco minutos após uma carga oral de glicose (2g/kg de peso corporal). Os ratos foram anestesiados com isoflurano em concentrações entre 1 a 3% e o sangue foi retirado do plexo retro-orbital, por meio de um capilar de vidro. Uma vez coletado, o sangue foi imediatamente transferido para tubos contendo EDTA (1 mg/ml) e 10 µM P32/98, inibidor da enzima DPPIV (Abcam, Cambridge, MA), com a finalidade evitar a degradação do

GLP-1. Amostras de sangue retiradas de ratos em jejum foram também utilizadas para medir os níveis séricos de insulina e BNP total.

Os níveis circulantes de BNP total, foram determinados em dois momentos, após seis da cirurgia de ablação do VE para examinar se ratos submetidos à lesão miocárdica tinham preenchidos os critérios de inclusão no grupo HF e após dez semanas da cirurgia para avaliar os efeitos do tratamento com Vildagliptina sobre os níveis circulantes deste peptídeo. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 RPM a 4°C durante 10 min. As amostras de soro foram aliquotadas em tubos de microcentrífuga e armazenadas a -80°C. O método utilizado para determinar as concentrações de GLP-1 ativo (7-36) (Millipore, Billerica, MA), insulina (Millipore) e BNP total (Bachem, Torrance, CA) foi o ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.18 – Teste Oral de Tolerância à Glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado 9 semanas após a ablação por radiofrequência ou cirurgia fictícia. Os ratos foram expostos a condição de jejum, durante oito horas, pesados, e em seguida, os ratos foram submetidos ao TOTG. As amostras de sangue foram obtidas da veia da cauda dos ratos conscientes em jejum ($t = 0$) e após carga oral de glicose (2g/kg de peso corporal) nos tempos ($t = 15, 30, 60, 90, \text{ e } 120$ minutos). A concentração de glicose no sangue foi imediatamente medida com o medidor Accu-Chek Performa® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e os dados foram quantificados através do cálculo da área sob a curva (AUC 0-120 min).

3.19 – Análise Estatística

Todos os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média com o n indicando o número de amostras. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 – Efeitos da Vildagliptina sobre a função cardíaca de ratos com IC

As análises ecocardiográficas foram realizadas seis semanas após a cirurgia, juntamente com medidas de BNP circulante, para examinar se ratos submetidos à lesão miocárdica tinham preenchido os critérios de inclusão, ou seja, se haviam desenvolvido IC. Com base nos critérios de inclusão, ratos HF que apresentaram área fracional (FAC) $> 40\%$ e BNP < 100 pg/ml foram excluídos do estudo. Como mostrado na Figura 10, seis semanas após a cirurgia, os ratos submetidos à ablação do VE por radiofrequência para induzir IC exibiram inferior área fracional (FAC) (Figura 10A, painel da esquerda), menor fração de encurtamento do VE (LVSF) (Figura 10B, painel da esquerda) e maior tempo de relaxamento isovolúmico (TRIV) (Figura 10C, painel da esquerda) em comparação com ratos Sham.

Análises ecocardiográficas foram realizadas novamente quatro semanas após o tratamento com o inibidor da DPP-IV Vildagliptina nas doses 80 ou 120 mg/dia ou veículo, ou seja, 10 semanas após a cirurgia, para avaliar os efeitos desta droga sobre a função cardíaca de ratos com IC. A FAC é considerada uma variável com boa correlação com a função ventricular, pois expressa o percentual de variação entre as áreas diastólica e sistólica finais do ventrículo esquerdo. Como observado na Figura 10A, os ratos com IC tratados com veículo apresentaram inferior FAC ao final do estudo (Figura 10A, painel da direita), em comparação com o obtido seis semanas após cirurgia (Figura 10A, painel da esquerda) ($37,6 \pm 2,0$ vs $30,6 \pm 2,3\%$, $P < 0,05$). No final do protocolo, os ratos HF tratados com Vildagliptina, nas duas doses examinadas, apresentaram FAC menores do que os ratos Sham, porém maiores do

que os ratos HF tratados com veículo. Por outro lado, o tratamento com Vildagliptina 120 mg/kg/dia foi eficaz em aumentar significativamente a FAC ao final do tratamento em comparação ao valor obtido antes do início do tratamento, ou seja, seis semanas após a cirurgia ($45,2 \pm 2,6$ vs $34,2 \pm 4,7\%$ $P < 0,05$), o que sugere que a inibição da DPPIV foi eficaz em reverter a redução da FAC (10 semanas vs 6 semanas) melhorando este parâmetro de função sistólica. A Figura 10B mostra que os ratos HF 6 semanas após a cirurgia apresentaram diminuição da fração de encurtamento do VE em comparação ao grupo Sham (Figura 10B, painel da esquerda).

A fração de encurtamento do VE, representada pela sigla em inglês “LVSF” é sabidamente conhecida como uma medida que possibilita a avaliação da função ventricular sistólica esquerda, onde sua diminuição representa uma descompensação do VE com sobrecarga de pressão e/ou volume. Como mostra o painel direito da Figura 10B, ao fim do tratamento com Vildagliptina 120 mg/kg/dia houve aumento da LVSF em comparação ao grupo HF.

Além disso, analisamos também o TRIV que analisa basicamente a fase de relaxamento do miocárdio e, permite a avaliação indireta da função diastólica. Enquanto que a dose mais baixa de Vildagliptina não afetou o TRIV, a dose mais elevada do inibidor da DPPIV foi capaz de normalizar este parâmetro de função diastólica (Figura 10C).

Como podemos observar na Figura 11A, as medidas de BNP circulante, realizadas seis semanas após a cirurgia, mostra que os ratos submetidos a injúria miocárdica tiveram níveis de BNP maiores em comparação ao grupo Sham. Por

outro lado, a administração de Vildagliptina em ratos HF, reduziu os níveis de BNP circulante (Figura 11B) e os níveis de expressão gênica do BNP (Figura 11C).

Figura 10. Avaliação da função cardíaca em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. As análises ecocardiográficas foram realizadas em dois momentos, seis e dez semanas após a cirurgia de ablação do ventrículo esquerdo por radiofrequência ou cirurgia fictícia (Sham). Seis semanas após a cirurgia, os ratos HF foram tratados com 80 mg/kg/dia (HF + VIL 80, $n = 12$) ou 120 mg/kg/dia (HF + VIL 120, $n = 14$) de Vildagliptina ou veículo (HF, $n = 11$). Os ratos Sham não foram tratados ($n = 24$). (A) Variação da área fracional entre a sístole e a diástole no ventrículo esquerdo seis e dez semanas após a cirurgia, representada pela sigla em inglês (FAC – *Fractional Area Change*). (B) Tempo de relaxamento Isovolumétrico (TRIV). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs. Sham. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ vs. HF.

Figura 11. Níveis circulantes e expressão gênica do BNP no coração de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Para dosagem dos níveis circulantes de BNP, o sangue foi coletado pelo plexo retro-orbital dos quatro grupos experimentais seis (A) e dez semanas após a cirurgia de ablação do VE por radiofrequência (B). Os níveis de RNA mensageiro para BNP no coração foram determinados por PCR em tempo real (*Real-time PCR*) (C). Ciclofilina foi utilizada como controle interno. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos/grupo. *** $P < 0,001$ vs. Sham. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. HF.

4.2 – Efeitos da Vildagliptina sobre parâmetros biométricos de ratos com IC

Os parâmetros biométricos dos quatro grupos experimentais estão representados na Tabela 4. A média do peso corporal, no final do estudo foi semelhante em todos os grupos de ratos. Ratos com IC tratados com veículo apresentaram maior peso do coração em proporção ao peso corporal em comparação com Sham e o tratamento com Vildagliptina atenuou este aumento, sugerindo que a inibição da DPPIV possa exercer um efeito anti-hipertrófico. Não foram observadas diferenças na relação peso coração/peso corporal entre os dois grupos de ratos com IC tratados com as diferentes doses de Vildagliptina. Ratos HF apresentaram maior índice peso pulmonar/peso corporal e teor de água do pulmão em comparação com Sham, sugerindo que estes ratos apresentaram congestão pulmonar dez semanas após a cirurgia de ablação. O tratamento com ambas as doses de Vildagliptina normalizou o índice peso pulmonar/peso corporal e teor de água do pulmão. Não foram observadas diferenças no teor de água do fígado entre os quatro grupos experimentais.

Tabela 4. Parâmetros biométricos em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina.

	SHAM (n = 24)	HF (n = 11)	HF + VIL 80 (n = 12)	HF + VIL 120 (n = 14)
Peso Corporal 6 Semanas (g)	218 ± 7	225 ± 8	243 ± 9	232 ± 11
Peso Corporal 10 Semanas (g)	423 ± 10	439 ± 11	439 ± 12	469 ± 8
Peso ventricular/Peso Corporal (mg/g)	2,55 ± 0,02	3,01 ± 0,08***	2,71 ± 0,04##	2,72 ± 0,05##
Pulmão/Peso Corporal (mg/g)	3,05 ± 0,07	3,56 ± 0,17*	3,10 ± 0,13	3,03 ± 0,08#
Teor de Água no Pulmão (%)	78,9 ± 0,12	80,2 ± 0,2***	79,1 ± 0,2##	78,8 ± 0,1###
Teor de Água no Fígado (%)	69,42 ± 0,18	69,77 ± 0,65	69,97 ± 0,77	69,56 ± 0,35

Os valores estão expressos como media ± EPM. *P < 0,05, e ***P < 0,001 vs Sham. #P < 0,05, ##P < 0,01 e ###P < 0,001 vs HF.

4.3 – Efeitos da Vildagliptina sobre a atividade, expressão protéica e gênica da DPPIV

A atividade da DPPIV circulante, cardíaca e renal dos quatro grupos experimentais é mostrada na Figura 12. Nota-se que os ratos HF apresentaram atividade mais elevada da DPPIV no soro (Figura 12A), no coração (Figura 12B), mas não nos rins (Figura 12C) em comparação com os ratos Sham. Por sua vez, o tratamento com Vildagliptina inibiu a atividade da DPPIV de maneira dose-dependente no soro (VIL 80: ~ 60% e VIL 120: ~ 70%) e no coração (VIL 80: ~ 45% e VIL 120: ~ 65%) em comparação com os ratos HF, mas não afetou a atividade da peptidase nos rins.

Como pode ser observado na Figura 13, a expressão relativa da DPPIV apresentou um padrão semelhante à atividade enzimática e foi aumentada no soro (Figura 13A) e coração (Figura 13B), e manteve-se inalterada nos rins (Figura 13C) de ratos HF em comparação com ratos Sham. O tratamento com Vildagliptina reduziu a abundância da DPPIV no soro e coração, mas não alterou a expressão da DPPIV nos rins. A Figura 14 mostra que o aumento da expressão da DPPIV no coração ocorre em células endoteliais cardíacas e no pericárdio.

Avaliamos a seguir se o aumento da expressão protéica da DPPIV era acompanhada por um aumento da expressão gênica desta enzima no coração. Para tanto, a expressão gênica relativa da DPPIV foi avaliada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time RT PCR). Como pode ser observado na Figura 15, a expressão gênica da DPPIV foi significativamente maior em ratos HF comparado com ratos Sham. Enquanto que a expressão gênica da DPPIV apresentou-se significativamente reduzida em ratos tratados com Vildagliptina

Figura 12. Atividade da DPPIV no soro, coração e rim dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Atividade da DPPIV foi mensurada colorimetricamente no (A) Soro, (B) Coração e (C) córtex renal por meio da liberação de nitroanilina, resultante da hidrólise do composto tosilato de glicil-prolil-p-nitroanilida. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. Sham. ##P < 0,01 e ###P < 0,001 vs. HF.

Figura 13. Abundância da DPPIV no soro, coração e rim dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. (A) Abundância da DPPIV no soro. Volume equivalente de amostra de soro (0.5 μ L) de cada animal foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferido para membrana de PVDF e incubado com um anticorpo monoclonal contra DPPIV. As membranas foram coradas com Ponceau S antes da incubação com o anticorpo e a albumina foi usada como controle interno. Expressão da DPPIV no (B) coração e (C) córtex renal. Quantidade equivalente de proteína (40 μ g no coração e 20 μ g no rim para DPPIV e 5 μ g para actina) foram submetidas a SDS-PAGE, transferida para membrana de PVDF e incubado com os seguintes anticorpos primários: anti-DPPIV (1:1000) e anti-actina (1:50000). Actina foi usada como controle interno. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. ***P < 0,001 vs. Sham. ##P < 0,01 e ###P < 0,001 vs. HF.

Figura 14. Avaliação da distribuição da DPPIV no coração dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Imagens representativas de secções do coração marcadas com um anticorpo contra DPPIV. Para análise imunohistoquímica, os tecidos foram incubados com anticorpo primário anti-DPPIV diluído em solução de BSA 5%. Depois de 18h de incubação a 4°C, os tecidos foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário goat anti-mouse. As reações imunológicas foram detectadas com solução de diaminobenzidina tetrahidroclorida (DAB). Microfotografias representativas (Visualizado com amplificação de 400x a partir da imagem original).

Figura 15. Avaliação da expressão gênica da DPPIV no coração dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Os níveis de RNA mensageiro para DPPIV no coração foram determinados por PCR em tempo real (*Real-time PCR*). Ciclofilina foi utilizada como controle interno. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos/grupo. ** $P < 0,01$ vs. Sham. ### $P < 0,001$ vs. HF.

4.4 – Efeitos do tratamento com Vildagliptina sobre o remodelamento cardíaco

Após determinarmos que o tratamento com Vildagliptina reduz a atividade e expressão da DPPIV no soro e coração, melhora parâmetros de função cardíaca, reduz congestão pulmonar, avaliamos os efeitos da inibição da DPPIV sobre o remodelamento cardíaco de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Para este fim, nosso próximo passo foi medir o volume nuclear dos cardiomiócitos, como estimativa de hipertrofia miocárdica (Figura 16) e quantificar a deposição de fibrose intersticial no miocárdio remanescente através da área ocupada por fibras de colágeno (Figura 17). A análise histológica com hematoxilina-eosina demonstrou que o volume nuclear dos cardiomiócitos dos ratos com IC foram significativamente maiores do que os Sham (182 ± 4 vs $110 \pm 3 \mu\text{m}^3$, $P < 0,001$) e o tratamento com Vildagliptina atenuou este aumento (Figura 16). Além disso, a coloração com picrossírius red revelou que os ratos HF apresentam maior percentual de colágeno intersticial no miocárdio em comparação com ratos Sham ($3,8 \pm 0,5$ vs $1,6 \pm 0,4\%$, $p < 0,001$). Em consonância com a redução da proporção do peso do coração/peso corporal mostrado na Tabela 4, a Vildagliptina reduziu a deposição de colágeno intersticial no coração dos ratos com IC estabelecida (Figura 17), sugerindo que a inibição da DPPIV é capaz de exercer efeito anti-fibrótico no miocárdio. Além disso, verificamos também os níveis de expressão de colágeno tipo 1 no coração desses ratos, por meio da técnica de “immunoblotting” e, como atesta a Figura 18, os ratos HF apresentaram um aumento na abundância dessa proteína em comparação com ratos Sham, o que foi reduzido significativamente através do tratamento com Vildagliptina.

Figura 16. Efeitos da Vildagliptina sobre a hipertrofia cardíaca. Hipertrofia miocárdica foi acessada pela medida do volume nuclear do miócito em secções do coração coradas com hematoxilina e eosina (Visualizado com amplificação de 400x a partir da imagem original). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. Sham. ### $P < 0,001$ vs. HF.

Figura 17. Efeitos da Vildagliptina sobre a fibrose miocárdica. A fibrose cardíaca foi avaliada pela deposição de colágeno intersticial em secções do coração coradas com Picrosirius Red (Visualizado com amplificação de 400x a partir da imagem original). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $P < 0,001$ vs. Sham. ### $P < 0,001$ vs. HF.

Figura 18. Avaliação da expressão do colágeno tipo 1 no coração dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Quantidade equivalente de proteína (100 μ g para colágeno tipo 1 e 5 μ g para actina) foram submetidas a SDS-PAGE, transferida para membrana de PVDF e incubado com os seguintes anticorpos primários: anti-colágeno tipo 1 (1:5000) e anti-actina (1:50000). Actina foi usada como controle interno. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $P < 0,001$ vs. Sham. # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ vs. HF.

4.5 – Efeitos da Vildagliptina sobre a homeostase da glicose em ratos com IC

Conforme já mencionado anteriormente, a DPPIV é uma enzima responsável pela inativação de diversos peptídeos, entre os mais importantes destaca-se o GLP-1. O GLP-1 desempenha um papel importante na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 e suas ações, entre outras, incluem estimulação da secreção de insulina e inibição da secreção de glucagon. Sabendo da importância da DPPIV/GLP-1 para a homeostase glicêmica fomos avaliar o perfil glicêmico dos quatro grupos experimentais.

De acordo com os experimentos de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) vimos que os níveis de glicose em jejum não diferiram entre os quatro grupos de ratos, indicando que os ratos não apresentavam hiperglicemia sob estado de jejum (Figura 21A). Já a Figura 21B ilustra a resposta de glicose no plasma dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina ao longo do tempo (0, 15, 30, 60, 90, e 120 minutos) no TOTG após a administração oral de 2 mg/kg de glicose. Como ilustrado na Figura 21C, os ratos HF apresentaram um aumento da resposta à glicose em comparação com ratos Sham e o tratamento com ambas as doses estudadas de Vildagliptina foram capazes de normalizar a resposta à glicose no plasma em ratos HF. A Figura 21D mostra que os ratos HF tratados com veículo tiveram aumento da concentração de insulina no soro sob o estado de jejum. Por outro lado, o tratamento com Vildagliptina 80 ou 120 mg/dia restaurou completamente os níveis de insulina no soro em ratos com IC.

Figura 19. Homeostase glicêmica de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Os ratos foram expostos a condição de jejum por oito horas e submetidos ao teste oral de tolerância a glicose (TOTG). O sangue foi retirado da cauda dos ratos conscientes e a glicose foi mensurada nos seguintes intervalos de tempo: 0, 15, 30, 60, 90, e 120 minutos após carga oral de glicose (2g/kg de peso corporal). (A) Níveis de glicose em jejum. (B) Resposta plasmática à glicose ao longo do tempo. (C) Área sobre a curva (*Area under the curve* - AUC). (D) Concentração sérica de insulina em jejum. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. $n = 6$ ratos/grupo, exceto Sham, $n = 8$. ** $P < 0,01$ vs. Sham.

4.6 – Efeitos da Vildagliptina sobre os níveis circulante de GLP-1 e de expressão do receptor de GLP-1 (GLP-1R) no coração e rim

Uma vez que relatamos que a atividade e abundância da DPPIV se encontram aumentadas no plasma e coração de ratos com IC, também avaliamos os níveis circulantes de GLP-1 ativo e total no estado de jejum e pós-prandial. Este experimento foi realizado para obtermos mais conhecimentos se o GLP-1, principal substrato da DPPIV, foi afetado pelo aumento da atividade desta enzima. Os níveis de GLP-1 ativo e total foram examinados em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina em jejum ($t = 0$) e após sobrecarga de glicose ($t = 5$) (Figura 19). Este experimento foi realizado em ratos Sham, HF e HF tratados somente com a dose mais alta de Vildagliptina. Conforme representado na Figura 19A e 19C, no estado de jejum ($t = 0$) os ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina não apresentaram diferenças estatisticamente significantes nos níveis de GLP-1 ativo e total. Depois de uma carga oral de glicose ($t = 5$ min), os níveis de GLP-1 ativo e total foram mais elevados nos ratos Sham e HF tratados com Vildagliptina, e a porcentagem de aumento nos níveis de GLP-1 foi significativamente maior nesses animais quando comparados ao grupo HF (Figura 19A-D). Os dados representados na Figura 19 sugerem que ratos com IC exibem não só níveis mais baixos de GLP-1 ativo e total, mas uma resposta mais baixa da secreção de GLP-1 dependente de glicose. Além disso, os resultados representados na Figura 19 também sugerem que a inibição da DPPIV com Vildagliptina melhora a biodisponibilidade e a secreção de GLP-1 após carga oral de glicose.

Em seguida, nosso próximo objetivo foi avaliar os níveis de expressão do receptor de GLP-1 (GLP-1R) no coração e no rim dos ratos Sham e HF tratados ou

não com Vildagliptina. Como representado na Figura 20A a expressão do receptor de GLP-1 foi mais elevada em ratos HF do que nos ratos Sham ($P < 0,01$), o que pode refletir uma resposta adaptativa. Enquanto que o tratamento com Vildagliptina normalizou os níveis de GLP-1R no coração de ratos com IC estabelecida. Em seguida, analisamos o padrão de expressão protéica do GLP-1R em córtex renal dos quatro grupos experimentais. Na Figura 20B, observa-se que a expressão de GLP-1R no córtex renal permaneceu inalterada em ratos com IC tratados com veículo. Curiosamente, o tratamento com a dose mais elevada de Vildagliptina aumentou a expressão de GLP-1R em córtex renal, em comparação aos ratos com IC tratados com veículo.

Figura 20. Níveis circulantes de GLP-1 ativo e total em ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Os ratos foram expostos a condição de jejum por oito horas e submetidos a uma carga oral de glicose. O sangue foi retirado do plexo retro-orbital no estado de jejum (t = 0) e após uma carga oral de glicose de 2g/kg de peso (t = 5). (A) Níveis circulantes de GLP-1 ativo em jejum (t = 0) e pós-prandial (t = 5). (B) Porcentagem de aumento dos níveis de GLP-1 ativo. (C) Níveis circulantes de GLP-1 total em jejum (t = 0) e pós-prandial (t = 5). (D) Porcentagem de aumento dos níveis de GLP-1 total. (E) Razão do GLP-1 ativo pelo GLP-1 total em jejum (t = 0) e (F) pós-prandial (t=5). Os valores estão expressos como média ± EPM. n = 7 ratos/grupo, exceto Sham, n = 5. *P < 0,05 vs. HF. ###P < 0,001 vs. HF. \$P < 0,05 vs. Sham.

Figura 21. Expressão protéica do GLP-1R no coração e rim de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. (A) Expressão protéica do GLP-1R no coração e (B) córtex renal. Quantidades equivalente de proteína (30 μ g no coração e 20 μ g no rim para GLP-1R e 5 μ g para actina) foram submetidas a SDS-PAGE, transferida para membrana de PVDF e incubado com os seguintes anticorpos primários: anti-GLP-1R (1:500) e anti-actina (1:50,000). Actina foi usada como controle interno. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. **P < 0,01 vs. Sham. #P < 0,05 e ##P < 0,01 vs HF.

4.7 – Efeitos da Vildagliptina sobre a função renal de ratos com IC

Em seguida, visando avaliar a função renal dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas por 24 horas durante três dias consecutivos, para monitorar o consumo de água e ração e coletar amostras de urina. Dos parâmetros de função renal apresentados na Figura 22, houve diminuição significativa no fluxo urinário (Figura 22A), na carga excretada de sódio (Figura 22B), bem como no ritmo de filtração glomerular (RFG) estimado pelo clearance da creatinina (Figura 22C) nos ratos HF tratados com veículo em comparação com ratos Sham. Em ratos HF tratados com a dose mais elevada de Vildagliptina a função renal foi completamente restaurada, no entanto, não houve melhora significativa nos ratos HF que receberam 80 mg/kg/dia deste inibidor da DPPIV. Não houve diferença estatisticamente significante no consumo de água e ração quando se compara os quatro grupos de ratos (dados não apresentados), sugerindo que os ratos HF tratados com o veículo ou 80 mg de Vildagliptina estavam num estado de expansão de volume.

Figura 22. Função renal de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Os ratos Sham e HF tratados com Vildagliptina ou veículo foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas durante 24 horas por 3 dias consecutivos para avaliar (A) Fluxo urinário, (B) Na⁺ Urinário e (C) Ritmo de filtração glomerular (RFG). Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. Sham. #P < 0,05, ##P < 0,01 e ###P < 0,001 vs. HF.

4.8 – Efeitos da Vildagliptina sobre atividade da PKA em córtex renal de ratos com IC

Está bem descrito que a ligação do GLP-1 em seu receptor (GLP-1R) estimula a via de sinalização do AMPc/PKA[39]. Conforme mencionado acima, o tratamento com Vildagliptina aumentou de maneira dose-dependente a expressão do GLP-1R no córtex renal de ratos com IC. Desta forma, nosso próximo objetivo foi examinar se inibição DPPIV aumenta a atividade da PKA no córtex renal de ratos com IC. Para tal, experimentos de “immunoblotting” foram realizados para avaliar os substratos de PKA fosforilados em Serina e Treonina em amostras de córtex renal dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Como ilustrado na Figura 23, pode-se observar que o nível de substratos fosforilados por PKA no córtex renal de ratos HF é significativamente menor do que no grupo Sham e o tratamento com ambas as doses utilizadas de Vildagliptina restaurou a atividade da PKA.

Figura 23. Atividade da PKA em córtex renal dos ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Níveis de substratos fosforilados por PKA em córtex renal dos ratos Sham, HF e HF tratados com 80 ou 120 mg/kg/dia foram avaliados por “immunoblotting” usando um anticorpo que reconhece proteínas contendo Serina e/ou threonina fosforilada (*phospho-Ser/Thr*). *Painel superior:* Quantidades equivalentes de proteína (15 µg) de cada animal foi submetida à SDS-PAGE, transferida para membrana de PVDF e incubada com anticorpo anti-pSer/Thr (1:2000). Actina foi usada como controle interno. *Painel inferior:* A soma total de todas as proteínas fosforiladas por PKA de cada grupo foi estimada por densitometria e normalizada pela actina. Os valores estão expressos como média ± EPM. *P < 0,05 vs. Sham. ##P < 0,01 e ###P < 0,001 vs. HF.

4.9 – Efeitos da Vildagliptina sobre a expressão total do NHE3 e sobre os níveis de fosforilação da serina 552 deste transportador em córtex renal de ratos com IC

Considerando a importância do NHE3 na mediação da reabsorção de sódio em túbulo proximal renal avaliamos se a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal poderia estar aumentada, contribuindo, potencialmente, para a expansão do volume extracelular e, em última instância, para a formação de edema. Conforme mostrado na Figura 24A, os níveis de expressão do NHE3 em córtex renal não variaram entre os quatro grupos experimentais. Os níveis de fosforilação do NHE3 foram obtidos usando um anticorpo monoclonal fosfoespecífico que reconhece o NHE3 somente quando ele está fosforilado na serina 552. Em consonância com o dado anterior, onde encontramos uma menor fosforilação mediada por PKA no córtex renal de ratos com IC, a Figura 24B atesta que razão relativa do NHE3 fosforilado na serina 552 (NHE3-pS552/NHE3 total) sítio consenso da PKA, era muito mais baixo em ratos HF tratados com veículo quando comparados ao grupo Sham (58 ± 10 vs $100 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Já o tratamento com Vildagliptina aumentou de maneira dose-dependente os níveis de NHE3 fosforilado no resíduo 552. Níveis mais baixos de NHE3 fosforilado na serina 552 no túbulo proximal está associado com a maior atividade do NHE3 [26, 82].

Figura 24. Expressão total do NHE3 e níveis de fosforilação do resíduo de serina 552 em córtex renal de ratos Sham e HF tratados ou não com Vildagliptina. Quantidades equivalentes (15 µg para o NHE3, 5 µg para o NHE3-PS552 e 5 µg para actina) de proteína de membrana de córtex renal dos ratos Sham, HF e HF tratados com 80 ou 120 mg/kg/dia de Vildagliptina foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e analisadas por “immunoblotting”. As membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal contra o NHE3 total (1:1000), contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (1:1000) e contra actina (1:50000). Actina foi usada como controle interno. (A) Representação gráfica do nível de expressão relativo do NHE3 total normalizado pela actina e (B) da razão do NHE3-PS552 pelo NHE3 total (P-NHE3/total). Os valores estão expressos como média ± EPM. *P < 0,05 vs. Sham. #P < 0,05 vs. HF.

Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a inibição da DPPIV com Vildagliptina melhorou a função cardiorrenal de ratos com IC estabelecida.

Um recente trabalho do nosso grupo demonstrou que a atividade da DPPIV encontra-se aumentada no plasma de ratos e pacientes com IC e correlaciona negativamente com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) em ratos e humanos e correlaciona positivamente com a pressão diastólica final do VE e congestão pulmonar em ratos com IC [74]. Sendo assim, a DPPIV parece estar envolvida não somente na homeostase glicêmica, mas possivelmente na fisiopatologia da IC. Confirmando essa hipótese, a administração do inibidor da DPPIV, Sitagliptina, iniciada logo após a indução da injúria miocárdica, parece prevenir o desenvolvimento/progressão de IC [74].

Diversos estudos pré-clínicos demonstraram efeitos benéficos na função cardiovascular através da inibição farmacológica da DPPIV ou intervenção no eixo DPPIV/GLP-1. Muitos são os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos cardioprotetores dos inibidores da DPPIV. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o GLP-1 e agonistas GLP-1R podem reduzir os níveis de apoptose em cardiomiócitos estimulados com fator de necrose tumoral-alfa e ceramida, e diminuir o tamanho do infarto em camundongos independente do estado glicêmicos desses animais [83-87]. De fato, em um trabalho recente do nosso grupo, dos Santos *et al* demonstraram que a inibição da DPPIV melhorou a função cardíaca de ratos que foram submetidos a injúria do miocárdio. Além disso, os animais tratados com Sitagliptina por 6 semanas apresentaram menores níveis de apoptose no coração e

um melhor balanço nos níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas quando comparados com os animais não tratados. No presente trabalho os níveis de apoptose não foram avaliados, contudo, uma vez que o modelo de injúria do miocárdio foi semelhante, e a IC é uma síndrome na qual muitas vezes o quadro se deteriora progressivamente, é possível que a diminuição dos níveis de morte celular no coração seja um dos mecanismos envolvidos na melhora na função cardíaca observada no corrente trabalho.

Outro mecanismo que possivelmente deve estar envolvido na melhora da função cardíaca observada nos animais com IC tratados com Vildagliptina são os níveis de colágeno no coração. Sabe-se que níveis elevados de colágeno no coração estão diretamente relacionados com a piora de função do órgão uma vez que há uma maior rigidez e consequente perda de função. De fato, os níveis de colágeno I e de fibrose intersticial no coração dos animais submetidos ao tratamento com o inibidor da DPPIV foram significativamente menores quando comparados com os animais não tratados. Se esta redução nos níveis de fibrose é um efeito direto dos substratos da DPPIV sobre os fibroblastos ou se é um efeito indireto devido às ações cardioprotetoras desses substratos nos cardiomiócitos e outras células, estudos posteriores poderão ajudar a esclarecer. Além disso, sabe-se que o aumento da pré-carga é uma condição que altera muito a função diastólica, e substratos da DPPIV como o BNP e GLP-1, possuem diversas ações anti-hipertróficas, vasodilatadoras e natriuréticas. O aumento da biodisponibilidade desses peptídeos pode ter acarretado em uma menor pré-carga devido uma redução da volemia e consequentemente uma melhor função cardíaca. Esses dados corroboram com os dados de congestão

pulmonar que foram observados nos animais submetidos ao tratamento com Vildagliptina.

Um dos peptídeos degradados pela DPPIV que sabidamente tem ações anti-hipertróficas e anti-fibróticas é o BNP. Vale ressaltar que elevados níveis plasmáticos de BNP é um forte indicador de IC. Neste trabalho, a inibição da DPPIV resultou em diminuição dos níveis plasmáticos totais de BNP e menores níveis de mRNA deste peptídeo, o que sugere que houve uma redução no estresse sofridos pelas câmaras cardíacas, uma que vez este é um dos principais estímulos para a secreção para o BNP.

Conforme o próprio nome sugere, o BNP possui uma importante ação natriurética. Sabe-se que na IC há uma piora na função renal. Nossos dados demonstram que ratos insuficientes tratados com veículo exibiram menor fluxo urinário, excreção urinária de sódio, e uma redução significativa do ritmo de filtração glomerular em comparação com ratos Sham. Contudo, os animais tratados com Vildagliptina apresentaram uma melhora nesses parâmetros renais, demonstrando que houve uma melhora do manuseio de sódio e água nesses animais. Isto pode ser explicado pelo aumento da forma intacta do BNP (1-32), uma vez que após a ação da DPPIV a forma truncada do BNP (3-32) possui uma atividade fisiológica reduzida. De fato, dos Santos et al demonstraram que apesar de ratos com IC apresentarem níveis totais de BNP elevados, havia uma menor ativação da via da PKG, a qual é ativada por este peptídeo, sugerindo que os níveis intactos de BNP estão menores na IC [74]. Vale ressaltar também que além do BNP, outro substrato da DPPIV, o GLP-1, também possui ações natriuréticas principalmente via região proximal do néfron e ações no NHE3. Corroborando com os efeitos do GLP-1 na função renal, nosso

grupo demonstrou anteriormente que a infusão sistêmica de GLP-1 aumenta o ritmo de filtração glomerular e fluxo plasmático renal, diminui a reabsorção tubular proximal de sódio, bicarbonato e água [67]. Esses efeitos devem-se em parte pela inibição da troca Na^+/H^+ mediada pelo co-transportador NHE3 no túbulo proximal renal. Além disso, estudos conduzidos em nosso laboratório demonstram que a infusão aguda de GLP-1 aumenta o RFG e o fluxo plasmático renal e diminui a resistência vascular renal via ativação da via cAMP/PKA (dados ainda não publicados). Sabe-se que níveis mais baixos de NHE3 fosforilado na serina 552, sítio consenso para PKA, no túbulo proximal está associado com a maior atividade do NHE3 e consequente maior reabsorção de sódio [26, 88]. Sendo assim, embora não encontramos alterações na expressão renal da DPPIV, observamos um aumento da expressão do receptor de GLP-1 assim como da atividade da PKA em córtex renal de ratos com IC tratados com Vildagliptina. Dessa forma, em conjunto com os dados da literatura, nossos resultados sugerem que o aumento da biodisponibilidade de peptídeos com ações cardio e renoprotetoras como GLP-1 e BNP decorrentes da inibição da DPPIV, normaliza o manuseio renal de sal e água em ratos com IC por mecanismos tubulares e hemodinâmicos.

Alguns estudos têm demonstrado que pacientes não diabéticos que sofreram infarto do miocárdio apresentam maior pré-disposição a desenvolverem distúrbios da homeostase da glicose [89, 90]. Nossos resultados mostram através de um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) que ratos com IC apresentam homeostase anormal da glicose quando comparados com animais Sham. Isto pode se dever ao fato dos animais HF apresentarem maior atividade plasmática da DPPIV e consequentemente um déficit nas ações insulínótropicas do GLP-1. Corroborando esta hipótese, animais

insuficientes apresentam maiores níveis totais de GLP-1, o que pode sugerir um mecanismo compensatório da secreção do GLP-1 devido a maior atividade da DPPIV. De fato, a inibição da DPPIV aumentou a biodisponibilidade e secreção de GLP-1, uma vez que observamos um aumento na razão GLP1 ativo/total. Notavelmente, estudos conduzidos em nosso laboratório demonstram que pacientes com IC também apresentam menor biodisponibilidade do GLP-1 quando comparados a indivíduos saudáveis (dados não mostrados).

Por sua vez, o tratamento com Vildagliptina foi capaz de restaurar os níveis plasmáticos de insulina. Um recente estudo do nosso grupo demonstrou que o tratamento com o inibidor da DPPIV, Sitagliptina, teve um efeito positivo na sensibilidade e na resistência à insulina em ratos espontaneamente hipertensos. Ademais, a inibição da DPPIV foi capaz de regular positivamente o transportador de glicose GLUT-4 no coração e no músculo esquelético. Além disso, no mesmo estudo demonstramos *in vitro* que o GLP-1 é capaz de modular diretamente os níveis de GLUT-4 em cardiomiócitos [91]. Estes resultados sugerem que a atividade DPPIV desempenha um papel importante no metabolismo da glicose durante a doença cardiovascular.

5.1 – Evidências clínicas versus evidências experimentais

No presente trabalho, demonstramos que a inibição crônica da enzima DPPIV com vildagliptina melhora a função cardíaca e renal de ratos com IC estabelecida. No entanto, apesar da extensa quantidade de dados experimentais documentando que os inibidores da DPPIV são benéficos para o tratamento de distúrbios cardíacos,

resultados conflitantes foram encontrados ao traduzir esses achados promissores pré-clínicos em modelos animais para o tratamento clínico.

Em 2013, um grande ensaio clínico que avaliou os benefícios e os riscos dos inibidores da DPPIV em pacientes diabéticos com alto risco para eventos cardiovasculares foi publicado no “The New England Journal of Medicine”: o “Saxagliptin Assessment of Vascular Outcomes Recorded in Patients with Diabetes Mellitus - Thrombolysis in Myocardial Infarction 53 study (SAVOR-TIMI 53) [92]. O estudo SAVOR-TIMI 53 foi um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, ensaio clínico de fase 4. Um total de 16.492 pacientes com histórico documentado de diabetes mellitus tipo 2 e/ou histórico de doença cardiovascular estabelecida ou múltiplos fatores de risco para doença vascular foram randomizados aleatoriamente e receberam o inibidor da DPPIV saxagliptina a uma dose de 5 mg por dia (ou 2,5 mg por dia em pacientes com uma RFG estimado de ≤ 50 ml/min) ou placebo. Inesperadamente, este estudo mostrou um aumento de 27% do risco relativo de hospitalização por insuficiência cardíaca em pacientes pertencentes ao grupo saxagliptina (3,5% vs. 2,8% no placebo; $p = 0,007$). No entanto, a inibição da DPPIV com saxagliptina não aumentou ou diminuiu a taxa de eventos isquêmicos (endpoint primários - morte cardiovascular, infarto não fatal ou não fatal acidente vascular cerebral isquêmico).

De fato, o aumento na hospitalização por IC em pacientes diabéticos tratados com saxagliptina versus pacientes tratados com placebo observada no estudo SAVOR-TIME 53 traz o levantamento de algumas preocupações de segurança cardiovascular em relação à administração de inibidores da DPPIV para pacientes diabéticos com insuficiência cardíaca. No entanto, resta determinar se esse resultado

decepcionante pode ser considerado um efeito adverso dos inibidores da DPPIV, se é comum a todos os inibidores da DPPIV e se pode ser associado com comorbidades e polimedicação. Até o momento, os possíveis mecanismos que possam explicar por que a saxagliptina aumentaria o risco de hospitalizações por IC permanecem especulativos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a inibição crônica da DPPIV com Vildagliptina restaurou a função cardíaca e renal de ratos com IC, evidenciando que os inibidores da DPPIV exercem efeitos terapêuticos em ratos com IC. Além disso, também demonstramos que a secreção e biodisponibilidade do GLP-1 encontram-se prejudicadas em ratos com IC e o tratamento com Vildagliptina é capaz de melhorar esta condição.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nogueira, P.R., S. Rassi, and S. Correa Kde, *Epidemiological, clinical e therapeutic profile of heart failure in a tertiary hospital*. Arq Bras Cardiol, 2010. **95**(3): p. 392-8.
2. IBGE. *Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 1980-2050* 2013; Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/default.shtm.
3. Hunt, S.A., et al., *2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation*. Circulation, 2009. **119**(14): p. e391-479.
4. AHA. *Heart Failure*. AHA - American Heart Association 2012; Available from: <http://www.heart.org>.
5. Jessup, M. and S. Brozena, *Heart failure*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 2007-18.
6. Nohria, A., E. Lewis, and L.W. Stevenson, *Medical management of advanced heart failure*. JAMA, 2002. **287**(5): p. 628-40.
7. Investigators., T.S., *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators*. N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 685-91.
8. Figueroa, M.S. and J.I. Peters, *Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care*. Respir Care, 2006. **51**(4): p. 403-12.
9. Konstam, M.A., *Progress in heart failure Management? Lessons from the real world*. Circulation, 2000. **102**(10): p. 1076-8.
10. Stead, E.A. and J.V. Warren, *The Protein Content of the Extracellular Fluid in Normal Subjects after Venous Congestion and in Patients with Cardiac Failure, Anoxemia, and Fever*. J Clin Invest, 1944. **23**(2): p. 283-7.
11. Cadnapaphornchai, M.A., et al., *Pathophysiology of sodium and water retention in heart failure*. Cardiology, 2001. **96**(3-4): p. 122-31.
12. Abraham, W.T., et al., *Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure*. J Card Fail, 1998. **4**(1): p. 37-44.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

13. Brum, P.C., et al., *Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors*. An Acad Bras Cienc, 2006. **78**(3): p. 485-503.
14. Chatterjee, K., *Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin*. Am J Cardiol, 2005. **95**(9A): p. 8B-13B.
15. Meneton, P., *Comparative roles of the renal apical sodium transport systems in blood pressure control*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11 Suppl 16**: p. S135-9.
16. Nogae, S., et al., *Cardiac infarcts increase sodium transporter transcripts (rBSC1) in the thick ascending limb of Henle*. Kidney Int, 2000. **57**(5): p. 2055-63.
17. Torp, M., et al., *Losartan decreases vasopressin-mediated cAMP accumulation in the thick ascending limb of the loop of Henle in rats with congestive heart failure*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **190**(4): p. 339-50.
18. Staahltoft, D., et al., *Losartan treatment normalizes renal sodium and water handling in rats with mild congestive heart failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **282**(2): p. F307-15.
19. Lutken, S.C., et al., *Changes of renal AQP2, ENaC, and NHE3 in experimentally induced heart failure: response to angiotensin II AT1 receptor blockade*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(6): p. F1678-88.
20. Biemesderfer, D., et al., *NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 2): p. F736-42.
21. Schultheis, P.J., et al., *Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 282-5.
22. Vallon, V., et al., *Role of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(3): p. F375-9.
23. Wang, T., et al., *Role of NHE isoforms in mediating bicarbonate reabsorption along the nephron*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(6): p. F1117-22.
24. Antonio, E.L., et al., *Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality*. J Card Fail, 2009. **15**(6): p. 540-8.
25. Inoue, B.H., et al., *Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(1): p. R166-74.
26. Girardi, A.C. and F. Di Sole, *Deciphering the mechanisms of the Na⁺/H⁺ exchanger-3 regulation in organ dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(11): p. C1569-87.
27. Lambeir, A.M., et al., *Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2003. **40**(3): p. 209-94.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

28. Loster, K., et al., *The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(1): p. 341-8.
29. Cheng, H.C., et al., *Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24207-15.
30. Kameoka, J., et al., *Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26*. Science, 1993. **261**(5120): p. 466-9.
31. Torimoto, Y., et al., *Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2514-7.
32. Herrera, C., et al., *Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19532-9.
33. Girardi, A.C., et al., *Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46671-7.
34. Girardi, A.C., et al., *Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na+/H+ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(5): p. C1238-45.
35. Girardi, A.C., et al., *Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na+ - H+ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(2): p. F414-22.
36. Drucker, D.J., *Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(10): p. 2929-40.
37. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. Lancet, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
38. Wettergren, A., et al., *Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man*. Dig Dis Sci, 1993. **38**(4): p. 665-73.
39. Yusta, B., et al., *GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress*. Cell Metab, 2006. **4**(5): p. 391-406.
40. Mojsov, S., G.C. Weir, and J.F. Habener, *Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 616-9.
41. Scheen, A.J., *A review of gliptins in 2011*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(1): p. 81-99.
42. Dhillon, S., *Sitagliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus*. Drugs, 2010. **70**(4): p. 489-512.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

43. He, Y.L., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin*. Clin Pharmacokinet, 2012. **51**(3): p. 147-62.
44. Keating, G.M., *Vildagliptin: a review of its use in type 2 diabetes mellitus*. Drugs, 2010. **70**(16): p. 2089-112.
45. Yang, L.P., *Saxagliptin: a review of its use as combination therapy in the management of type 2 diabetes mellitus in the EU*. Drugs, 2012. **72**(2): p. 229-48.
46. Scott, L.J., *Linagliptin: in type 2 diabetes mellitus*. Drugs, 2011. **71**(5): p. 611-24.
47. Scott, L.J., *Alogliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus*. Drugs, 2010. **70**(15): p. 2051-72.
48. Rendell, M., A. Drincic, and R. Andukuri, *Alogliptin benzoate for the treatment of type 2 diabetes*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(4): p. 553-63.
49. Phung, O.J., et al., *Effect of noninsulin antidiabetic drugs added to metformin therapy on glycemic control, weight gain, and hypoglycemia in type 2 diabetes*. JAMA, 2010. **303**(14): p. 1410-8.
50. Scheen, A.J., *DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes: a critical review of head-to-head trials*. Diabetes Metab, 2012. **38**(2): p. 89-101.
51. Hollander, P.A. and P. Kushner, *Type 2 diabetes comorbidities and treatment challenges: rationale for DPP-4 inhibitors*. Postgrad Med, 2010. **122**(3): p. 71-80.
52. Gooßen, K. and S. Gräber, *Longer term safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(12): p. 1061-72.
53. Amiel, S.A., et al., *Hypoglycaemia in Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2008. **25**(3): p. 245-54.
54. Liu, S.C., et al., *Effect of antidiabetic agents added to metformin on glycaemic control, hypoglycaemia and weight change in patients with type 2 diabetes: a network meta-analysis*. Diabetes Obes Metab. **14**(9): p. 810-20.
55. Karagiannis, T., et al., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2012. **344**: p. e1369.
56. Hermansen, K. and L.S. Mortensen, *Bodyweight changes associated with antihyperglycaemic agents in type 2 diabetes mellitus*. Drug Saf, 2007. **30**(12): p. 1127-42.
57. Mitri, J. and O. Hamdy, *Diabetes medications and body weight*. Expert Opin Drug Saf, 2009. **8**(5): p. 573-84.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

58. Ban, K., et al., *Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways*. *Circulation*, 2008. **117**(18): p. 2340-50.
59. Liu, Q., et al., *Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure*. *Cardiovasc Diabetol*, 2010. **9**: p. 76.
60. Poornima, I., et al., *Chronic glucagon-like peptide-1 infusion sustains left ventricular systolic function and prolongs survival in the spontaneously hypertensive, heart failure-prone rat*. *Circ Heart Fail*, 2008. **1**(3): p. 153-60.
61. Ravassa, S., et al., *Antiapoptotic Effects of Glp-1 in Murine H1-1 Cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011.
62. Timmers, L., 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): p. 501-10.
63. Gutzwiller, J.P., et al., *Glucagon-like peptide-1 is involved in sodium and water homeostasis in humans*. *Digestion*, 2006. **73**(2-3): p. 142-50.
64. Gutzwiller, J.P., et al., *Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 3055-61.
65. Moreno, C., M. Mistry, and R.J. Roman, *Renal effects of glucagon-like peptide in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **434**(3): p. 163-7.
66. Carraro-Lacroix, L.R., G. Malnic, and A.C. Girardi, *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*, 2009. **297**(6): p. F1647-55.
67. Crajoinas, R.O., et al., *Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **301**(2): p. F355-63.
68. Brandt, I., et al., *Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form*. *Clin Chem*, 2006. **52**(1): p. 82-7.
69. Shioda, T., et al., *Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6331-6.
70. Morita, E., et al., *Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1993. **88**(1): p. 82-91.
71. Miller, W.L., et al., *Comparison of mass spectrometry and clinical assay measurements of circulating fragments of B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure*. *Circ Heart Fail*, 2011. **4**(3): p. 355-60.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

72. Hawkrigde, A.M., et al., *Quantitative mass spectral evidence for the absence of circulating brain natriuretic peptide (BNP-32) in severe human heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(48): p. 17442-7.
73. Boerrigter, G., et al., *Des-serine-proline brain natriuretic peptide 3-32 in cardiorenal regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(2): p. R897-901.
74. dos Santos, L., et al., *Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(5): p. 1029-38.
75. He, Y.L., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus*. Clin Pharmacokinet, 2007. **46**(7): p. 577-88.
76. Azuma, K., et al., *Measurements of islet function and glucose metabolism with the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin in patients with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(2): p. 459-64.
77. Tucci, P.J., *Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats*. Arq Bras Cardiol, 2011. **96**(5): p. 420-4.
78. Gerdes, A.M., Z. Liu, and H.G. Zimmer, *Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats*. Cardioscience, 1994. **5**(3): p. 203-8.
79. Serra, A.J., et al., *Exercise training prevents beta-adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(6): p. 534-9.
80. Lang, R.M., et al., *Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology*. J Am Soc Echocardiogr, 2005. **18**(12): p. 1440-63.
81. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
82. Crajoinas, R.O., et al., *Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR*. Am J Physiol Renal Physiol. **299**(4): p. F872-81.
83. Picatoste, B., et al., *Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential roles of GLP-1 isoforms*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78330.

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

84. Ravassa, S., et al., *Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(4): p. H1361-72.
85. Bose, A.K., et al., *Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 146-51.
86. Noyan-Ashraf, M.H., et al., *GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice*. Diabetes, 2009. **58**(4): p. 975-83.
87. Sauve, M., et al., *Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice*. Diabetes, 2010. **59**(4): p. 1063-73.
88. Crajinas, R.O., et al., *Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(4): p. F872-81.
89. Choi, K.M., et al., *Inflammation, insulin resistance, and glucose intolerance in acute myocardial infarction patients without a previous diagnosis of diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(1): p. 175-80.
90. Norhammar, A., et al., *Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study*. Lancet, 2002. **359**(9324): p. 2140-4.
91. Giannocco, G., et al., *Dipeptidyl peptidase IV inhibition upregulates GLUT4 translocation and expression in heart and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats*. Eur J Pharmacol, 2012. **698**(1-3): p. 74-86.
92. Scirica, B.M.; Bhatt, D.L.; Braunwald, E.; Steg, P.G.; Davidson, J.; Hirshberg, B.; Ohman, P.; Frederick, R.; Wiviott, S.D.; Hoffman, E.B., et al. *Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2013. **369**: p. 1317-1326

---

* De acordo com:

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).