

CARLOS ANDRÉ TONELLI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
SUBCRÔNICA DE INIBIDORES DA ENZIMA DIPEPTIDIL
PEPTIDASE-4 EM CÉREBRO, CORAÇÃO E FÍGADO DE
RATOS ADULTOS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T664a Tonelli, Carlos André.

Avaliação dos efeitos da administração subcrônica de inibidores da enzima Dipeptil Peptidase-4 em cérebro, coração e fígado de ratos adultos / Carlos André Tonelli ; orientador: Emílio Luiz Streck,. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

85 p: il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Diabetes Mellitus – Tratamento. 2. Dipeptidil Peptidase 4 – Uso terapêutico. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Metabolismo energético. I. Título.

CDD. 22ª ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pelo candidato **Carlos André Tonelli** sob o título “**Avaliação dos efeitos da administração subcrônica de inibidores da enzima dipeptidil peptidase-4 em cérebro, coração e fígado de ratos adultos**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 18 de dezembro de 2014.

Prof. Dra. Josiane Budni
Membro Relator

Prof. Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Membro Interno

Prof. Dr. Tiago Elias Allievi Frizon
Membro Externo

Prof. Dr. Emílio Luiz Sreeck
Orientador

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A Dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

A minha esposa Sinara, pela paciência e compreensão dos momentos em que faltei.

Aos meus filhos Vitor, Lucas, Amanda e Isadora que são meus maiores incentivos a continuar lutando.

A meus pais, por tudo o que me deram e me ensinaram.

A Doutora Giselli pela infinita disponibilidade por seus conhecimentos e disposição e pela impecável condução deste meu trabalho.

Às bolsistas do Laboratório de Bioenergética e dos demais laboratórios que trabalharam em parceria com o nosso grupo, para conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Emilio, pela confiança, oportunidade de trabalhar ao seu lado e pelo incentivo profissional.

RESUMO

A diabetes Mellitus (DM) é na atualidade um dos maiores problemas de saúde pública, sendo caracterizada como um distúrbio metabólico complexo, resultante tanto da resistência à ação da insulina, como da disfunção das células β . Atualmente, uma nova classe de fármacos, os inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), demonstrou eficiência terapêutica e segurança no tratamento de pacientes com DM devido ao aumento do hormônio peptídeo-1 semelhante ao glucagon. Entretanto, por tratar-se de uma classe nova de medicamentos, pouco se sabe sobre os efeitos desses fármacos no que diz respeito aos parâmetros metabólicos, bem como a função mitocondrial. Neste contexto, o presente trabalho, tem como objetivo avaliar os efeitos da administração de diferentes inibidores de DPP-4 (linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina) sobre parâmetros do metabolismo energético em cérebro, coração e fígado de ratos adultos. Os resultados desse estudo demonstraram que a administração subcrônica de linagliptina aumentou a atividade dos complexos I e IV no hipocampo e cerebelo, enquanto no fígado, houve um aumento na atividade dos complexos II e II-III. No entanto, no coração observou-se uma inibição da atividade do complexo IV e da succinato desidrogenase. Já a administração de vildagliptina aumentou a atividade do complexo I no hipocampo, e a atividade da creatina quinase no cerebelo e córtex cerebral. No fígado observou-se um aumento na atividade dos complexos II e II-III, enquanto no coração houve um aumento na atividade dos complexos I e II-III. A administração de sitagliptina causou um aumento na atividade do complexo I no hipocampo e cerebelo, enquanto que a atividade do complexo II foi reduzida no córtex cerebral. Observou-se também um aumento na atividade da creatina quinase em todas as estruturas cerebrais analisadas. Já no fígado verificou-se um aumento apenas na atividade do complexo II, e no coração um aumento na atividade dos complexos I e II-III, ao passo que a atividade da succinato desidrogenase foi inibida nessa estrutura. Finalizando, constatou-se, que a administração de saxagliptina aumentou a atividade dos complexos I e IV no hipocampo e cerebelo, e a atividade da creatina quinase no hipocampo, cerebelo, estriado e córtex cerebral. No fígado observou-se um aumento na atividade dos complexos II e II-III e da creatina quinase, enquanto no coração verificou-se um aumento da atividade do complexo II-III e da creatina quinase, e uma diminuição da succinato desidrogenase. Por fim, os resultados do presente estudo demonstraram que a administração subcrônica de diferentes inibidores de DPP-4 altera

a atividade de enzimas do metabolismo energético. Tomados em conjunto os dados deste estudo e os dados já descritos na literatura, é tentador especular que o aumento na atividade de enzimas do metabolismo energético pode estar envolvido com o mecanismo pelo qual a função mitocondrial é restaurada pelo tratamento com inibidores de DPP-4.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4; Mitocôndria; Metabolismo energético.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is nowadays one of the major public health problems, characterized as a complex metabolic disorder, resulting from both the resistance to insulin action, as the dysfunction of β cells. Currently, a new class of drugs, inhibitors of the enzyme dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) showed therapeutic efficacy and safety in the treatment of diabetic patients because of increased peptide-1 glucagon-like hormone. However, because it is a new class of drugs, is little known about the effects of these drugs on metabolic parameters as well as mitochondrial function. In this context, this study aimed to evaluate the effects of administration of different DPP-4 inhibitors (linagliptin, vildagliptin, sitagliptin and saxagliptin) on parameters of energy metabolism in brain, heart and liver of adult rats. The results of this study demonstrated that subchronic administration linagliptin increased complexes I and IV activity in the hippocampus and cerebellum, liver, while there was an increase in the activity of complex II and II-III. However, the heart was observed an inhibition of the activity of complex IV and succinate dehydrogenase. But, the vildagliptin administration increased the activity of complex I in the hippocampus, and the creatine kinase activity in the cerebellum and cerebral cortex. In the liver, there was an increase in the activity of complex II and II-III, while in the heart an advance in the activity of complex I and II-III. Sitagliptin administration caused an increase in complex I activity in the hippocampus and cerebellum, whereas the activity of compound II was reduced in the cerebral cortex. There was also an increase in creatine kinase activity in all brain structures analyzed. In the liver there was only an advance in the activity of the complex II in the heart and an increase in the activity of complex I and II-III, whereas the activity of succinate dehydrogenase is inhibited in this structure. Finally, it was demonstrated that saxagliptin administration increased activity of complexes I and IV in the hippocampus and cerebellum, and creatine kinase activity in the hippocampus, cerebellum, striatum and cerebral cortex. In the liver, there was an advance in the activity of complex II and II-III and creatine kinase, whereas the heart was demonstrated increased activity II-III complex and creatine kinase, and a reduction in succinate dehydrogenase. In conclusion, the results of this study demonstrated that the subchronic administration of different DPP-4 inhibitors alters the activity of enzymes of energy metabolism. Taken together our data and the data described in the literature, it is tempting to speculate that the increase in energy metabolism enzyme activity may be

involved in the mechanism by which mitochondrial function is restored by treatment with DPP-4 inhibitors.

Keywords: Diabetes Mellitus; Inhibitors of the enzyme dipeptidyl peptidase 4; Mitochondria; Energy metabolism.

Lista de Figuras

Figura 1: Efeitos dos inibidores de DPP-4. Glicose oral estimula a liberação das incretinas endógenas GLP-1 e GIP, estes estimulam a liberação de insulina e inibem a liberação de glucagon, resultando em uma diminuição da glicemia. Essas incretinas são rapidamente inativadas pela DPP-4, e os inibidores da DPP-4 prolongam a ação dessas incretinas endógenas, aumentando a resposta da insulina.....	36
Figura 2: Esquema de reações do Ciclo de Krebs	40
Figura 3: Cadeia respiratória mitocondrial e fosforilação oxidativa.	41
Figura 4. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade da succinato desidrogenase em cerebelo, hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$	49
Figura 5. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade da malato desidrogenase em cerebelo, hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$	51
Figura 6. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em cerebelo, hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$	52
Figura 7. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$	54

Figura 8. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade creatina quinase em cerebelo, hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$ 55

Lista de Abreviaturas

- Acetil-CoA – Acetil coenzima A
ADP – Difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)
AGEs – Produtos finais de glicação avançada (do inglês *advanced glycation end products*)
Akt – Proteína quinase B (do inglês *protein kinase B*).
AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês *3,5-cyclic adenosinemonophosphate*)
Anti-GAD – anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico
ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CONCEA – Conselho nacional de controle de experimentação animal
DCIP – 2,6-dicloroindofenol
DM – Diabetes Mellitus
DPP-4 – Dipeptidil peptidase IV
FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo reduzida
GIP – Peptídeo insulinoatrópico glicose-dependente (do inglês *Gastric inhibitory polypeptide*)
GLP-1 – Polipeptídeo semelhante ao glucagon-1 (do inglês *glucagon-like peptide-1*)
GTP – Guanosina trifosfato
HbA1c – Hemoglobina glicada
IAA – Anticorpo anti-insulina
IDF – International Diabetes Federation
IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês *Insulin-like growth factor I*)
LADA – Diabetes Latente Autoimune do Adulto (do inglês *Latent Autoimmune Diabetes's Adult*)
NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
OMS – Organização Mundial de Saúde
PI-3-Kinase – Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês *phosphoinositide 3-kinase*)
PKA – Proteína quinase dependente de cAMP (do inglês *cAMP Dependent Protein Kinase*)
PKC – Proteína quinase C (do inglês *protein kinase C*)
SNC – Sistema nervoso central
SUS – Sistema Único de Saúde

VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 DIABETES	27
1.1.2 Classificação	28
1.1.2.1 DM tipo 1	28
1.1.2.2 DM Tipo 2.....	29
1.1.2.3 DM Gestacional e Outros tipos de DM	29
1.1.3 Diagnóstico	29
1.1.4 Fisiopatologia	30
1.1.5 Tratamento	32
1.1.5.1 Inibidores da DPP-4	35
1.1.5.1.1 <i>Saxagliptina</i>	36
1.1.5.1.2 <i>Sitagliptina</i>	37
1.1.5.1.3 <i>Linagliptina</i>	37
1.1.5.1.4 <i>Vildagliptina</i>	38
1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO.....	38
1.2.1 Ciclo de Krebs	39
1.2.2 Cadeia Respiratória	40
1.2.3 Creatina quinase	42
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 METODOLOGIA	45
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	45
4.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS	46
4.2.1 Preparo dos tecidos	46
4.2.2 Atividade das enzimas do Ciclo de Krebs	46
4.2.3 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial	46
4.2.4 Atividade da Creatina Quinase	47
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	56
7 PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	84
ANEXO I: TERMO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica muito frequente na sociedade, sendo considerada como uma das grandes pandemias do século XXI e um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013). É hoje uma causa comum de admissão hospitalar e está associada a grave morbidade e a mortalidade prematura, sendo que 5% das mortes mundiais são atribuídas à Diabetes (Grilo et al., 2008; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013). Além disso, a DM diminui a esperança média de vida, onde uma pessoa diagnosticada com a doença aos 40 anos terá uma diminuição da esperança de vida de aproximadamente 12 anos nos homens e 14 anos nas mulheres (Sochett e Daneman, 1999; American Diabetes Association, 2000; Biderman et al., 2000; Brun et al., 2000; Morgan et al., 2000; Rajala et al., 2000; Skamagas et al., 2008).

A DM apresenta variações de incidência e prevalência nas várias regiões do mundo, com um crescimento progressivo em todas elas, sendo que a sua maior prevalência é no grupo etário acima dos 45 anos. Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimava que o número de pessoas com diabetes no mundo atingisse os 177 milhões. Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), entidade vinculada à OMS, até 2025 esse número deve chegar a 380 milhões. No Brasil, calcula-se que existam 12.054.827 diabéticos e estima-se que esse número continue a aumentar drasticamente (CENSO-IBGE 2010). Os inquéritos da VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), do Ministério da Saúde demonstram que a prevalência do DM cresceu significativamente entre 2006 e 2010, de 4,4% para 5,4%, nos homens, e de 5,9% para 7,0%, em mulheres. Por fim, dados recentes estimam que a prevalência da DM no Brasil está em torno de 15%, mas sabemos que estes números variam de acordo com a faixa etária (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013). Em decorrência disso, o número de internações por diabetes no Sistema Único de Saúde (SUS) aumentou 10% entre 2008 e 2011, passando de 131.734 para 145.869, o mesmo aconteceu com o número de obtidos pela DM, que passou de 52.104 em 2009, para 54.542 em 2010.

Para Orchard et al. (1998), a prevalência de DM nos EUA varia entre 6% nos indivíduos de raça caucasiana e 10% nos indivíduos de raça negra, parecendo variar inversamente com o status econômico. O

aumento mais acentuado da doença acontece nas sociedades em que ocorrem as maiores modificações no tipo de dieta consumida, redução da atividade física, aumento das pessoas com excesso de peso. Esse fenômeno parece estar associado com dois fatores: quando aumentam as fontes de recursos alimentares em uma população, aumenta o peso dos indivíduos e conseqüentemente o número de casos de DM; o aumento do nível econômico de uma população conduz a uma redução do nível de atividade física, pelo menos relativo à atividade laboral.

1.1.2 Classificação

A DM é um grupo heterogêneo de distúrbios envolvendo todos os substratos energéticos (carboidratos, proteínas e gorduras), sendo caracterizado principalmente por um desequilíbrio na homeostase da glicose, resultante da deficiência de secreção ou da ação da insulina (American Diabetes Association, 2007; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013). A Sociedade Brasileira de Diabetes, em sua última diretriz (2013), baseada nas classificações da OMS e da Associação Americana de Diabetes, recomenda a classificação da DM em diabetes tipos 1 e 2, existindo também a DM gestacional e uma categoria que engloba outros tipos de DM.

1.1.2.1 DM tipo 1

Corresponde entre 5 a 10 % dos casos de diabetes sendo frequentemente observado em crianças e adolescentes, embora também possa ser observado em adultos. Pode ser autoimune ou idiopática de etiologia multifatorial, e ocorre em pessoas geneticamente suscetíveis, resultando da destruição das células β pela produção de anticorpos específicos causando deficiência absoluta da produção e secreção de insulina. A evidência de autoimunidade contribui para o estabelecimento do diagnóstico e é demonstrada através da pesquisa de anticorpos anti-ilhota ou auto-anticorpo, como por exemplo, os antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e anti-insulina (IAA) (Libman et al., 1998). A Diabetes Latente Autoimune do Adulto (LADA) ocorre quando a forma autoimune é lentamente progressiva, geralmente há maior propensão a outras patologias autoimunes como por exemplo, doença de Hashimoto, doença de Graves e doença Celíaca (Alberti e Zimemet, 1999).

1.1.2.2 DM Tipo 2

No DM tipo 2, inicialmente ocorre uma resistência à ação da insulina nos tecidos-alvo (músculo, fígado e tecido adiposo) e depois uma diminuição da insulina pela perda das células β . Os níveis de glucagon que deveriam baixar após a ingestão de alimentos permanecem altos nos pacientes diabéticos que já são deficientes em insulina, ocasionando um aumento ainda maior da glicemia. Na maioria das vezes o diagnóstico ocorre a partir dos 40 anos de idade, podendo ocorrer mais cedo, até mesmo na adolescência. Aproximadamente 85-90% dos indivíduos com DM pertencem à classificação tipo 2 (Skamagas et al., 2008). O risco para desenvolver DM do tipo 2 aumenta com a idade, obesidade e doenças cardiovasculares (Srinivasan e Bhagra, 2007). De fato, 40% dos pacientes hospitalizados com infarto agudo do miocárdio têm diagnóstico de diabetes e 30% possuem tolerância à glicose (Norhammar et al., 2002).

1.1.2.3 DM Gestacional e Outros tipos de DM

O DM gestacional se refere a qualquer grau de intolerância a glicose que acontece durante a gestação, ocorre em 1 a 14% de todas as gestações. Preconiza-se que 4 a 6 semanas após o parto as pacientes sejam reavaliadas para reclassificá-las, visto que na maioria dos casos ocorre a reversão para normalidade (Kuhl, 1991; Kim et al., 2001).

Outros tipos específicos de diabetes podemos citar defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzido por drogas, infecções e outras síndromes genéticas (Alberti e Zimmet, 1999; American Diabetes Association, 2010).

1.1.3 Diagnóstico

São três os critérios para diagnóstico de DM (American Diabetes Association, 2012):

- Glicemia casual > 200 mg/dL associados a sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal
- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL
- Glicemia > 200 mg/dl após sobrecarga de glicose de 75 g

Duas situações de resistência insulínica merecem destaque nos novos critérios de diagnósticos:

- Glicemia de jejum alterada = Glicemia > 100 mg/dL e < 126

mg/dL.

- Tolerância a glicose diminuída = 2 hs após sobrecarga de glicose valores entre 140 mg/dL e 200 mg/dL.

Foi proposta a utilização da hemoglobina glicada (HbA1c) em 2009 como critério diagnóstico para o DM. Atualmente a ADA recomenda os seguintes critérios:

- HbA1c > 6,5% - Diabetes. Necessita confirmação em outra coleta, a não ser que existam sintomas.
- HbA1c entre 5,7% e 6,4% - alto risco para desenvolver diabetes.

Alguns problemas para aplicação deste parâmetro são: hemoglobinopatias, anemias ferroprivas e hemolíticas, imperfeições na padronização da dosagem. Além disso, existem casos onde há discordância entre a glicemia e a HbA1c, e recentemente foi levantado a questão das etnias. Em conclusão os critérios para diagnóstico de DM por glicemia plasmática possuem nível de evidência. Para HbA1c são necessários mais estudos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013)

1.1.4 Fisiopatologia

No DM tipo 1 observa-se uma destruição imunológica seletiva das células β pancreáticas (Wicker et al., 1986; Bendelac et al., 1988; Shimizu et al., 1993). Existe participação de linfócitos e células apresentadoras de antígenos que interagem na geração da resposta imunológica, e o processo pode demorar meses ou anos (Wong e Wen, 2001). A destruição contínua das células β leva a progressiva perda da reserva secretória de insulina, culminando com a falta absoluta de insulina (Daneman, 2006). Os auto-anticorpos relacionados com as ilhotas podem ser detectados no sangue dos indivíduos predispostos vários anos antes das manifestações clínicas do DM tipo 1 (Sabbah et al., 1999). Além disso, existem fortes evidências demonstrando uma interação de fatores ambientais, vírus, fatores alimentares e estresse na fisiopatologia deste tipo de DM (Knip et al., 2005).

O DM tipo 2 trata-se de uma síndrome clínica com expressão fenotípica variável, sem etiologia específica, sendo considerada como uma doença de natureza poligênica mediada pelo ambiente e caracterizada pela disfunção endócrina bi-hormonal do pâncreas (Robertson et al., 2004). No paciente portador de DM tipo 2 há uma disfunção das células α e β da ilhota pancreática, não ocorrendo a adequada liberação de insulina antes da sobrecarga de carboidratos, nem a supressão de glucagon, o que piora a hiperglicemia (Hunger et al.,

1971). Além disso, observa-se uma piora progressiva do controle glicêmico com o passar dos anos, decorrente da perda das células β funcionantes (Monnier et al., 2006).

Embora os mecanismos responsáveis pelos danos estruturais e funcionais observados no DM ainda não estejam estabelecidos, a hiperglicemia resultante da regulação descontrolada da glicose tem sido reconhecida como umnexo de causalidade entre a diabetes e as complicações diabéticas (Brownlee, 2001). Estudos têm enfatizado vias importantes como contribuintes para os danos celulares induzidos pela hiperglicemia, sendo as principais: aumento do fluxo da via do polioliol, aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), aumento da ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento da atividade da via da hexosaminase (Gispén e Biessels, 2000; Sima, 2010).

Através da via do polioliol, a enzima aldose redutase normalmente tem a função de reduzir aldeídos tóxicos intracelulares a alcoóis inativos. Porém, quando as concentrações de glicose dentro das células se tornam muito altas, a enzima aldose redutase também reduz a glicose em sorbitol e frutose com consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). No entanto, o cofator do NADPH é requerido também para a regeneração da glutathiona reduzida, um potencial antioxidante intracelular (Brownlee, 2005). Assim, o acúmulo de sorbitol intracelular, caracterizado pelo aumento da atividade da via do polioliol, em resposta a hiperglicemia, causa uma redução nos níveis de glutathiona reduzida, tornando as células mais susceptíveis a dano e morte por estresse oxidativo, como formação de produtos de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e dano ao DNA (Tuzcu e Baydas, 2006). Adicionalmente, a toxicidade direta da glicose aos neurônios pode ocorrer também pelo aumento da auto-oxidação intracelular da glicose (Nishikawa et al., 2000) levando a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Evans et al., 2002). Em longo prazo estes danos oxidativos nas várias regiões cerebrais estão associados com anormalidades morfológicas e com o desenvolvimento de prejuízos na memória no estado diabético (Tuzcu e Baydas, 2006).

O acúmulo de sorbitol intracelular também leva a formação de AGEs, e esses causam alterações nos níveis de neurotrofinas, redução na expressão gênica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), bem como redução nos níveis de insulina, de seus receptores e dos seus fatores de transcrição (Sima, 2010). Adicionalmente, ocorre um aumento da ativação da PKC, uma molécula sinalizadora intracelular, com capacidade de regular várias funções vasculares. Sua ativação

aumenta a permeabilidade vascular, prejudica a ação do ácido nítrico, favorece a adesão leucocitária, altera o fluxo sanguíneo e pode contribuir para o acúmulo de matriz proteica intracelular. O fluxo pela via hexosamina resulta em mudanças na expressão gênica e na função das proteínas que contribuem para a patogênese das complicações (Kodl e Seaquist, 2008; Lyra e Cavalcanti, 2009; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013). Além disso, o aumento na formação de AGEs e de isoformas da PKC leva à ativação de fatores pró-inflamatórios (NF- κ B, TNF- α e IL-6), que estão associados a danos vasculares e celulares, como a morte de oligodendrócitos na substância branca em animais diabéticos (Brownlee, 2005; Sima et al., 2009). Além disso, Kamal et al. (1999) demonstraram que a potenciação de longa duração foi prejudicada em CA1, CA3 e no giro dentado, enquanto a depressão de longa duração foi facilitada em CA1, demonstrando que a plasticidade sináptica é alterada no hipocampo de ratos diabéticos. Outras alterações neuroquímicas têm sido observadas, incluindo diminuição dos níveis de acetilcolina (Welsh e Wecker, 1991), diminuição dos níveis de serotonina e dopamina em hipocampo de ratos submetidos à administração de estreptozotocina e em ratos espontaneamente diabéticos WBN/Kob (Yamato et al., 2004).

1.1.5 Tratamento

Os tratamentos disponíveis para os pacientes diabéticos incluem dieta, atividade física e medicamentos, dos quais alguns apresentam efeitos colaterais, como ganho de peso. As principais classes de fármacos disponíveis são: biguanidas (suprimem a produção hepática de insulina), sulfanilureias e glinidas (estimulam a secreção de insulina pela célula β), inibidores da α -glucosidase (diminuem a absorção dos carboidratos), tiazolidinedionas ou glitazonas (aumentam a sensibilidade periférica à insulina), inibidores da reabsorção renal de glicose (eliminam glicose pela urina) e os incretinomiméticos (Krentz et al., 2005).

O conceito de incretinas foi criado a partir de observações que demonstravam que a resposta da secreção de insulina era maior com a administração oral, que quando usado a via endovenosa. Com isto postulou-se que substâncias secretadas pelo intestino eram prováveis secretagogos de insulina (Elrick et al., 1964; Creutzfeldt, 1979; Nauck et al., 1986; Creutzfeldt, 2005; Leon et al., 2006). As incretinas pertencem a superfamília do glucagon. Os dois principais hormônios incretinas são o peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) com 42 aminoácido

clivado de seu precursor Pro-GIP e secretado pelas células K, principalmente no duodeno e na parte proximal do jejuno, e o polipeptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) clivado do precursor de pró-glucagon, incluindo peptídeos de 30 e 31 aminoácidos, secretado pelas células L principalmente no íleo e no cólon. Ambos são secretados após ingestão alimentar, sendo que as concentrações de GLP-1 e GIP aumentam de forma dependente com a glicose em 5 a 15 minutos após a refeição, atingindo um pico em torno de 30 a 40 minutos, e retornando a níveis basais após 2 horas (Vilsbøll et al., 2001; Chacra, 2006). A ingestão de nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídios estimulam tanto a secreção de GLP-1 como GIP, mas o que mais estimula a secreção de GLP-1 são os carboidratos (Rocca e Brubaker, 1999). A combinação de ações endócrinas e os sinais neuronais são provavelmente responsáveis por esta secreção rápida. Em indivíduos saudáveis, as incretinas podem ser responsáveis por 70% da secreção de insulina estimulada pela ingestão de glicose.

O GLP-1 inibe a secreção de glucagon (Ørskov et al., 1988; Schirra et al., 2006), diminui o esvaziamento gástrico, diminui a glicemia pós-prandial por atrasar o relaxamento gástrico e influência na saciedade por causar distanção do estômago (Wettergren et al., 1993; Nauck et al., 1997a; Nauck et al., 1997b; Naslund et al., 1999; Andrews et al., 2007; Flint et al., 1998). Além disso, o GLP-1 diminui o peso corporal por ações nos adipócitos e no sistema nervoso central (SNC), influenciando a ingestão calórica e o gasto energético (Kastin et al., 2002).

A ação dos hormônios incretinas, GIP e GLP-1, se dá por ação em receptores específicos ligados a proteína G, o GIP apresenta 2 subtipos (1 e 2) expressos nas células α e β pancreáticas e também no tecido adiposo, trato gastrointestinal superior, supra renal, osso e várias regiões cerebrais. O receptor do GLP-1 está presente nas células α , β e δ pancreáticas, nas células da mucosa gástrica e do intestino delgado, miócitos cardíacos e várias regiões cerebrais, principalmente no hipocampo (Amiranoff et al., 1984; Wheeler et al., 1995; Thorens e Widmann, 1996; Bollag et al., 2000; Drucker, 2006; Leon et al., 2006). A ativação desses receptores leva a um aumento da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) com ativação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), com conseqüente alteração dos canais iônicos aumentando o cálcio intracelular e provocando a exocitose de insulina (Drucker et al., 1987; Holz, 2004; Holz et al., 2006).

A infusão de GLP-1 intravenoso abaixa os níveis da glicose sanguínea em pacientes diabéticos pela estimulação da secreção de

insulina, pela supressão da secreção do glucagon e do esvaziamento gástrico (Nauck et al., 1993; Willms et al., 1996; Toft-Nielsen et al., 2001b). Uma infusão por 6 semanas em pacientes diabéticos leva a uma substancial melhora da capacidade secretora de insulina bem como da sensibilidade de insulina, e reduz HbA1c em torno de 1,2 % bem como o peso corporal em 1,9 kg (Zander et al., 2002). Estes efeitos do GLP-1 em diminuir a glicose plasmática está preservada até nos pacientes diabéticos tipo 1 onde não há função de célula β residual (Creutzfeldt et al., 1996). O diferencial em relação a outras terapias como as sulfaniluréias, é que estes estímulos são glicose dependentes, ou seja, quando os níveis de glicose atingem os níveis normais, a insulina e o glucagon também voltam ao níveis normais (Nauck et al., 1993). Além disso, o GLP-1 estimula a proliferação de célula β e inibe a apoptose da mesma, sendo proposto que poderia mudar o curso da doença, por exemplo, prolongando o tempo de início se usado precocemente (Finegood et al., 1995; Xu et al., 1999; Bonner-Weir, 2000; Stoffers et al., 2000; Buteau et al., 2001; Butler et al., 2003, Farilla et al., 2003; Buteau et al., 2004; Baggio e Drucker, 2006).

Entretanto, após secretado esses hormônios apresentam uma meia vida de 3 a 5 minutos antes de serem degradados por proteases, da qual a dipeptidil peptidase IV (DPP-4) é a mais importante, e eliminados pelos rins (Ørskov et al., 1993). Assim, o uso terapêutico desses hormônios se torna inviável, o que levou ao desenvolvimento de estratégias farmacêuticas, como por exemplo, a síntese de peptídeos resistentes a degradação (Nielsen e Baron, 2003). O exendin 4, isolado da saliva do Monstro de Gila, é mais estável e menos degradado que o GLP-1 nativo, ele se liga ao receptor pancreático do GLP-1, melhorando a homeostase da glicose, mimetizando as ações que ocorrem com o GLP-1 endógeno, por estimular a secreção de insulina glicose dependente, melhorar a liberação de insulina na primeira fase, atrasar o esvaziamento gástrico e diminuir a ingestão alimentar (Egan et al., 2003; Kolterman et al., 2003; Degn et al., 2004; Kolterman et al., 2003; Blase et al., 2005). A liraglutida é um análogo de GLP-1 de ação longa que forma um complexo ligando-se a albumina, permitindo a sua liberação lenta. Tem o efeito de inibir o apetite, a ação do glucagon, aumentar a massa de células β e inibir a apoptose celular. Os efeitos clínicos são similares ao exendin 4, e a perda de peso parece ser um pouco maior, dose dependente (Bregenholt et al., 2001; Rolin et al., 2002; Nauck et al., 2003).

Devido à sua rápida clivagem e inativação, uma terapia com GLP-1 nativo administrado por via parentérica não é viável para o

tratamento contínuo da diabetes; isto transforma os inibidores da DPP-4 um interessante objeto de estudo, uma vez que a inibição desta enzima resulta no aumento dos níveis circulantes de GLP-1 biologicamente ativos.

1.1.5.1 Inibidores da DPP-4

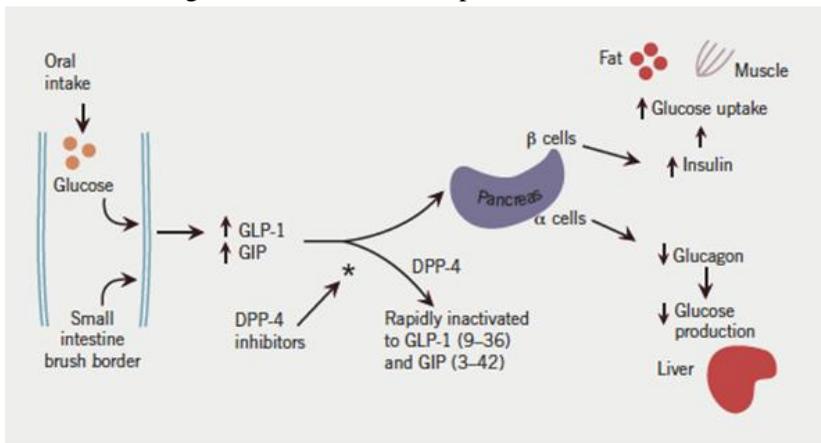
A DPP-4 é uma glicoproteína de superfície, expressa em tecidos como fígado, pulmão, rins, intestino, linfócitos e células endoteliais (Imai et al., 1992; Darmoul et al., 1994; De Meester et al., 2000; 2003). Além do sangue, ela também é encontrada na urina, no fluido seminal e no líquido amniótico (Iwaki Egawa et al., 1998; Wilson et al., 1998).

A DPP-4 cliva preferencialmente as cadeias peptídicas nas quais está presente a alanina ou prolina na posição 2 do terminal-N da cadeia peptídica. O GLP-1 ativo (7-36) é rapidamente degradado pela enzima DPP-4, originando um metabolito inativo GLP-1 (9-36), enquanto a forma ativa do GIP (1-42) é também rapidamente inativa pela enzima DPP-4, originando um metabolito inativo GIP (3-42) (Drucker, 2003).

Os inibidores da DPP-4 são moléculas de uso oral, capazes de reduzir a atividade sérica dessa enzima, podendo apresentar esse efeito por 24 horas, levando a um aumento dos níveis pós-prandiais de GLP-1 e GIP, levando assim a estimulação da secreção de insulina, inibição da secreção do glucagon, preservação da massa de células β com inibição da apoptose celular (Drucker et al., 1987; Åhren et al., 2004a; Åhren et al., 2004b; Deacon, 2004; McDougall et al. 2011) (Figura 1). Além disso, estudos têm demonstrado uma melhora dos marcadores de resistência insulina com o uso dos inibidores de DPP-4, mas não perda de peso como observado com a utilização dos análogos de GLP-1, provavelmente porque a inibição da enzima não eleva os níveis de GLP-1 como os análogos, não apresentando efeitos sobre o esvaziamento gástrico e a saciedade, mas em comparação com outros fármacos, como sulfanilureias e tiazolidenos, observa-se o benefício do não ganho de peso (Vella et al., 2007).

Atualmente estão disponíveis no mercado quatro apresentações farmacêuticas que apresentam como mecanismo de ação a inibição da DPP-4, sendo elas, saxagliptina, sitagliptina, linagliptina e vildagliptina, ambas são inibidores competitivos reversíveis com elevada afinidade para a DPP-4 (Deacon, 2011).

Figura 1: Efeitos dos inibidores de DPP-4. Glicose oral estimula a liberação das incretinas endógenas GLP-1 e GIP, estes estimulam a liberação de insulina e inibem a liberação de glucagon, resultando em uma diminuição da glicemia. Essas incretinas são rapidamente inativadas pela DPP-4, e os inibidores da DPP-4 prolongam a ação dessas incretinas endógenas, aumentando a resposta da insulina



Fonte: McDougall et al. 2011.

1.1.5.1.1 Saxagliptina

A saxagliptina é um potente e seletivo inibidor da DPP-4, aprovado para uso em conjunto com dieta e atividade física, para melhorar o controle glicêmico dos pacientes diabéticos tipo 2 (Tahrani et al., 2009). Como monoterapia a saxagliptina 2,5 mg, 5 mg e 10 mg leva uma melhora significativa dos índices glicêmicos em pacientes diabéticos quando comparados com placebo, sem efeitos colaterais importantes como hipoglicemias e ganho de peso (Rosenstock et al., 2009).

A saxagliptina é rapidamente absorvida após administração oral em jejum, com as concentrações plasmáticas máximas atingidas entre 2 e 4 horas, não apresenta ligação com proteínas plasmáticas, e a sua excreção ocorre tanto pela via renal como pela hepática, sendo que na

urina 24% da dose administrada é eliminada na sua forma inalterada e 34% sob a forma do seu principal metabolito. A saxagliptina é 10 vezes mais potente do que qualquer inibidor da DPP-4, isso com base em cálculos da sua afinidade de ligação com a DPP-4, embora isso não se traduza clinicamente (Wang et al., 2008; Tahrani et al., 2009; Kirby et al., 2010).

1.1.5.1.2 Sitagliptina

Aprovado nos EUA e não na Europa como monoterapia, bem como terapia coadjuvante a metformina e ou glitazona. Atualmente, existem combinações aprovadas com metformina e glitazonas e sulfanilureias, e particularmente a combinação com metformina mostram uma melhora acentuada na função da célula β , provavelmente por mecanismos diferentes, sendo descrito como um inibidor altamente seletivo, por não apresentar atividade inibitória sobre outros membros da família da DPP-4, com uma dose usual de 100 mg uma vez ao dia (Aschner et al., 2006; Charbonnel et al., 2006; Karasik et al., 2006; Rosenstock et al., 2006).

O fármaco é bem absorvido por via oral e sua biodisponibilidade gira em torno de 87%. A concentração máxima gira em torno de 1 a 4 horas após ingerida, apresenta uma baixa ligação a proteínas plasmáticas, em torno de 37%, e a sua excreção é renal. Em pacientes com insuficiência renal a dose deve ser reduzida pela metade ou um quarto, e também pode ser reduzida quando combinada com outros fármacos. Efeitos colaterais discretos como rinorréia, obstrução nasal, diarreia, cefaléia e artralgias podem ser observados. Há relatos de casos isolados de anafilaxia, angioedema, síndrome de Stevens Johnson, e apresenta contra indicação para pacientes com insuficiência renal grave. Apesar da sitagliptina ser metabolizada pela via metabólica do citocromo P450, não são esperadas interações, a não ser em caso de insuficiência renal grave, neste caso fármacos como cetoconazol, itraconazol, ritonavir ou eritromicina podem interferir no seu metabolismo (Verspoh, 2012).

1.1.5.1.3 Linagliptina

A linagliptina é um inibidor altamente seletivo da DPP-4, que foi recentemente aprovado para o tratamento da diabetes tipo 2 nos EUA, Europa e Brasil (Aletti e Cheng-Lai, 2012; Gallwitz, 2013; Rauch et al., 2012). Estudos pré-clínicos demonstram que a linagliptina inibe a

enzima DPP-4 de forma mais potente do que outros inibidores de DPP-4, tais como sitagliptina, vildagliptina e saxagliptina e com um maior tempo duração da sua ação por apresentar uma alta ligação com proteínas plasmáticas (99%) (Thomas et al., 2008; 2009). Outra vantagem da linagliptina, em comparação com os demais medicamentos dessa classe, é que a mesma é eliminada pela via biliar/hepática, e não pelos rins, assim pode ser usado sem modificação da dose em pacientes com insuficiência renal, uma complicação comum na DM tipo 2 (Barnett, 2011; Graefe-Mody et al., 2012).

1.1.5.1.4 Vildagliptina

A vildagliptina é rapidamente absorvida após a administração oral (He, 2007a, He, 2007b), atingindo a sua concentração plasmática máxima em 1,75 horas. Alcança cerca de 100% da sua ação enzimática inibitória após 15 a 30 minutos de sua ingestão, que é mantida por aproximadamente 16 horas. Além disso, apresenta baixa ligação com proteínas plasmáticas, e sua excreção ocorre principalmente pela urina (85%), e pelas fezes. Não é necessário ajuste posológico com base na idade, sexo, índice de massa corporal, ingestão de alimentos, presença de insuficiência hepática ou uso concomitante de medicamentos (He et al., 2007c; He et al., 2008; Sunkara, 2007).

A vildagliptina, tem-se mostrado muito eficaz na redução dos níveis glicêmicos e também do controle da HbA1c (Bolli et al., 2008; Ferrannini et al., 2009). Além disso, estudos revelaram que a vildagliptina aumenta melhora a sensibilidade da células β a glicose, melhora a função da células α , a sensibilidade periférica a insulina, e diminui a lipemia pós-prandial, mas não tem efeitos no esvaziamento gastrico (Pratley et al., 2006; Rosenstock et al., 2006; Garber et al., 2007). A melhora da função das células α , melhora a relação glucagon/insulina, o que esta associado a uma diminuição da produção endógena de glicose no período pós-prandial e pós-absortivo, refletindo assim uma dupla ação da vildagliptina, melhorando a glicemia pós-prandial e a glicose de jejum (Balas et al., 2007)

1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, como, por exemplo, o transporte ativo de íons e moléculas, síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples e para a contração muscular. A energia necessária para realizar essas

funções é obtida com a oxidação de substâncias pela respiração celular. Adenosina trifosfato (ATP) é o principal combustível da célula na maioria dos processos que precisam de energia. A energia é liberada pela hidrólise de ATP e serve para impulsionar uma série de reações (Lehninger et al., 2007; Voet et al., 2008).

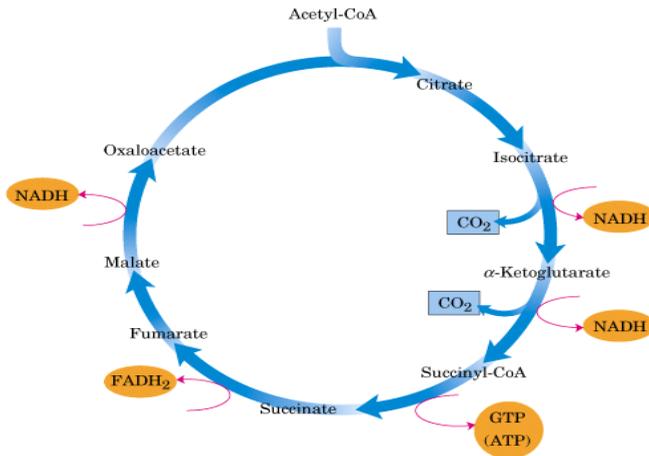
A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo, sendo transportada para dentro das células por proteínas transportadoras específicas. Ao entrar na célula, a glicose pode ser metabolizada em diferentes rotas metabólicas. A principal via de degradação da glicose é a glicólise, uma rota que envolve uma sequência de reações que ocorre no citosol e forma como produto final o piruvato. Uma molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato e de ATP. Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase, que forma acetil coenzima A (acetil-CoA), que vai iniciar o ciclo de Krebs. É importante salientar que a acetil-CoA pode ser formada também pela oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008).

1.2.1 Ciclo de Krebs

Em 1937 Hans Krebs descobriu uma série de 8 reações cíclicas mitocondriais, denominado como ciclo de Krebs. Quatro destas reações são oxidativas e liberam energia que é conservada sob a forma de coenzimas reduzidas.

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste de uma sequência de reações onde, em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), uma de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH_2), duas de CO_2 e uma de guanosina trifosfato (GTP). O NADH e FADH_2 produzidos no ciclo de Krebs são carreadores de elétrons e são utilizados na cadeia respiratória para a produção de ATP na fosforilação oxidativa (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008). Altos níveis de ATP inibem o ciclo de Krebs por mecanismos complementares em vários locais do ciclo. Um dos pontos de controle é a conversão de piruvato a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, inibida por ATP, acetil-CoA e NADH (Williamson e Cooper, 1980).

Figura 2: Esquema de reações do Ciclo de Krebs



Fonte: Lehninger et al., 2007

1.2.2 Cadeia Respiratória

A ação conjunta do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte da produção de ATP gerada pelos seres humanos, ou seja, a fosforilação oxidativa trata-se de um sistema mitocondrial que acopla à respiração a geração de um intermediário de

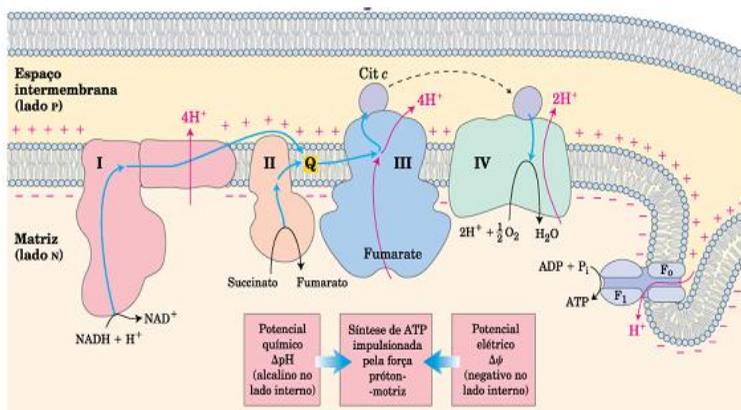
alta energia, neste processo, equivalentes redutores, principalmente as formas reduzidas da NADH e FADH₂ (Lehninger et al., 2007).

Cinco complexos enzimáticos compõem a cadeia respiratória, onde a síntese de ATP ocorre após uma gradativa transferência de elétrons NADH e FADH₂ para a redução do O₂. Este conjunto de enzimas encontra-se na membrana interna da mitocôndria e são designados complexos I (NADH desidrogenase), II (succinato Q oxidorreductase), III (Q citocromo c oxidorreductase) e IV (citocromo c oxidase). A cadeia respiratória possui também dois transportadores móveis de elétrons entre os complexos, são eles a coenzima Q, um componente não proteico lipossolúvel que carrega elétrons entre os complexos I e III, e o citocromo c, uma proteína localizada na face externa da membrana que transfere elétrons do complexo III para o complexo IV. Os elétrons presentes nas coenzimas NADH e FADH₂ provenientes do ciclo de Krebs são transferidos para os complexos I e II, respectivamente, do complexo I e II para coenzima Q, depois para o complexo III, citocromo c, complexo IV e finalmente para o oxigênio (Lehninger et al., 2007; Navarro e Boveris, 2007; Berg et al., 2008).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Com isso, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana utilizado por um quinto complexo proteico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação da adenosina difosfato (ADP) (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008).

Figura 3: Cadeia respiratória mitocondrial e fosforilação oxidativa.

Fonte: Lehninger et al., 2007.



1.2.3 Creatina quinase

A creatina quinase é uma enzima descoberta por Karl Lohman, em 1934, que tem um papel importante no metabolismo energético. Funciona como um sistema de tampão efetivo para os níveis celulares de ATP, principalmente nos tecidos de alta demanda energética como, cérebro, músculo cardíaco e esquelético (Pilla et al., 2003). A reação da creatina quinase regenera ATP através da transferência metabolicamente reversível do grupamento N-fosforil da fosfocreatina para o ADP (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Pilla et al., 2003; Berg et al., 2008).

O sistema creatina quinase/creatina/fosfocreatina mostra diferentes funções integradas, isto é, tamponamento de energia, capacidade metabólica, transferência de energia e controle metabólico. Desta forma este sistema é reconhecido como um regulador metabólico importante entre a saúde e a doença (Pilla et al., 2003). A creatina quinase parece estar envolvida em certas condições patológicas relacionadas com déficit de energia cerebral, foi postulado que o prejuízo na função da creatina quinase possa ter um papel crítico no processo neurodegenerativo e neuromuscular (Tomimoto et al., 1993; David et al., 1998, Aksenov et al., 1999).

2 JUSTIFICATIVA

Manter um controle glicêmico nos pacientes diabéticos tem se tornado um grande desafio, já que os pacientes apresentam dificuldades em aderir hábitos de vida saudáveis. Os fármacos orais clássicos disponíveis para tratamento do DM tem se mostrado incapazes de impedir o curso da doença e de manter o bom controle metabólico em longo prazo, o que vem motivando a pesquisa de novos fármacos. Uma nova classe de medicamentos baseados nas incretinas tem se demonstrado promissor, visto que elas atuam em um mecanismo diferente de todos os outros fármacos, e são capazes de reduzir os níveis glicêmicos sem causar os efeitos colaterais, como a hipoglicemia e o ganho de peso. No entanto, apesar de alguns desses agentes já terem sido aprovados para o tratamento do DM pelas autoridades reguladoras, eles têm ainda um longo caminho a percorrer até que os estudos de fase IV e a experiência clínica estabeleçam com mais certeza os seus reais benefícios, efeitos extra-glicêmicos, perfil de segurança e as vantagens e desvantagens face aos hipoglicemiantes orais classicamente utilizados. Além disso, seus efeitos comparativos sobre parâmetros metabólicos, bem como a função mitocondrial ainda não estão claros. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de diferentes inibidores de DPP-4 sobre parâmetros do metabolismo energético em cérebro, coração e fígado de ratos adultos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração subcrônica de diferentes inibidores de DPP-4 sobre parâmetros do metabolismo energético em cérebro, coração e fígado de ratos adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas da cadeia respiratória (complexo I, II, II-III e IV) em hipocampo, estriado, córtex cerebral, cerebelo, coração e fígado de ratos adultos submetidos à administração subcrônica de linagliptina, sitagliptina, saxagliptina e vildagliptina.
- Avaliar a atividade das enzimas succinato desidrogenase, malato desidrogenase e creatina quinase em hipocampo, estriado, córtex cerebral, cerebelo, coração e fígado de ratos adultos submetidos à administração subcrônica de linagliptina, sitagliptina, saxagliptina e vildagliptina.

4 METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos e a Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA (CONCEA, 2013). Além das recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório. Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo número 076-2014-01.

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Animais: Foram utilizados 30 ratos adultos (60 dias de idade) machos da linhagem Wistar, pesando entre 250-300 g, obtidos através do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os ratos foram colocados em caixas em grupos de cinco, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) (Claro 7:00h) e comida e água *ad libitum*, com ambiente mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. As caixas dos animais foram trocadas diariamente, bem como alimentação e água, de modo a mantê-los com o mínimo possível de conforto.

Diluição dos medicamentos: Os inibidores de DPP-IV (linagliptina, sitagliptina, vildagliptina e saxagliptina) utilizados nesse experimento são os mesmos vendidos na clínica. A linagliptina (Trayenta[®]) foi adquirida da Indústria Farmacêutica Boehringer Ingelheim, a sitagliptina (Januvia[®]) foi adquirida da Indústria Farmacêutica MSD, a vildagliptina (Galvus[®]) foi adquirida da Indústria Farmacêutica Novartis e a saxagliptina (Onglyza[®]) foi adquirida da Indústria Farmacêutica Bristol-Myers Squibb. Para o experimento, os comprimidos foram moídos em um gral de porcelana com auxílio de pistilo e diluídos em salina, em volume proporcional a dose testada, e administrado segundo a premissa de 1mL/kg de peso corporal do animal. Os animais do grupo controle receberam apenas a solução veículo.

Administração dos inibidores de DPP-IV: Os animais receberam uma administração diária de linagliptina (1 mg/kg), sitagliptina (10 mg/kg), vildagliptina (10 mg/kg), saxagliptina (10 mg/kg) ou água, por via oral com o auxílio de uma agulha de gavagem, durante quatorze dias (6 animais por grupo) (Poucher et al., 2012; Reimer et al., 2012; Avila et al., 2013; Jones et al., 2014).

4.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

4.2.1 Preparo dos tecidos

Vinte e quatro horas após a última administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação e o cérebro, coração e fígado foram removidos. O hipocampo, estriado, cerebelo, córtex cerebral, coração e fígado foram rapidamente isolados e homogeneizados em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trizma base 10 mM e heparina 50 IU/mL, pH 7,4) na proporção 1:10 (p/v) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 800×g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi separado e armazenado a -80°C para a dosagem da atividade das enzimas do ciclo de Krebs, complexos da cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase. O teor de proteína foi determinado utilizando o método descrito por Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

4.2.2 Atividade das enzimas do Ciclo de Krebs

Determinação da atividade da enzima succinato desidrogenase: Para a medida da atividade da enzima succinato desidrogenase, ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 1 mM e 2,6-dicloroindofenol (DCIP) 9 µM, foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 µg de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 µM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP é determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer et al., 1985).

Atividade da malato desidrogenase: A atividade NADH-específica da malato desidrogenase foi avaliada espectrofotometricamente conforme o método descrito por Kitto (1969). A reação foi iniciada após a adição de oxaloacetato e o consumo de NADH foi acompanhado através da redução da absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C.

4.2.3 Atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial

Determinação da atividade do Complexo I (NADH desidrogenase): O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (100 mM, pH 7,4), FeCN (10 mM) e Rotenona (1,0 mM). A reação foi iniciada

pela adição de 14 mM de NADH, as absorbâncias foram registradas por 3 minutos a 420 nm. A Atividade do complexo I foi medida por meio da determinação da taxa de redução do FeCN dependente de NADH (Cassina e Radi, 1996).

Determinação da atividade do Complexo II (succinato: DCIP oxirredutase): O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 μ M). Inicialmente foi incubado com 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μ M de rotenona e a reação iniciou com adição de 40 μ M de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do DCIP (Fischer et al., 1985).

Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase): O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μ M de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 μ g/mL de citocromo *c* e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo *c* (Fischer et al., 1985).

Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase): O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), dodecil-maltisídeo (0,6 mM) e 10-20 μ g de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 μ g de citocromo *c* reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C por 10 minutos. A atividade da citocromo *c* oxidase foi medida pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido. As leituras foram feitas a 550 nm (Rustin et al., 1994).

4.2.4 Atividade da Creatina Quinase

O meio de incubação para dosagem da creatina quinase foi composto por fosfocreatina e ADP. A formação de creatina foi medida por um método colorimétrico de acordo com Hughes (1962).

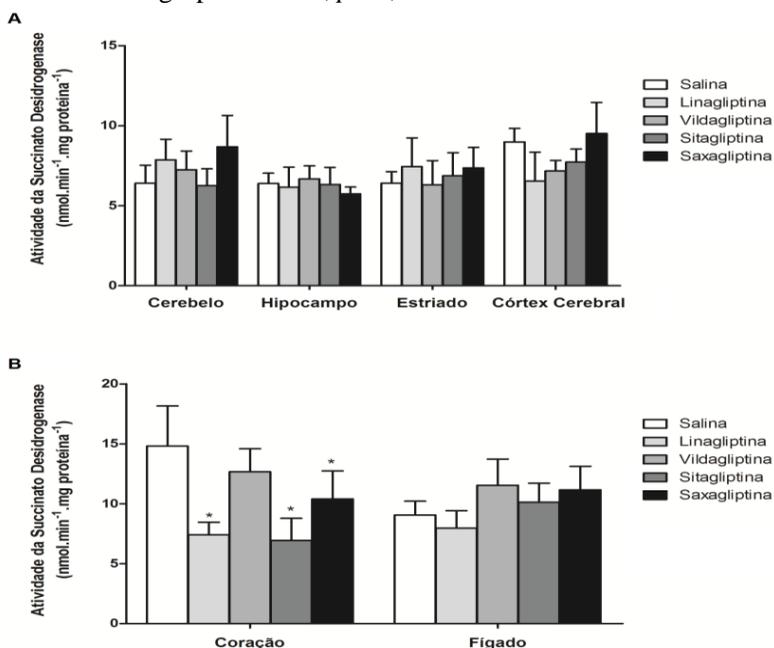
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pela análise de variância de uma-*via* (ANOVA), seguindo pelo teste de Tukey, quando *F* foi significativo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Em todas as análises, o *p* foi considerado significativo quando menor que 0,05.

5 RESULTADOS

Primeiro, analisou-se os efeitos da administração subcrônica dos inibidores de DPP-4 sobre a atividade das enzimas do ciclo de Krebs. Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina não alterou a atividade da succinato desidrogenase no cerebelo, hipocampo, estriado e córtex cerebral (Figura 4A). Entretanto, observou-se uma inibição da succinato desidrogenase após a administração de linagliptina, sitagliptina e saxagliptina no coração, enquanto que no fígado não houve diferença significativa em nenhum dos fármacos analisados (Figura 4B).

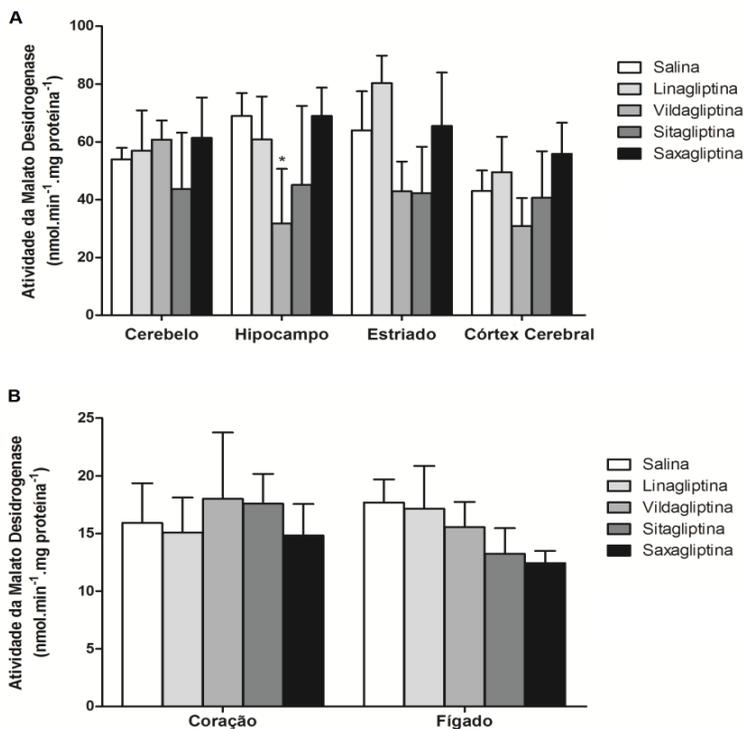
Figura 4. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade da succinato desidrogenase em cerebelo, hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$.



Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

Com relação à atividade da malato desidrogenase, observou-se uma inibição dessa enzima apenas no hipocampo após a administração de vildagliptina, enquanto a linagliptina, sitagliptina e saxagliptina não alteram a atividade dessa enzima em nenhuma das estruturas analisadas (Figura 5A). Além disso, demonstrou-se também que a administração de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina não alterou a atividade da malato desidrogenase no coração e fígado de ratos (Figura 5B).

Figura 5. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade da malato desidrogenase em cerebelo, hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$.

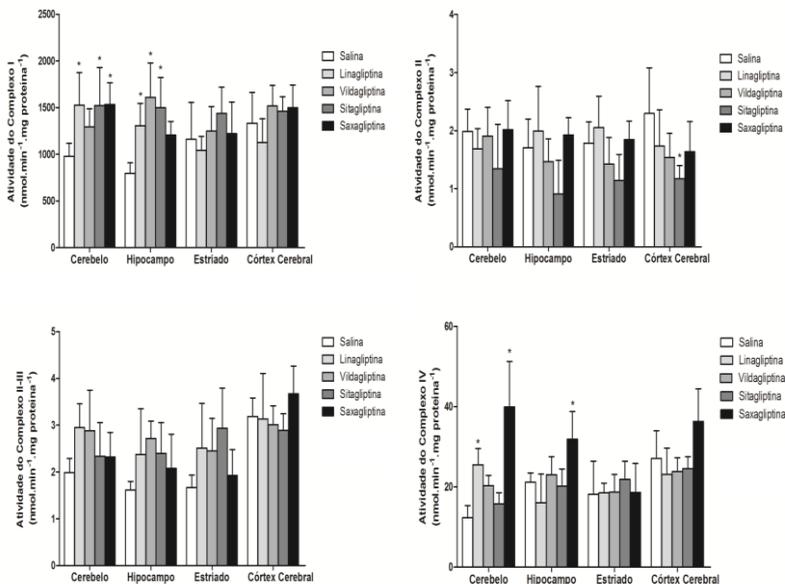


Fonte: Dados obtidos pela pesquisa

O próximo passo do estudo foi avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória após a administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina. Os resultados do presente estudo demonstram que um aumento da atividade do complexo I no cerebelo após a administração de linagliptina, sitagliptina e saxagliptina, e no hipocampo após a administração de linagliptina,

sitagliptina e vildagliptina, enquanto que no estriado e no córtex cerebral não foram observadas alterações significativas (Figura 6A). Observou-se também que a administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina não alterou a atividade dos complexos II e II-III em nenhuma das estruturas analisadas (Figura 6B e 6C, respectivamente). Por fim, a atividade do complexo IV foi aumentada após a administração de linagliptina e saxagliptina no cerebelo, e no hipocampo apenas após a administração de saxagliptina. Similar ao complexo I, não observou-se diferenças significativas na atividade do complexo IV no estriado e no córtex cerebral após a administração dos diferentes inibidores de DDP-4 (Figura 6D).

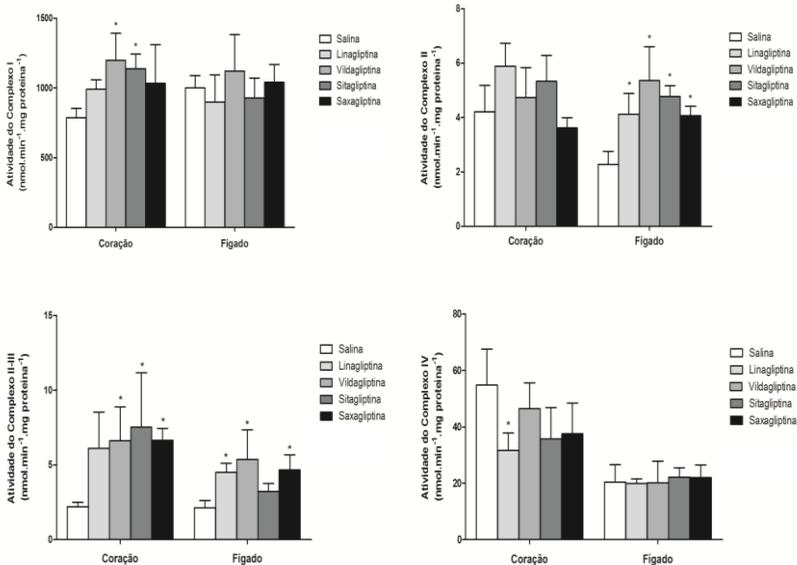
Figura 6. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em cerebelo, hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$



Fonte: Dados obtidos pela pesquisa

Com relação ao coração e ao fígado, observou-se um aumento na atividade do complexo I no coração após a administração de vildagliptina e sitagliptina, enquanto que no fígado nenhuma alteração foi observada (Figura 7A). Já com relação à atividade do complexo II, observou-se um aumento da atividade desse complexo apenas no fígado após a administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina (Figura 7B). A atividade do complexo II-III foi aumentada no coração após a administração de vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina, enquanto que no fígado o aumento da atividade desse complexo foi observado após a administração de linagliptina, vildagliptina e saxagliptina (Figura 7C). Com relação à atividade do complexo IV, demonstrou-se uma inibição desse complexo no coração após a administração de linagliptina (Figura 7D).

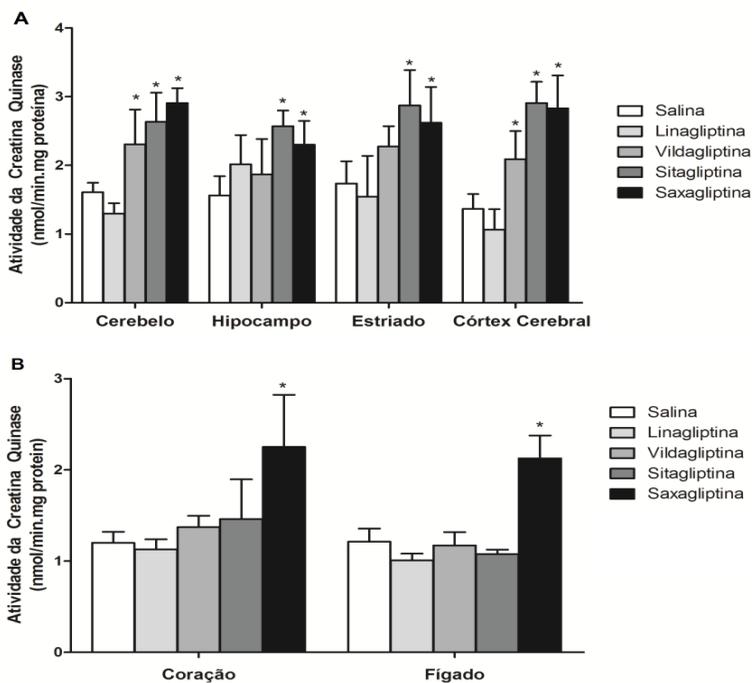
Figura 7. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial em coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$.



Fonte: Dados obtidos pela pesquisa

O último passo deste estudo foi avaliar a atividade da creatina quinase após a administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina. Os resultados demonstraram um aumento na atividade da creatina quinase no cerebelo e córtex cerebral após a administração de vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina, enquanto que no hipocampo e estriado o aumento da atividade da creatina quinase foi observado após a administração de sitagliptina e saxagliptina (Figura 8A). Além disso, observou-se também que a administração de saxagliptina aumentou a atividade da creatina quinase no coração e fígado, enquanto que os demais inibidores de DDP-4 não demonstraram diferenças significativas (Figura 8B).

Figura 8. Efeitos da administração subcrônica de linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina sobre a atividade creatina quinase em cerebello, hipocampo, estriado, córtex cerebral, coração e fígado de ratos adultos. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Dados foram avaliados por análise de uma via ANOVA seguido pelo teste Tukey quando F foi significativo. *Diferente do grupo controle; $p < 0,05$



Fonte: Dados obtidos pela pesquisa.

6 DISCUSSÃO

A incapacidade dos fármacos hipoglicemiantes orais clássicos em impedir o curso da doença e manter um bom controle metabólico a longo prazo tem motivado a investigação de novas vias fisiológicas envolvidas na homeostasia da glicose. O uso de agentes baseados no efeito dos hormônios incretinas para o tratamento de pacientes diabéticos é deveras promissor, visto que os mesmos atuam através de um mecanismo de ação distinto dos fármacos até então utilizados nesta patologia, reduzindo os níveis de glicemia semelhante a estes agentes hipoglicemiantes orais, com o mínimo risco de hipoglicemias.

Existem 2 hormônios incretinas principais: GLP-1, sintetizado nas células L localizadas no íleo e no cólon e o GIP, sintetizado nas células K localizadas no duodeno. Ambas têm tempos de meia-vida curtos em virtude da sua inativação pela DPP-4 (Nauck et al., 1993), uma enzima de ampla expressão, livremente circulante e ligada às membranas, que se encontra presente nas células da maioria dos tecidos, incluindo células do aparelho gastrointestinal, fígado, rins, linfócitos e células endoteliais (Ahrén, 2003).

Inibidores da DPP-4, incluindo linagliptina, vildagliptina, sitagliptina e saxagliptina, são fármacos anti-diabéticos orais que inibem a enzima DPP-4, resultando numa ação prolongada do GLP-1, que por sua vez, estimula a secreção de insulina, diminui a secreção de glucagon e ainda retarda o esvaziamento gástrico, levando à diminuição da ingestão de alimentos.

Vários estudos têm relatado que o GLP-1 possui efeitos benéficos que resultam em uma diminuição dos níveis de glicose e um aumento dos níveis de insulina no plasma em modelos de diabetes tipo 2 (Mari et al., 2005; Tremblay et al., 2011) Além disso, os inibidores de DPP-4 mostram um efeito benéfico sobre parâmetros metabólicos e sobre o coração, melhorando a função cardíaca (Ahren et al., 2004; Buse et al., 2004; Bose et al., 2005; Poornima et al., 2008; Lenski et al., 2011; Apaijai et al., 2012). Embora os efeitos dos inibidores da DPP-4 têm sido estudados, seus efeitos comparativos sobre parâmetros metabólicos, bem como a função mitocondrial ainda não estão claros.

A terapia baseada em incretinas tem mostrado efeitos benéficos no risco cardiovascular, ações já estabelecidas são diminuição da glicose, redução de peso, redução da pressão arterial, redução do colesterol total e LDL, e aumento do HDL, o que tem motivado o uso cada vez mais destes fármacos principalmente em pacientes com

complicações cardiovasculares, porém os efeitos a longo prazo ainda precisam ser elucidados (L Pala et al., 2013)

Estudos têm demonstrado que a função mitocondrial tem implicações na fisiopatologia da diabetes em diferentes células e tecidos. Choo et al. (2006) demonstraram uma diminuição na respiração celular e na oxidação de ácidos graxos em camundongos diabéticos tipo 2. Além disso, foi demonstrado também uma diminuição no número de mitocôndrias, indicados pela diminuição nos níveis de mtDNA e pela marcação histológica com *MitoTracker*. Boushel et al. (2007) examinaram a função mitocondrial em fibras musculares esqueléticas permeabilizadas de 11 indivíduos com diabetes tipo 2, demonstrando uma redução no consumo de oxigênio sob condições de estimulação com ADP e desacoplamento máximo induzido por FCCP nos indivíduos diabéticos em comparação com os controles não-diabéticos. Além disso, estudos de espectroscopia de prótons por ressonância magnética têm demonstrado uma diminuição na fosforilação oxidativa, na síntese de ATP e na oxidação de substratos no ciclo do Krebs em filhos de pacientes com DM tipo 2 (Petersen et al., 2004; 2005; Morino et al., 2005; Befroy et al., 2007).

Neste estudo foi demonstrado que a administração subcrônica de linagliptina aumentou a atividade dos complexos I e IV no hipocampo e cerebelo, enquanto que no fígado houve um aumento na atividade dos complexos II e II-III. Entretanto, no coração observou-se uma inibição da atividade do complexo IV e da succinato desidrogenase. Já a administração de vildagliptina aumentou a atividade do complexo I no hipocampo, e a atividade da creatina quinase no cerebelo e córtex cerebral. No fígado observou-se um aumento na atividade dos complexos II e II-III, enquanto que no coração houve um aumento na atividade dos complexos I e II-III. A administração de sitagliptina causou um aumento na atividade do complexo I no hipocampo e cerebelo, enquanto que a atividade do complexo II foi diminuída no córtex cerebral. Observou-se também um aumento na atividade da creatina quinase em todas as estruturas cerebrais analisadas. Já no fígado observou-se um aumento apenas na atividade do complexo II, e no coração um aumento na atividade dos complexos I e II-III, ao passo que a atividade da succinato desidrogenase foi inibida nessa estrutura. Por fim, demonstrou-se que a administração de saxagliptina aumentou a atividade dos complexos I e IV no hipocampo e cerebelo, e a atividade da creatina quinase no hipocampo, cerebelo, estriado e córtex cerebral. No fígado observou-se um aumento na atividade dos complexos II e II-III e da creatina quinase, enquanto que no coração demonstrou-se um

aumento da atividade do complexo II-III e da creatina quinase, e uma diminuição da succinato desidrogenase.

Nossos dados são consistentes com estudos anteriores que mostraram os inibidores de DPP-4 restauram a função mitocondrial no cérebro e coração de ratos com resistência a insulina, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial, impedindo a despolarização da membrana mitocondrial e prevenindo o *swelling* mitocondrial (Apaijai et al., 2013; Pintana et al., 2013; Pipatpiboon et al., 2013; Chinda et al., 2014).

Estudos têm sugerido que o mecanismo pelo qual a função mitocondrial é restaurada pelo tratamento com inibidores de DPP-4 pode ser devido à ação prolongada do GLP-1, em decorrência da inibição da DPP-4 (Baggio e Drucker, 2007; Richter et al., 2008). O GLP-1 tem mostrado efeitos contra a disfunção mitocondrial em vários tipos de células, por exemplo, demonstrou-se que o GLP-1 está envolvido na mobilização intracelular de Ca^{2+} e na estimulação da síntese de ATP mitocondrial em cultura de células β (Tsuboi et al., 2003), bem como na modulação da fosforilação oxidativa e supressão do estresse oxidativo e da produção de espécies reativas de oxigênio em camundongos (Ferreira et al., 2010; Tomas et al., 2011). Neste contexto, tem sido proposto que o Ca^{2+} é absorvido pelas mitocôndrias (Rizzuto et al., 1992; Rutter e Rizzuto, 2000), levando ao aumento na produção de NADH por desidrogenases mitocondriais e, conseqüentemente aumentar o substrato de alimentação para a cadeia respiratória (McCormack e Denton, 1980; McCormack et al., 1990; Rutter, 1990) e subsequentemente, a síntese de ATP (Kennedy et al., 1999; Ainscow e Rutter, 2001). Além disso, o aumento da concentração de Ca^{2+} pode aumentar a capacidade da cadeia respiratória diretamente (Halestrap, 1982; Robb-Gaspers et al., 1998). Consistente com este modelo, o aumento na concentração de Ca^{2+} aumenta a razão NADPH/NAD⁺ nas células β (Pralong et al., 1990) e em outros tipos de células (Rizzuto et al., 1994; Hajnoczky et al., 1995) Além disso, Kennedey et al. (1998) demonstrou que um aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial em resposta ao aumento nos níveis de glicose leva à um aumento da força próton-motriz.

Além disso, um estudo anterior demonstrou que o GLP-1 poderia impedir a senescência celular induzida por espécies reativas de oxigênio em células endoteliais (Oeseburg et al., 2010), agindo como um agente neuroprotetor, impedindo a morte celular induzida pelo H_2O_2 , através das vias fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3-Kinase) e PKA (Oeseburg et al., 2010), e impedindo a apoptose em células SH-SY5Y, induzida pelo

peptídeo β -amilóide (Li et al., 2011). A ativação de receptores de GLP-1 também pode estimular as vias de sinalização cAMP/PKA e PI3K/Akt, que apresentam efeitos benéficos sobre a mitocôndria, como o aumento de proteínas anti-apoptóticas e a sobrevivência das células e a diminuindo da produção de espécies reativas de oxigênio (Pipatiboon et al., 2013).

Apesar dos nossos resultados mostrarem um aumento do metabolismo energético com aumento da atividade da maioria dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, observamos uma diminuição do complexo IV no coração com a linagliptina e também uma diminuição da atividade da succinato desidrogenase com a linagliptina, saxagliptina e sitagliptina no mesmo órgão. A atividade da malato desidrogenase foi diminuída no hipocampo com a administração da vildagliptina, houve também uma diminuição do complexo II no córtex cerebral com a administração da sitagliptina. Estes dados devem ser mais explorados para determinar o real significado desta diminuição, ou seja se isto é benéfico ou não, pois Udell et al., 2014 mostrou que o uso da saxagliptina em pacientes diabéticos leva a um aumento do risco de internação por insuficiência cardíaca, em contrapartida, um estudo de Willians – Herman et al., 2010, não verificou diferença na taxa de eventos cardiovascular após uma meta análise efetuada envolvendo 5.429 doentes usando sitagliptina durante 1 a 2 anos. Outro estudo de Schweizer A et al., 2010 e Lamana C.,2011,em pacientes usando vildagliptina obteve-se resultados semelhantes, onde foi observado que pacientes expostos a inibidores da DPP-4 por 1 a 2 anos apresentaram risco menor de efeitos cardiovasculares.

Pra et al., 2014, avaliando os efeitos do liraglutide (um análogo do GLP1) sobre parâmetros bioquímicos em hipotálamo de ratos, mostrou uma diminuição do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial e um aumento do complexo IV. Nossos dados mostraram uma diminuição do complexo II apenas com a sitagliptina em córtex cerebral, e um aumento do complexo IV em cerebelo pela linagliptina e saxagliptina, aumento do complexo IV em hipocampo pela saxagliptina e diminuição do complexo IV no coração pela linagliptina. Com a ativação do complexo IV ocorre um aumento do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para a o espaço intermembranas com consequente produção de ATP (Huttmann et al., 2008). A inibição do complexo II pode causar uma diminuição da produção de ATP, por uma menor entrada de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, e pode favorecer a liberação de espécies reativas de oxigênio, por comprometer a redução do oxigênio a água, o que poderia prejudicar o funcionamento

das células por comprometer o metabolismo energético fato observado em hipocampo e ratos após administração crônica de femproporex (Rezim et al., 2014). Podemos especular então com nossos resultados e também de outros estudos, até que ponto existe segurança para o coração e cérebro com o uso dos inibidores da DPP-4.

Owen et al., 2000, mostraram que as ações da metformina como a diminuição da gliconeogênese, o aumento da utilização de glicose pelos tecidos periféricos e aumento da produção de lactato pelo intestino está diretamente relacionado a inibição do complexo I da cadeia respiratória. É sabido que em muitas células a inibição modesta da cadeia respiratória leva a um estímulo da expressão dos transportadores de glicose e enzimas glicolíticas levando a utilização de glicose. E já foi demonstrado que a metformina diminui a ação da DPP-4 endógena em pacientes com DM tipo 2 e em modelos animais (Lehner et al., 2004; Lindsay et al., 2005 e Green et al., 2006).

Importante colocar que os inibidores da DPP-4 podem não ser tão seletivos para a DPP-4 podendo causar inibição de outras enzimas da família das DPP-4, como a DPP-8, DPP-9 e DPP-2. E a inibição destes pode produzir alopecia, trombocitopenia, mudanças histopatológicas em vários órgãos, esplenomegalias e mortalidade em ratos (Lankas et al., 2005).

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que a administração subcrônica de diferentes inibidores de DPP-4 altera a atividade de enzimas do metabolismo energético. Tomados em conjunto os dados deste estudo e os dados já descritos na literatura, é tentador especular que o aumento na atividade de enzimas do metabolismo energético pode estar envolvido com o mecanismo pelo qual a função mitocondrial é restaurada pelo tratamento com inibidores de DPP-4. Entretanto, vale ressaltar que alguns aspectos da interação fármaco-mitocôndria ainda podem ser subestimados devido à dificuldade em prever e compreender todas as implicações potenciais da complexa fisiopatologia das mitocôndrias. Assim, mais estudos são necessários para confirmar a ação seletiva desses medicamentos no cérebro, coração e fígado.

7 PERSPECTIVAS

Avaliar a atividade das enzimas da cadeia respiratória (complexo I, II, II-III e IV) do ciclo de Krebs (succinato desidrogenase, malato desidrogenase e citrato sintase) e da creatina quinase em cérebro, coração, rim e fígado de ratos submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por dieta hiperlipídica tratados com diferentes inibidores de DPP4.

Avaliar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de proteínas carboniladas, de nitrato e nitrito e dano ao DNA em cérebro, coração, rim e fígado de ratos submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por dieta hiperlipídica tratados com diferentes inibidores de DPP4.

Avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase em cérebro, coração, rim e fígado de ratos submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por dieta hiperlipídica tratados com diferentes inibidores de DPP4.

REFERÊNCIAS

Ahren B, Gomis R, Standl E, Mills D, Schweizer A. Twelve- and 52-week efficacy of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor LAF237 in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004a; 27:2874-80.

Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004b; 89:2078-84.

Ahrén B. Gut Peptides and Type 2 Diabetes Mellitus Treatment. *Curr Diab Rep*. 2003; 3:365-72.

Ainscow EK, Rutter GA. Mitochondrial priming modifies Ca²⁺ oscillations and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochem J*. 2001; 353:175-80.

Aksenov M, Aksenova MV, Payne RM, Trojanovski JQ, Schimidt KL, Carney JM, Butterfield DA, Markesbery WR. Oxidation of cytosolic proteins and expression of creatine kinase BB in frontal lobes of Neurodegenerative disorders. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 1999; 10:158-65.

Alberti KGMM, Zimemet PZ. For the World Health Organization Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes melitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes melitus. Report of WHO consultation. Geneve: WHO; 1999

Aletti R, Cheng-Lai A. Linagliptin: the newest dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for type 2 diabetes mellitus. *Cardiol Rev*. 2012; 20(1):45-51.

American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care*. 2007; 1:S1-103.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012; S64:71235.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabtetes melitus. *Diabetes care* 2010; 33:S62-9.

American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatrics*. 2000; 105:671-80.

Amiranoff B, Vauclin-Jacques N, Laburthe M. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 123:671-6.

Andrews CN, Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Seide BM, Burton D, Baxter K, Zinsmeister AR. Nitroergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292:G1359-65.

Apajjai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Endocrinology*. 2012; 153(8):3878-85.

Apajjai N1, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of vildagliptin versus sitagliptin, on cardiac function, heart rate variability and mitochondrial function in obese insulin-resistant rats. *Br J Pharmacol*. 2013; 169(5):1048-57.

Aschner P, Kipnes MS, Lunceford JK, Sanchez M, Mickel C, Williams-Herman DE. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29:2632-7.

Ávila Dde L, Araújo GR, Silva M, Miranda PH, Diniz MF, Pedrosa ML, Silva ME, de Lima WG, Costa DC. Vildagliptin ameliorates oxidative stress and pancreatic beta cell destruction in type 1 diabetic rats. *Arch Med Res*. 2013; 44(3):194-202.

Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007; 132(6):2131-57.

Baggio LL, Drucker DJ. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. *Annu Rev Med*. 2006; 57:265-81.

Balas B, Baig MR, Watson C, Dunning BE, Ligueros-Saylan M, Wang Y, He YL, Darland C, Holst JJ, Deacon CF, Cusi K, Mari A, Foley JE, DeFronzo RA. The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin

suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:1249-55.

Barnett AH. Linagliptin: a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with a unique place in therapy. *Adv Ther.* 2011; 28(6):447-59.

Befroy DE, Petersen KF, Dufour S, Mason GF, de Graaf RA, Rothman DL, Shulman GI. Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2007; 56:1376-81.

Bendelac A, Boitard C, Bedossa P, Bazin H, Bach JF, Carnaud C. Adoptive T cell transfer of autoimmune nonobese diabetic mouse diabetes does not require recruitment of host B lymphocytes. *J Immunol.* 1988; 141:2625-8.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica.* 6ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara; 2008.

Biderman A, Rosenblatt I, Rosen S, Zangwill LM, Shalev R, Friger M, Weitzman S. Sex differentials in predictors of mortality for patients with adult-onset diabetes: a population-based follow-up study in Beer-Sheva, Israel. *Diabetes Care.* 2000; 23:602-5.

Blase E, Taylor K, Gao HY, Wintle M, Fineman M. Pharmacokinetics of an oral drug (acetaminophen) administered at various times in relation to subcutaneous injection of exenatide (exendin-4) in healthy subjects. *J Clin Pharmacol.* 2005; 45(5):570-7.

Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron R, Mulloy AL, Rasmussen H, Qin F, Ding KH, Isales CM. Osteoblast-derived cells express 126 functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors. *Endocrinology.* 2000; 141:1228-35.

Bolli G, Dotta F, Rochotte E, Cohen SE. Efficacy and tolerability of vildagliptin vs pioglitazone when added to metformin: a 24-week, randomized, double-blind study. *Diabetes Obes Metab.* 2008; 10:82-90.

Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal

tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:7999–8004.

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

Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsoe R, Dela F. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia*. 2007; 50:790-6.

Bregenholt S, Moldrup A, Knudsen LB, Petersen JS. The GLP-1 derivative NN2211 inhibits cytokine-induced apoptosis in primary rat β -cells. *Diabetes*. 2001; 50:A31.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414:813-20.

Brun E, Nelson RG, Bennett PH, Imperatore G, Zoppini G, Verlato G, Muggeo. Diabetes duration and cause-specific mortality in the Verona Diabetes Study. *Diabetes Care*. 2000; 23:1119-23.

Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:2628-35.

Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity. *Diabetologia*. 2004; 47:806-15.

Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M. Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*. 2001; 50(10):2237-43.

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52:102-10.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem*

Biophys. 1996; 328: 309-16.

Chacra A. Efeito fisiológico das incretinas. *Johns Hopkins Advanced Studies In Medicine*. 2006; 6(7b):S613-7.

Charbonnel B, Karasik A, Liu J, Wu M, Meininger G. Efficacy and safety of sitagliptin added to ongoing metformin therapy in type 2 diabetes patients who were inadequately controlled on metformin alone. *Diabetologia*. 2006; 49:5.

Chinda K, Sanit J, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischaemia-reperfusion rat heart. *Diab Vasc Dis Res*. 2014; 11(2):75-83.

Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon YS, Yoon G, Choi KM, Ko YG. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*. 2006; 49:784-91.

Creutzfeldt W. The [pre-] history of the incretin concept. *Regul Pept*. 2005; 128:87-91.

Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia*. 1979; 16:75-85.

Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7–36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care*. 1996; 19:580-6.

Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006; 367:847-58.

Darmoul D, Lacasa M, Baricalut L, Marguet D, Sapin C, Trotot P, Barbat A, Trugman G. "Dipeptidyl peptidase IV (CD26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation". *J Biol Chem*. 1992; 267:2200-8.

David S, Shoemaker M, Haley BE. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: Correlation of reduced enzyme

activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Molecular Brain Research*. 1998; 54:276-87.

De Meester I, Durinx C, Bal G, Proost P, Struyf S, Goossens F, Augustyns K, Scharpé S. Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 477:67-7.

De Meester I, Lambeir AM, Proost P, Scharpé S. Dipeptidyl peptidase IV substrates: an update on in vitro peptide hydrolysis by human DPP-IV. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 524:3-17.

Deacon CF, Ahrén B. Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud*. 2011; 8(3):293-306.

Deacon CF. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res*. 2004; 36:761-5.

Degn KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, Rungby J, Landau BR, Schmitz O. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53(5):1187-94.

Drucker D. Enhancing Incretin Action for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26:2929-40.

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habeneret JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:3434-8.

Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*. 2006; 3:153-65.

Verspohl EJ. Novel Pharmacological Approaches to the Treatment of Type 2 Diabetes. *Pharmacol Rev*. 2012; 64(2):188-237.

Egan JM, Bulotta A, Hui H, Perfetti R. GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003; 19:115-23.

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964; 24:1076–82.

Evans JMM, Wang J, Morris AD. Comparison of cardiovascular risk between patients with type 2 diabetes and those who had had a myocardial infarction: cross sectional and cohort studies. *Br Med J.* 2002; 324:939-42.

Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R. Glucagon-like Peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology.* 2002; 143:4397-4408.

Ferrannini E, Fonseca V, Zinman B, Matthews D, Ahrén B, Byiers S, Shao Q, Dejager S. Fifty-two-week efficacy and safety of vildagliptin vs. glimepiride in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin monotherapy. *Diabetes Obes Metab.* 2009; 11: 157-66.

Ferreira L, Teixeira-de-Lemos E, Pinto F, Parada B, Mega C, Vala H, Pinto R, Garrido P, Sereno J, Fernandes R, Santos P, Velada I, Melo A, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat). *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:592760.

Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes.* 1995; 44, 249-56.

Fisher JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153:23-6.

Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. GLP-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest.* 1998; 101:515-20.

Gallwitz B, Rosenstock J, Emser A, von Eynatten M, Woerle H. Linagliptin is more effective than glimepiride at achieving a composite outcome of target HbA1c <7% with no hypoglycaemia and no weight

gain over 2 years. *Int J Clin Pract.* 2013; 67:317-21.

Garber AJ, Schweizer A, Baron A, Rochotte E, Dejager S. Vildagliptin in combination with pioglitazone improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes failing thiazolidinedione monotherapy: a randomized, placebo-controlled study. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9:166-74.

Gispén WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. 2000; 23:542-9.

Graefe-Mody EU, Rose P, Retlich S, Ring A, Waldhauser L, Cinca R, Woerle HJ. Pharmacokinetics of linagliptin in patients with hepatic impairment. *Br J Clin Pharmacol.* 2012; 74:75-85.

Green BD, Duffy NA, Irwin N, Gault VA, O'Harte FP, Flatt PR. Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV (DPP IV) activity by metformin enhances the antidiabetic effects of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Eur J Pharmacol* 2006 (in press).

Grilo MRM, Sousa C, McIntyre T. Conhecimento do diabético sobre a doença e a repercussão no tratamento. *Rev Bras Promoç Saúde,* 2008; 21(4):281-289.

Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell.* 1995; 82:415-24.

Halestrap AP. The nature of the stimulation of the respiratory chain of rat liver mitochondria by glucagon pretreatment of animals. *Biochem J.* 1982; 204(1):37-47.

He YL, Sabo R, Riviere GJ, Sunkara G, Leon S, Ligueros-Saylan M, Rosenberg M, Dole WP, Howard D. Effect of the novel oral dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Curr Med Res Opin.* 2007a; 23:1131-8

He YL, Sadler BM, Sabo R, Balez S, Wang Y, Campestrini J, Laurent A, Ligueros-Saylan M, Howard D. The absolute oral bioavailability and population-based pharmacokinetic modelling of a novel dipeptidylpeptidase-IV inhibitor, vildagliptin, in healthy volunteers. *Clin*

Pharmacokinet. 2007b; 46:787-802.

He YL, Serra D, Wang Y, Campestrini J, Riviere GJ, Deacon CF, Holst JJ, Schwartz S, Nielsen JC, Ligueros-Saylan M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacokinet.* 2007c; 46:577-88.

He YL, Sabo R, Campestrini J, Wang Y, Riviere GJ, Nielsen JC, Rosenberg M, Ligueros-Saylan M, Howard D, Dole WP. The effect of age, gender, and body mass index on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65:338-46.

Herrmann M, Curio N, Jost S, Wunderlich MT, Synowitz H, Wallesch CW. Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of traumatic injury. *Restor Neurol Neurosci.* 1999; 14(2-3):109-14.

Hiranya Pintana, Nattayaporn Apaijai, Nipon Chattipakorn , Siriporn C Chattipakorn. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats, *Journal of Endocrinology* . 2013; 218, 1–1

Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW, Chepurny OG. Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol.* 2006; 577:5-15.

Holz GG. Epac – A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta cell. *Diabetes.* 2004; 53:5-13.

Hovsepyan MR, Haas MJ, Boyajyan AS, Guevorkyan AA, Mamikonyan AA, E Myers SE, Mooradian AD. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neurosci Lett.* 2004; 369:224-7.

Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chem Acta.* 1962; 7:597-604.

Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane

potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2008;40(5):445-56.

Imai K, Maeda M, Fujiwara H, Kariya M, Takakura K, Kanzaki H, Mori T. Dipeptidyl peptidase IV as a differentiation marker of the human endometrial glandular cells. *Hum Reprod.* 1992; 7:1189-94.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br>>.

Iwaki Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem.* 1998; 124(2):428-33.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 2005; 4(1):5.

Jones RB, Vickers SP, Cheetham SC, Headland KR, Mark M, Klein T. Effect of linagliptin, alone and in combination with voglibose or exendin-4, on glucose control in male ZDF rats. *Eur J Pharmacol.* 2014; 729:59-66.

Kamal A, Biessels GJ, Urban IJ, Gispen WH. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience.* 1999; 90:737-45.

Karasik A, Charbonnel B, Liu J, Wu M, Meehan A, Meininger G. Sitagliptin added to ongoing metformin therapy enhanced glycemic control and beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55:A119.

Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci.* 2002; 18:7-14.

Kennedy HJ, Pouli AE, Jouaville LS, Rizzuto R, Rutter GA. Glucose-induced ATP microdomains in single islet beta-cells. *J Biol Chem.* 1999; 274:13281-91.

Kim C, Newton KM, Knoop RH. Gestacional Diabetes and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 25:1862.

Kirby M, Ming Tse Yu D, O'Connor S, Gorrell M. Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition. *Clin Sci*. 2010; 118(1):31-41.

Kitto GB. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol XIII*. 1969; 13:106-16.

Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyoty H, Vaarala O, Akeerblom HK. Environmental Triggers and determinans of type 1 diabetes. 2005; 54:S125-36.

Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive Dysfunction and Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 2008; 29:494-511.

Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:3082-9.

Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2005; 65:385- 411.

Kroekkiat Chinda, Jantira Sanit, Siriporn Chattipakorn and Nipon Chattipakorn. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischaemia-reperfusion rat heart. *Diabetes & Vascular Disease Research* . 2014; Vol. 11(2) :75-83

Kuhl C. Insulin Secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM: Implications for diagnosis and management. *Diabetes*. 1991; 40:18.

Lamanna C, Monami M, Bartoli N, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and cardiovascular events: a protective effect? Comunicação oral apresentada na 47ª reunião Anual da EASD em Lisboa, Setembro 2011; Resumo disponível em: *Diabetologia* .2011; 54 (Suppl):S1-S542.

Lankas GR, Leiting B, Roy RS et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. *Diabetes*. 2005;54:2988-94

Lehninger AL; Nelson DL; Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 5ª ed. São Paulo: Sarvier; 2007.

Lenhard JM, Croom DK, Minnick DT. Reduced serum dipeptidyl peptidase-IV after metformin and pioglitazone treatments. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324:92-7

Lenski M, Kazakov A, Marx N, Bohm M, Laufs U. Effects of DPP-4 inhibition on cardiac metabolism and function in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51:906-18.

Leon DD, Crutchlow MF, Ham JY, Stoffers DA. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38:845-59.

Lindsay JR, Duffy NA, Mckillop AM et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2005; 22:654-7.

Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway H W, Tweedie D, Perry T, Mattson MP, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri DK, Greig NH. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011; 19:1205-19.

Libman UM, Pietropaolo M, Trucco M, Dorman JS, LaPorte RE, Becker D. Islet cell autoimmunity in white and black children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care*. 1998; 21:1824-7.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-75.

L. Pala and C. M. Rotella; The Role of DPP4 Activity in Cardiovascular Districts: In Vivo and In Vitro Evidence. *Journal of Diabetes Research* Volume. 2013, Article ID 590456, 5 pages

Lyra R, Cavalcanti N. *Diabetes Mellitus*. 2ª ed. Rio de Janeiro (RJ): AC

Farmacêutica, 2009.

Mari A, Sallas WM, He YL, Watson C, Ligueros-Saylan M, Dunning BE, Deacon CF, Holst JJ, Foley JE. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model-assessed beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:4888-94.

McCormack JG, Denton RM. A comparative study of the regulation of Ca^{2+} of the activities of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and NAD^+ -isocitrate dehydrogenase from a variety of sources. *Biochem J.* 1981; 196(2):619-24.

McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev.* 1990; 70(2):391-425.

McDougall C, McKay GA, Fisher M. Drugs for diabetes: part 5 DPP-4 inhibitors. *Br J Cardiol.* 2011; 18:130-2.

Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA.* 2006; 295(14):1681-7.

Morgan CL, Currie CJ, Peters JR. Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage. *Diabetes Care.* 2000; 23:1103-7.

Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest.* 2005; 115:3587-93.

Naslund E, Bogefors J, Skogar S, Gryback P, Jacobsson H, Holst JJ, Hellstrom PM. GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *Am J Physiol.* 1999; 277:R910-6.

Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeld W. Preserved Incretin Activity of Glucagon-like Peptide 1 [7-36 Amide] but Not of Synthetic Human Gastric Inhibitory Polypeptide in Patients with

Type-2 Diabetes Mellitus. *J Clin Invest.* 1993b; 93:301-7.

Nauck MA, Holst JJ, Willms B, Schmiegel W. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for type 2-diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997b; 105(4):187-95.

Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 63:492-8.

Nauck MA, Meier JJ, Creutzfeldt W. Incretins and their analogues as new antidiabetic drugs. *Drug News Perspect.* 2003; 16(7):413-22.

Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, Schmiegel WH. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol.* 1997a; 273:E981-8.

Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292:670-86.

Nielsen LL, Baron AD. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4) for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003; 4(4):401-5.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int.* 2000; 58:26-30.

Norhammar A, Tenerz A, Nilsson G, Hamsten A, Efendic S, Ryden L, Malmberg K. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *Lancet.* 2002; 359:2140-44.

Oeseburg H, de Boer RA, Buikema H, van der Harst P, van Gilst WH, Sillje HHW. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:1407-14.

Oeseburg H, de Boer RA, Buikema H, van der Harst P, van Gilst WH,

Sillje HH. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:1407-14.

Orchard TJ, Laporte RE, Dorman JS. Diabetes. In: Wallace RB. Maxcy, Rosenau, Last - Public Health & Preventive Medicine. 14 ed. Connecticut: Appleton & Lange; 1998. p. 969-80.

Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology.* 1988; 123(4):2009-13.

Ørskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology.* 1988; 123:2009-13.

Orskov C, Wettergren A, Holst JJ. Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes.* 1993; 42(5):658-61.

Owen M R, Doran E. and Andrew P. Halestrap A P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 2000; 348, 607-614

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2004; 350:664-71.

Petersen KF, Dufour S, Shulman GI. Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med.* 2005; 2:E233.

Pilla C, Cardozo RFD, Dutra CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD. Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metabolic Brain Disease.* 2003; 18:17-25.

Pintana H, Apaijai N, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of

insulin-resistant rats. *J Endocrinol.* 2013; 218(1):1-11.

Pipatpiboon N, Pintana H, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. DPP4-inhibitor improves neuronal insulin receptor function, brain mitochondrial function and cognitive function in rats with insulin resistance induced by high-fat diet consumption. *Eur J Neurosci.* 2013; 37(5):839-49.

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

Poucher SM, Cheetham S, Francis J, Zinker B, Kirby M, Vickers SP. Effects of saxagliptin and sitagliptin on glycaemic control and pancreatic β -cell mass in a streptozotocin-induced mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2012; 14(10):918-26.

Pra M. Avaliação dos Efeitos da Liraglutida sobre parâmetros bioquímicos no hipotálamo de Ratos.[Dissertação de mestrado]. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde.Tubarão: Universidade do Sul de Santa Catarina; 2014

Pralong WF, Bartley C, Wollheim CB. Single islet β -cell stimulation by nutrients: Relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca^{2+} and secretion. *EMBO J.* 1990; 9:53-60.

Pratley RE, Jauffret-Kamel S, Galbreath E, Holmes D. Twelve-week mono-therapy with the DPP-4 inhibitor vildagliptin improves glycemic control in subjects with type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2006; 38:423-8.

Rajala U, Panjunpää H, Koskela P, Keinänen-Kuikaanniemi S. High cardiovascular disease mortality in subjects with visual impairment caused by diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2000; 23:957-61.

Rauch T, Graefe-Mody U, Deacon CF, Ring A, Holst JJ, Woerle HJ, Dugi KA, Heise T. Linagliptin increases incretin levels, lowers glucagon, and improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Ther.* 2012; 3(1):10.

Reimer RA, Grover GJ, Koetzner L, Gahler RJ, Juneja P, Lyon MR,

Wood S. Sitagliptin reduces hyperglycemia and increases satiety hormone secretion more effectively when used with a novel polysaccharide in obese Zucker rats. *J Nutr.* 2012; 142(10):1812-20.

Rezin GT, Furlaneto C B, Scaini G, Valvassori SS, Gomçalves CL, Ferreira GK et al., Femproporex increases locomotor activity and alters energy metabolism and mood stabilizers reverses these changes: a proposal for a new model of mania. *Mol Neurobiol.* 2014;49(2):877-92

Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch C. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; CD006739.

Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature (London).* 1992; 358:325-7.

Robb-Gaspers LD, Burnett P, Rutter GA, Denton RM, Rizzuto R, Thomas AP. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *EMBO Journal.* 1998; 17:4987-5000.

Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53:S119-24.

Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology.* 1999; 140:1687-94.

Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283:E745-52.

Rosenstock J, Aguilar-Salinas C, Klein E, Nepal S, List J, Chen R. Effect of saxagliptin monotherapy in treatment-naïve patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin.* 2009; 25(10):2401-11.

Rosenstock J, Brazg R, Andryuk PJ, Lu K, Stein P. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing pioglitazone therapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week,

multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Clin Ther.* 2006; 28:1556–68.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chem Acta.* 1994; 228:35-51.

Rutter GA, Osbaldeston NJ, McCormack JG, Denton RM. Measurement of matrix free Mg²⁺ concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes. *Biochem J.* 1990; 271:627-34.

Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:215-21.

Sabbah E, Savola K, Kulmala P. Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. The childhood diabetes in Finland study group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1534-9.

Schirra J, Nicolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, Göke B. Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. 2006; 55:243-51.

Shimizu J, Kanagawa O, Unanue ER. Presentation of beta cell antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T cells of non obese diabetic mice. *J Immunol.* 1993; 151:1723-30.

Sima AAF, Zhang W, Muzik O, Kreipke CW, Rafols JA, Hoffman WH. Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effects of C-peptide. *Rev Diabet Stud.* 2009; 6:211-22.

Sima AAF. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* 2010; 47:279-93.

Skamagas M, Breen TL, LeRoith D. Update on Diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis.* 2008; 14:105-14.

Sochett E, Daneman D. Early diabetes-related complications in children

and adolescents with type 1 diabetes. Implications for screening and intervention. *Endocrinol. Metab Clin N Am.* 1999; 28:865-82.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da sociedade Brasileira de Diabetes - São Paulo: AC Farmacêutica, 2013

Srinivasan M, Bhagra S. Diabetes and mortality risk after acute coronary syndromes. *JAMA.* 2007; 298:2367.

Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF & Egan JM. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes.* 2000; 49:741-8.

Sunkara G, Sabo R, Wang Y, He YL, Campestrini J, Howard D, Dole WP. Dose proportionality and the effect of food on vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2007; 47:1152-8.

Schweizer A, Dejager S, Foley JE, et al. Assessing the cardio-cerebrovascular safety of vildagliptin: meta-analysis of adjudicated events from a large Phase III type 2 diabetes population. *Diabetes. Obesity and Metabolism.* 2010;12:485-494.

Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. Saxagliptin: a new DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Adv Ther.* 2009; 26(3):249-62.

Thomas L, Eckhardt M, Langkopf E, Tadayyon M, Himmelsbach F, Mark M. (R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione (BI 1356), a novel xanthine-based dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, has a superior potency and longer duration of action compared with other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325:175-82.

Thomas L, Tadayyon M, Mark M. Chronic treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor BI 1356 [(R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione] increases basal glucagon-like peptide-1 and improves glycemic control in diabetic rodent models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328(2):556-63.

Thorens B, Widmann C. Structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor. In: P. J. Lefebvre, (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology Glucagon III*. Berlin: Springer Verlag; 1996. p. 255-73.

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:3717-23.

Tomimoto H, Yamamoto K, Homburger HA, Yanagihara T. Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol*. 1993; 86:447-55.

Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effect of sitagliptin therapy on postprandial lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2011; 13:366-73.

Tsuboi T, da Silva Xavier G, Holz GG, Jouaville LS, Thomas AP, Rutter GA. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intra cellular Ca²⁺ and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem. J*. 2003; 369:287-99.

Tsuboi T, da Silva Xavier G, Holz GG, Jouaville LS, Thomas AP, Rutter GA. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca²⁺ and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem J*. 2003; 369:287-99.

Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 537:106-10.

Udell J.A., Bhatt DL, Braunwald E, Cavender M, Monsenzon O, Steg Ph G, Davison J A, Nicolau J C, Cobalan R, Hishberg B, Frederich R, Im K , Umez-Eronini A, He P, Mcguire, D K, Leiter L, Raz I, Scirica B M. Saxagliptin and Cardiovascular outcomes in patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Moderate or Severe Renal Impairment. Observations from the SAVOR-TIMI 53 Trial. *Diabetes Care*. 2014

Vella A, Bock G, Giesler PD, Burton DB, Serra DB, Saylan ML,

Dunning BE, Foley JE, Rizza RA, Camilleri M. Effects of dipeptidyl peptidase inhibition on gastrointestinal function, meal appearance, and glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56:1475-80.

Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001; 50:609-13.

Voet D, Voet JQ, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.

Wang A, Dorso C, Kopcho L, Marcindeviene J, Kirby MS. Implications of the prolonged dissociation rate of saxagliptin, a highly potent and selective DPP4 inhibitor, on plasma DPP measurements. *Diabetes*. 2008; 57:A576-7.

Welsh B, Wecker L. Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neurochem Res* 1991; 16:453-60.

Wettersgren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 78–107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci*. 1993; 38:665-73.

Wheeler MB, Gelling RW, McIntosh CH, Georgiou J, Brown JC, Pederson RA. *Endocrinology*. 1995; 136:4629-39.

Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic mice. *Diabetes*. 1986; 35:855-60.

Williams-Herman D, Engel S, Elizabeth R et al. Safety and tolerability of sitagliptin in clinical studies: a pooled analysis of data from 10,246 patients with type 2 diabetes. *BMC Endocrine Disorders*. 2010;7:1-21.

Williamson JR, Cooper RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett*. 1980; 117:K73-85.

Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin*

Endocrinol Metab. 1996; 81: 327-32.

Wilson MJ, Ruhland AR, Pryor JL, Ercole C, Sinha AA, Hensleigh H, Kaye KW, Dawkins HJ, Wasserman NF, Reddy P, Ahmed K. Prostate specific origin of dipeptidylpeptidase IV (CD-26) in human seminal plasma. J Urol. 1998; 160(5):1905-9.

Wong FS, Wen Li. B cells in autoimmune diabetes. Rev Diabetic Stud. 2005; 2:121-35.

Wyss M; Kaddurah-Daour R. Creatine and creatinine metabolism. Physiol Rev. 2000; 80:1107-213.

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes. 1999; 48:2270-6.

Yamato T, Misumi Y, Yamasaki S, Kino M, Aomine M. Diabetes mellitus decreases hippocampal release of neurotransmitters: an in vivo microdialysis study of awake, freely moving rats. Diabetes Nutr Metab. 2004; 17:128-36.

Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. Lancet. 2002; 359:824-30.

ANEXO

ANEXO I: TERMO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 076-2014-01

Professor responsável: Emilio Luiz Streck

Equipe: Milena Carvalho Silva, Giselli Scaini, Lara Mezari Gomes

Título: "Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em um modelo animal de diabetes, tratados com diferentes inibidores da DPP-4"

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 140 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 250g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 076-2014-01

Principal Investigator: Emilio Luiz Streck

Researchers: Milena Carvalho Silva, Giselli Scaini, Lara Mezari Gomes

Project title: Evaluation of oxidative stress and energy metabolism parameters in an animal model of diabetes, treated with different DPP-4 inhibitors

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 20 de maio de 2014.


VILSON HEIZEN CARDOSO
Coordenador Adjunto da CEUA