



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PEDRO HENRIQUE DE AMORIM MIRANDA**

**FORMULAÇÃO ORAL CONTENDO  
INIBIDOR DE DPP-4 E QUERCETINA  
MELHORA A HOMEOSTASE METABÓLICA  
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DIABETES TIPO 1**

**Ouro Preto  
2018**

PEDRO HENRIQUE DE AMORIM MIRANDA

FORMULAÇÃO ORAL CONTENDO  
INIBIDOR DE DPP-4 E QUERCETINA  
MELHORA A HOMEOSTASE METABÓLICA EM  
UM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DIABETES TIPO 1

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Daniela Caldeira Costa  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Ouro Preto  
2018

M67f      Miranda, Pedro Henrique de Amorim.  
Formulação oral contendo Inibidor da DPP-4 e Quercetina melhora a homeostase metabólica em um modelo experimental de diabetes tipo 1 [manuscrito] / Pedro Henrique de Amorim Miranda. - 2018.  
105f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Caldeira Costa.  
Coorientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo Lima.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Diabetes . 2. Flavonoides. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Metabolismo. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Lima, Wanderson Geraldo. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.379-008.64

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)




**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**Biológicas**

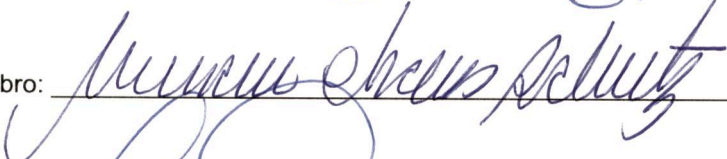


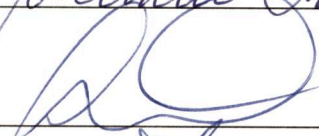
UFOP


**ATA DE DEFESA DE TESE**


Aos 13 dias do mês de abril do ano de 2018, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando Pedro Henrique de Amorim Miranda, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Presidente - UFOP), pelo Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Membro - UFOP), pela Profa. Cintia Lopes de Brito Magalhaes (Membro - UFOP), pela Profa. Miriam Chaves Schultz (Membro - Externo), pelo Prof. Orlando David Henrique dos Santos (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando Pedro Henrique de Amorim Miranda 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Formulação Oral com Inibidor de Dpp-4 e Quercetina Melhora a Homeostase Metabólica em Um Modelo Experimental de Diabetes Tipo 1", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 13 de abril de 2018.

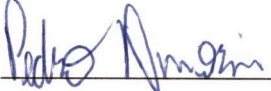
Presidente: 

Membro: 

Membro: 

Membro: 

Membro: 

Doutorando: 

*“Se pude ver mais longe foi porque  
estive apoiado em ombros de gigantes”*

*Isaac Newton*

***“... AOS MEUS PAIS, ANA MARIA E SEBASTIÃO CARLOS,  
A MINHA IRMÃ MARÍLIA  
E A MINHA SOBRINHA-AFILHADA ISABELLA  
COM MUITO CARINHO...”***

***...PALAVRAS NÃO CONSEGUEM  
EXPRESSAR O QUANTO  
SOU GRATO A VOCÊS...”***

## **AGRADECIMENTOS**

Como explícito no próprio título do tópico: AGRADecIMENTOS. Se hoje estou aqui é minha obrigação AGRADecER. Agradecer à Deus por ser o meu porto seguro, por toda proteção a mim concedida e por ter colocado pessoas imprescindíveis na minha trajetória.

Agradecer imensamente à professora Dr. Daniela Caldeira Costa. Nada que eu disser será o suficiente para agradecer por todos esses anos de convívio e aprendizado. Obrigado por ter me aberto as portas do LBM há 9 anos atrás. Obrigado pelo estágio como aluno voluntário. Obrigado pela orientação durante a iniciação científica e TCC. Obrigado por me buscar lá em Brasília e me propor o Mestrado. Obrigado por acreditar no nosso projeto a ponto de engatarmos o Doutorado. Se hoje eu sou o profissional que sou, tenha certeza que é por ter um excelente e exímio exemplo de profissional. Sua dedicação para com os alunos, sua paciência, sua confiança, seu respeito e todo o convívio criado no LBM e fora dele contribuíram para que este momento chegasse, e chegasse em grande estilo. Este é o fim de mais uma etapa, mais um ciclo na minha vida profissional, e este prêmio também é seu. Muito Obrigado!

Não posso deixar de agradecer também a todos os membros do LBM e alunos que já seguiram novos rumos. Ao meu eterno “chefe” Dr. Joamyr Victor Rossoni Jr. Obrigado por todo o esforço e dedicação que você deu para o desenvolvimento de todos os meus projetos. À Glaucy, Dani Ávila, Aline, Lorena, Carol e Bruno. Vocês me receberam no LBM de braços abertos e todo agradecimento será sempre mínimo perto do que aprendi com vocês. Às minhas meninas do LBM: Ana Carolina, Karina, Sttefany, Bruna, Geisla e Dra. Karina Bombom. Todos os experimentos, eutanásias e momentos de distração estarão guardados para sempre na minha memória. Vocês são a melhor equipe que uma pessoa poderia escolher para trabalhar. Aos demais alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado do LBM, meu muito obrigado por toda ajuda e mãos sempre estendidas. Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Experimental, “Seu Jair” e Clodoaldo, do Laboratório de Bioquímica Metabólica, Renata Rebeca. Enfim, sobre o LBM fica apenas uma frase: “Por detrás de bons resultados existe todo um trabalho cooperativo e a união de pessoas que se tornam uma família, e vocês serão para sempre parte de minha família”.

Agradeço ao professor Dr. Wanderson Geraldo de Lima que desde o mestrado se disponibilizou e cooperou com total dedicação para que conseguíssemos desenvolver os experimentos da melhor forma possível. Obrigado pelos puxões de orelha, pelas conversas durante os cafés e por sempre estar disposto a atender minhas ligações, mesmo durante os finais de semana. Meu MUITO OBRIGADO.

Agradeço imensamente aos professores José Mário Barichello, Orlando, Gustavo e toda equipe do Laboratório de Fitotecnologia, assim como a técnica do Laboratório Multiusuário (CIPHARMA), Patrícia Capelari. Vocês me receberam e todo o desenvolvimento e análises da formulação não seriam possíveis sem o conhecimento que me passaram. Em especial, agradeço a doutoranda Karen pela paciência e total dedicação e comprometimento em estar ao meu lado para retirada de dúvidas na experimentação. Karen, você é uma excelente profissional e companheira de trabalho. Aos demais laboratórios da UFOP, professores, técnicos e alunos, meus agradecimentos por toda disponibilidade.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, Aninha e Maneco. Sou muito grato por vocês sempre terem acreditado e apostado em mim. Por me darem suporte para alcançar meus objetivos e sonhos, e por me darem força e confiança para acreditar que eu era capaz, mesmo quando nem eu acreditava que era possível. Mãe, você é meu exemplo de força e determinação. Toda essa pesquisa voltada ao Diabetes eu decido à você. Pai, meu orgulho, meu exemplo de superação. Desde pequeno você me incentivou a estudar e nunca poupou esforços para que eu estudasse nas melhores instituições. A única coisa que você sempre me pediu foi que lhe desse um Diploma de Graduação, e hoje eu dedico mais esse Diploma e Título a você. Vocês são os meus pilares, minha essência e minha fonte de inspiração. Á minha querida irmã Marília que sempre acreditou, apostou e nunca foi sutil aos elogios quando se referia a mim. Irmã, você me deu o maior e melhor presente que eu poderia ganhar. Ser tio e padrinho da Isabella tem me ensinado e ajudado muito. Minha pequena Isabella, é incrível e inexplicável o tanto que eu amo você. É por você e para você que eu quero ser um homem-tio-padrinho e um ser humano melhor. Agradeço do fundo do meu coração por Deus ter posto vocês na minha vida. Vocês sempre apoiaram as minhas escolhas, sempre acreditaram no meu potencial e hoje eu dedico mais essa vitória a vocês. Eu os amo muito! Aos meus demais familiares, primos, tios e amigos que sempre torceram e vibraram com cada conquista que eu alcançava. As orações e vibrações positivas surtiram efeito. Muito obrigado.



Por último, e não menos importante, às famílias que Ouro Preto me apresentou. Á minha eterna casa, República Pensão dos Porcos, ex-alunos e moradores, meu muito obrigado pela acolhida, aprendizado do que é uma vida republicana e por todos os rocks e confraternizações. À Glívia e à Cecília, que sempre estiveram comigo e que me ajudavam a matar a saudade da minha pequena Isabella. “Poço de lama”, valeu demais por ser essa pessoa iluminada, companheira e peça fundamental na minha vida. Cecília, o “teté Alf” te ama muito. Aos meus novos irmãos Saideranos e à toda República Saideira, ex-alunos e moradores. Receber uma homenagem através de uma foto em quadrinho pode parecer pequena e simples, mas fazer parte desta história e família é algo grandioso e complexo. Eu tô falando de amizade, respeito e confiança. Às demais repúblicas amigas: Bicho do Mato, Feijão com Arroz, Hipnose, Rosa Xiclete, Minas Novas, Notre Dame, Favela, Taberna, Sua Mãe, dentre várias outras, meu muito obrigado pelos melhores anos da minha vida. Em especial, meus sinceros agradecimentos à algumas pessoas que fizeram completa e total diferença nesta caminhada até aqui. Ao meu amigo-irmão-filhim Peteka, ao Barrozo (Totó), karen e ao meu peixão Marina Hott. A amizade que construímos nesse tempo ficará eternizada. Obrigado pelas conversas, conselhos, pelo companheirismo, pela irmandade, pelos rocks e por vocês serem minha família. Vocês podem contar comigo para todo o sempre. Sem modéstia e em poucas palavras: Eu amo vocês.

Á minha querida e amada Ouro Preto, obrigado pelos 10 anos de aula sobre Experiência de Vida. É muito bom saber que eu sempre terei um lugar me esperando com as portas abertas e cheio de histórias e pessoas diferentes que eu posso chamar de irmãos.

GRATIDÃO sempre e acima de tudo.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica,**  
**Laboratório de Nutrição Experimental e Laboratório de**  
**Farmacognosia** da Universidade Federal de Ouro Preto com o auxílio financeiro da FAPEMIG (Processo APQ-01453-15), CNPq (Processo 454472/2014-5), CAPES (Auxílio Bolsa) E UFOP (Processo 23109.003209/2016-98).

# SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	I
LISTA DE TABELAS .....	IV
LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE ANEXOS .....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....	10
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1 – Diabetes e Prevalência .....	12
2.2 – Classificação .....	15
2.3 – Tecnologias e terapêuticas no tratamento do diabetes tipo 1 .....	17
2.4 – Inibidores da DPP-4 no Diabetes .....	24
2.5 – Potencial Terapêutico dos Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-4 no diabetes tipo 1 .....	31
2.6 – Potencial Terapêutico da Quercetina no diabetes tipo 1 .....	35
2.7 – Importância da Formulação .....	37
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS .....	41
3.1 – Objetivo Geral .....	41
3.2 – Objetivos Específicos .....	41
3.2.1 – Ensaios <i>in vitro</i> .....	41
➤ Desenvolver uma formulação contendo Vildagliptina e Quercetina a partir de soluções de P-407 .....	41
3.2.2 – Ensaios <i>in vivo</i> .....	41
➤ Quantificar a glicemia final de jejum e sua variação ao longo do tempo de tratamento. ....	41
➤ Avaliar a taxa de sobrevivência dos animais. ....	41
➤ Quantificar os níveis séricos de insulina e glucagon. ....	41
➤ Avaliar a atividade da enzima Hexocinase pancreática e hepática .....	41
➤ Quantificar o glicogênio hepático. ....	41
➤ Quantificar os níveis do receptor de GLP-1 (GLP1R) pancreático e hepático. ....	41
➤ Quantificar os níveis do transportador de glicose (GLUT-2) pancreático e hepático .....	41
➤ Avaliar os níveis séricos de frações lipídicas .....	41

➤ Avaliar os níveis séricos de enzimas e metabólitos relacionados às funções hepática e renal.....	41
➤ Avaliar a atividade da enzima Metaloproteinase-2 (MMP-2) no pâncreas e rim....	41
➤ Quantificar o número de ilhotas pancreáticas e avaliar a capacidade funcional das células beta pancreáticas (índice HOMA%BETA).....	41
➤ Quantificar a insulina no tecido pancreático. ....	41
CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 – Ensaio <i>in vitro</i> .....	42
4.1.1 – Preparo da formulação contendo Vildagliptina e Quercetina a partir de soluções de P-407 (MIRANDA <i>et al.</i> , 2016) (Registro de Patente: BR1020160055482) .....	42
4.2 – Ensaio <i>in vivo</i> .....	43
4.2.1 – Animais e Cuidados Éticos.....	43
4.2.2 – Delineamento Experimental.....	43
4.2.3 – Indução do diabetes .....	44
4.2.4 – Eutanásia e coleta do material biológico .....	44
4.2.5 – Análise dos parâmetros bioquímicos .....	45
➤ Glicemia.....	45
➤ Insulina sérica .....	46
➤ Glucagon sérico .....	46
➤ HOMA%BETA.....	47
➤ Perfil Lipídico .....	47
➤ Função Hepática e Função Renal .....	47
➤ Atividade da enzima Hexocinase.....	48
➤ Concentração do transportador de glicose isoforma 2 (GLUT2).....	48
➤ Concentração do receptor de GLP-1 (GLP-1R) .....	48
➤ Atividade de Metaloproteinases .....	49
4.2.6 – Análise dos parâmetros histológicos.....	50
➤ Número de ilhotas pancreáticas .....	50
➤ Quantificação de insulina no tecido pancreático.....	50
➤ Quantificação de glicogênio no tecido hepático .....	51
4.2.7 – Análise estatística.....	52
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS .....	53
5.1 – Ensaio <i>in vitro</i> .....	53
5.1.1 – Desenvolvimento da Formulação QV.....	53

5.2 – Ensaio <i>in vivo</i> .....	53
5.2.1 – Glicemia de jejum.....	53
5.2.2 – Taxa de sobrevivência dos animais .....	54
5.2.3 – Níveis séricos de insulina e glucagon .....	55
5.2.4 – Atividade da Hexocinase pancreática e hepática.....	56
5.2.5 – Quantificação do glicogênio hepático .....	57
5.2.6 – Concentração de GLP-1R pancreático e hepático .....	59
5.2.7 – Concentração de GLUT-2 pancreático e hepático.....	59
5.2.8 – Perfil lipídico .....	60
5.2.9 – Avaliação de parâmetros das funções hepática e renal.....	61
5.2.10 – Atividade de Metaloproteinase pancreática e renal.....	62
5.2.11 – Número de ilhotas pancreáticas e índice HOMA%BETA .....	63
5.2.12 – Quantificação de insulina no tecido pancreático .....	65
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO.....	66
CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76
CAPÍTULO 8 – CONCLUSÃO.....	76
CAPÍTULO 9 – LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	76
CAPÍTULO 10 – REFERÊNCIAS .....	77
CAPÍTULO 11 – ANEXOS .....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Número de países com disponibilidade de insulina, medicamentos para diabetes e suprimentos na pesquisa de acesso de país/renda.....	23
<b>TABELA 2.</b> Efeito da formulação QV no perfil lipídico.....	61
<b>TABELA 3.</b> Efeito da formulação QV nas funções hepáticas e renal.....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Os 10 principais países/territórios por número de pessoas com diabetes (20-79 anos, em 2017) (em milhões).....	13
<b>Figura 2.</b> Os 10 principais países por número de crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 (< 20 anos, em 2017) (em milhares).....	13
<b>Figura 3.</b> Despesa total com cuidados de saúde para pessoas diabéticas (20-79 anos, em 2017) (em bilhões).....	14
<b>Figura 4.</b> Novas formulações de insulina.....	20
<b>Figura 5.</b> Amplificação da secreção de insulina pela célula beta pancreática estimulada por GLP-1.....	25
<b>Figura 6.</b> Ações do GLP-1 nos tecidos periféricos.....	26
<b>Figura 7.</b> Estrutura dos domínios da DPP-4.....	27
<b>Figura 8.</b> Ações fisiológicas dos Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-4.....	28
<b>Figura 9.</b> Ações fisiológicas dos inibidores de DPP-4.....	30
<b>Figura 10.</b> Mecanismos potenciais pelos quais terapias à base de incretinas podem complementar a insulina no tratamento da 1 em indivíduos com ou sem a função das células beta detectável .....	32
<b>Figura 11.</b> Composição do Poloxamer 407.....	38
<b>Figura 12.</b> Linha temporal para o delineamento experimental .....	43
<b>Figura 13.</b> Formulação QV reduz a glicemia .....	54
<b>Figura 14.</b> Taxa de sobrevivência dos grupos experimentais ao longo de 30 dias.....	55
<b>Figura 15.</b> Formulação QV mantém positiva a razão Insulina/Glucagon.....	56
<b>Figura 16.</b> Formulação QV aumenta a atividade da enzima Hexocinase pancreática e hepática.....	57
<b>Figura 17.</b> Formulação QV aumenta a reserva energética de glicogênio hepático.....	58
<b>Figura 18.</b> Formulação QV aumenta os níveis pancreáticos de GLP-1R.....	59
<b>Figura 19.</b> Formulação QV não altera os níveis pancreáticos e hepáticos de GLUT-2.....	60

<b>Figura 20.</b> Formulação QV reduz atividade enzimática de MMP-2 no pâncreas.....	63
<b>Figura 21.</b> Formulação QV aumenta o número de ilhotas pancreáticas e a funcionalidade das células beta.....	64
<b>Figura 22.</b> Formulação QV aumenta a biossíntese de insulina nas ilhotas pancreáticas.....	65
<b>Figura 23.</b> Proposta de mecanismo de ação da Formulação QV em modelo de diabetes tipo 1.....	75



## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO I.** Comprovante do Comitê de Ética Animal

**ANEXO II.** Comprovante do Registro de Patente

**ANEXO III.** Comprovante do Comitê de Ética Animal

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar o potencial de uma formulação oral contendo Quercetina e Vildagliptina (Formulação QV) na melhora da homeostase metabólica em modelo experimental de diabetes tipo 1. Ratas albinas da linhagem Fischer foram distribuídas em quatro grupos: animais controle não tratados (C), animais diabéticos não tratados (D), animais diabéticos tratados com a Formulação QV (DQV) e animais diabéticos tratados com insulina (DI). O diabetes foi induzido por injeção intraperitoneal de Aloxano (135mg/kg de massa corporal) e confirmado por teste glicêmico. Os animais que apresentaram glicemia igual ou maior a 300 mg/dl foram considerados diabéticos. Após o período de tratamento de 30 dias os parâmetros bioquímicos foram analisados no pâncreas, fígado e soro, através de kits comerciais. As alterações histopatológicas no tecido pancreático foram examinadas pela coloração com hematoxilina e eosina e o conteúdo de insulina na ilhota foi avaliado por imuno-histoquímica com anticorpo anti-insulina. O teor de glicogênio nos hepatócitos foi quantificado por coloração com ácido periódico de Schiff. Nossos resultados mostraram que a Formulação QV reduziu a glicemia, preservou a arquitetura pancreática, aumentou os níveis séricos e pancreáticos de insulina, aumentou o armazenamento de glicogênio hepático, melhorou o perfil lipídico sérico, aumentou a atividade da enzima hexocinase, reduziu a atividade da metaloproteinase de matriz do tipo 2 (MMP-2) e promoveu maior taxa de sobrevivência de animais. Em conjunto, nossos dados sugerem que o tratamento com a Formulação QV foi capaz de melhorar a homeostase metabólica em ratos diabéticos tipo 1.

**Palavras-chave:** Diabetes tipo 1, Vildagliptina, Quercetina, Inibidores da DPP-4, Metabolismo

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the potential of an oral formulation (QV formulation) containing Quercetin and Vildagliptin in improves metabolic homeostasis in type 1 diabetes model. Female Fischer rats were divided into four groups: untreated control animals (C), untreated diabetic animals (D), diabetic animals treated with QV formulation (DQV), and diabetic animals treated with insulin (DI). Diabetes was induced by injection of Alloxan ( $135\text{mg kg body mass}^{-1}$ ) and confirmed by glycemic test. Animals that showed glycemia  $\geq 16.6\text{mmol (300mg/dl)}$  were considered diabetic. The animals were euthanized on the 31<sup>st</sup> day after of begin treatment. The pancreas, liver, and serum were collected for biochemistry analysis by commercial kits. Histopathological changes in pancreatic tissue were examined by Hematoxyline & Eosin staining and the insulin content in the islet measured by immunohistochemistry with anti-insulin antibody. The glycogen content in the hepatocytes was quantified by *Periodic Schiff Acid* staining. The QV formulation reduced the glycemia, preserved the pancreatic architecture, increased serum and pancreatic insulin levels, increased hepatic glycogen, ameliorated lipid profile, increased hexokinase activity, decreased MMP-2 activity and to promote higher survival rate of animals. Together, our data suggest that the QV formulation treatment was able to better metabolic homeostasis in type 1 diabetic rats.

**Keywords:** DPP-4 inhibitors, Vildagliptin, Quercetin, Type 1 diabetes

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O diabetes tipo 1, prevalente em 5 – 10% da população diabética é o resultado da destruição imunomediada das células beta pancreáticas produtoras de insulina. O diabetes tipo 1, geralmente, manifesta-se mais cedo em relação ao diabetes tipo 2, sendo que sua incidência em crianças e na população tem aumentado em muitos países, principalmente em indivíduos com idade média de até 20 anos (IDF, 2017). A dificuldade em controlar os níveis glicêmicos por parte dos indivíduos afetados resulta na menor aderência aos medicamentos e comprometimento do tratamento. Isto ocorre principalmente devido ao tratamento insulínico ser invasivo e incômodo, consistindo de administrações subcutâneas de insulina exógena em intervalos regulares de tempo. O tratamento convencional à base de insulina gera desconforto, ansiedade e perda da qualidade de vida, o que impacta no bem estar do indivíduo e toda sua família. Em adição, o alto custo financeiro como resultado dos cuidados médicos e diminuição da produtividade individual torna o diabetes uma doença onerosa do ponto de vista social e econômico (GILMER *et al.*, 2005). Diferentes estratégias tem sido desenvolvidas com o intuito de melhorar a aderência ao tratamento. Os sensores de glicose, insulinas dérmicas (YU *et al.*, 2015) e “spray” orais chegaram ao mercado com o objetivo de proporcionar conforto aos pacientes, além de prevenir episódios frequentes de hipoglicemia. Contudo o acesso a tais medicamentos inovadores é inviável para grande parte da população devido aos custos elevados, considerando que 75% dos pacientes com diabetes tipo 1 vivem em países de baixa renda. Medicamentos indicados para tratamento do diabetes tipo 2 vem sendo estudados no diabetes tipo 1 e apresentando grau variado de benefícios (FRANSEN *et al.*, 2016). A classe medicamentosa dos Inibidores da DPP-4 (Dipeptidil Peptidase 4) participam em numerosos processos biológicos, desde o controle glicêmico e redução de peso até na melhora funcional das células beta e marcadores de risco cardiovascular (NAUCK, 2016), resultando em benefícios adicionais na homeostase metabólica. Além disso, no diabetes tipo 1, os inibidores da DPP-4 em adição à terapia insulínica podem reduzir o requerimento diário de insulina exógena (GUO *et al.*, 2016). Estudos em modelos animais indicam que a Vildagliptina, um inibidor da DPP-4, possui efeito promissor no tratamento do diabetes tipo 1 ao estimular a neogênese de células beta pancreáticas (MIRANDA *et al.*, 2015). Outros autores também reportaram efeitos da Vildagliptina sobre a secreção de insulina (ÁVILA *et al.*, 2013) e na manutenção e reparo de células beta pancreáticas (HAMAMOTO *et al.*, 2013). No entanto nenhum estudo até

o momento demonstrou o efeito de Inibidores da DPP-4 na regulação do metabolismo em modelo experimental de diabetes tipo 1. Em adição, o uso da Quercetina, um flavonoide presente em muitos alimentos de origem vegetal também tem demonstrado um potencial antidiabético, com relatos de efeitos na melhora do estado hiperglicêmico e redução da incidência de complicações periféricas (JEONG *et al.*, 2012), além de aumentar a secreção de insulina e proteger células pancreáticas (COSKUN *et al.*, 2005). Embora algumas pesquisas tenham demonstrado que a Quercetina e Vildagliptina, quando administrados sozinhos/isolados, possuem propriedades antidiabéticas, resultados anteriores do laboratório demonstraram que os animais diabéticos tipo 1 que receberam por via orogástrica doses diárias de Quercetina durante 30 dias não apresentaram sinais de melhora nos parâmetros glicêmicos e insulínicos, ao passo que o número de ilhotas e células beta pancreáticas foram aumentados (*resultados não publicados*). Entretanto, os animais diabéticos que foram tratados por via orogástrica com doses diárias de Vildagliptina apresentaram uma melhora nos níveis séricos de insulina bem como um aumento no número de ilhotas e células beta pancreáticas sem alteração significativa dos níveis glicêmicos (MIRANDA *et al.*, 2015). Sendo assim, a questão principal que impulsionou esta pesquisa foi a avaliação do efeito do uso combinado destes ativos sobre a homeostase metabólica no modelo de diabetes tipo 1. Considerando-se os diferentes mecanismos de ação da Vildagliptina e Quercetina, nós hipotetizamos que a combinação desses dois compostos ativos poderiam promover uma melhora na homeostase metabólica, incluindo a redução da glicemia, o que ainda não havia sido observado com os ativos isolados em estudos anteriores do laboratório. Desta maneira, o delineamento aqui proposto caracteriza-se como um estudo pré-clínico de importância para futuros estudos clínicos que visem explorar uma possível alternativa terapêutica para o tratamento do diabetes tipo 1.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – Diabetes e Prevalência

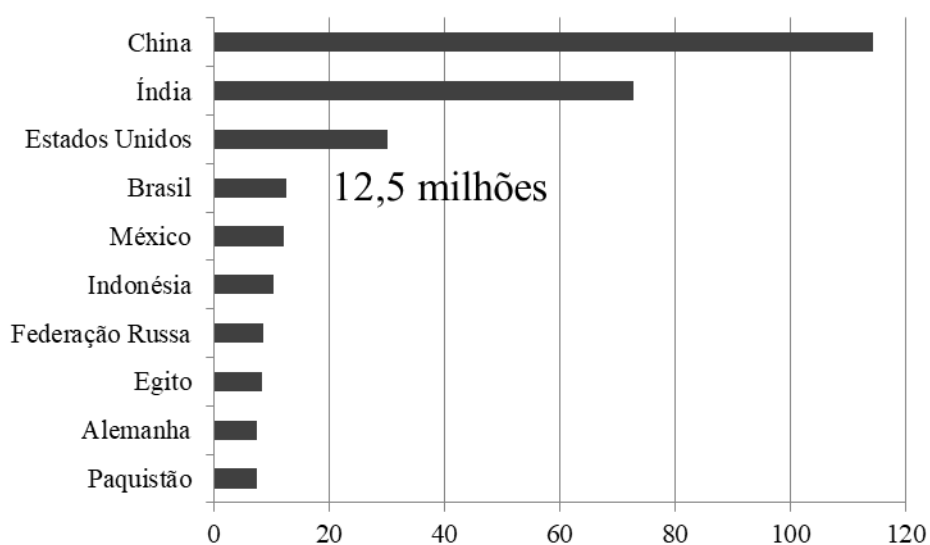
O diabetes *mellitus* é um importante problema de saúde pública prevalente do ponto de vista social e econômico (SBD, 2009). Está associado a complicações que comprometem a qualidade de vida e sobrevivência dos indivíduos, além de envolver altos custos no seu tratamento. Sua natureza crônica, a gravidade de suas complicações e os meios necessários para controlá-lo torna o diabetes uma doença muito onerosa, não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde.

O diabetes é considerado uma doença metabólica caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na ação e/ou secreção da insulina. O quadro hiperglicêmico está associado a danos em longo prazo, à disfunção e falência de diferentes órgãos, especialmente os rins, nervos, vasos do coração, dentre outros (ADA, 2018).

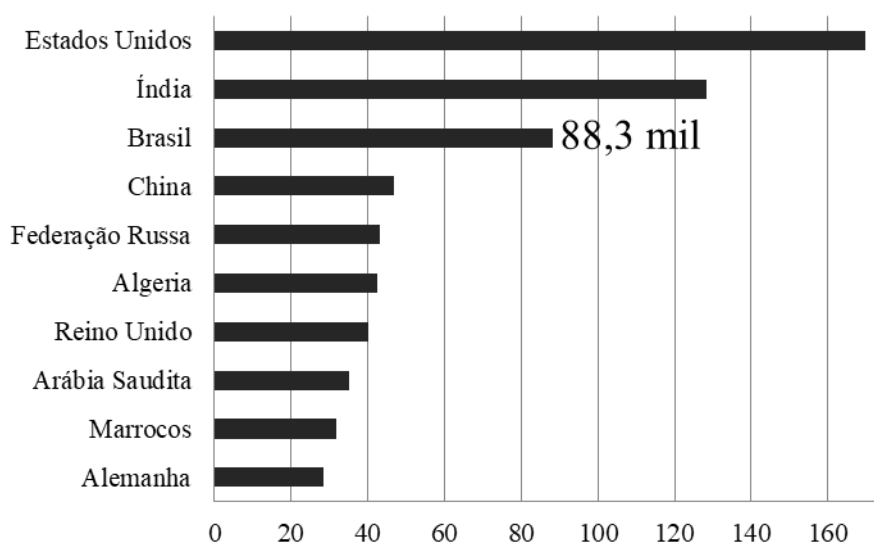
Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016, “Uma epidemia de diabetes *mellitus* está em curso” (SBD, 2015-2016). Tal informação pode ser confirmada mediante dados estatísticos que demonstram que o diabetes é uma das maiores emergências de saúde global do século 21, afetando mais de 415 milhões de pessoas, além do alto risco de outras 325 milhões com tolerância à glicose diminuída desenvolverem a doença no futuro (IDF, 2017). O *status* de epidemia agravado deve-se ao crescimento e ao envelhecimento populacional, da maior urbanização, das dietas pouco saudáveis e ao estilo de vida cada vez mais sedentário (GOLDENBERG, 2003).

Uma análise regional publicada pela *International Diabetes Federation* (IDF) em 2017 divulgou que o Brasil se encontra em 4º lugar no *ranking* de países com maior número de adultos com diabetes (~12,5 milhões) (**Figura 1**), sendo que metade desta população ainda não foi diagnosticada. Em relação à faixa etária abaixo dos 20 anos o Brasil foi considerado o 3º país com maior número de crianças e adolescentes portadores do diabetes tipo 1 (**Figura 2**), além de ser um dos países com maior número de novos casos, por ano, de diabetes tipo 1 nesta mesma faixa etária (~9,6 mil novos casos/ano). Quanto à mortalidade por diabetes, a pesquisa também revelou que aproximadamente 210 mil pessoas com idade entre 20–79 anos vieram a óbito em 2017, sendo que as regiões das Américas do Sul e Central foram as únicas a apresentaram aumento na taxa de mortalidade em relação à pesquisa realizada no ano de 2015 (IDF, 2015). Além disso, foi observado que no Brasil pessoas com idade inferior a 60 anos representavam mais da

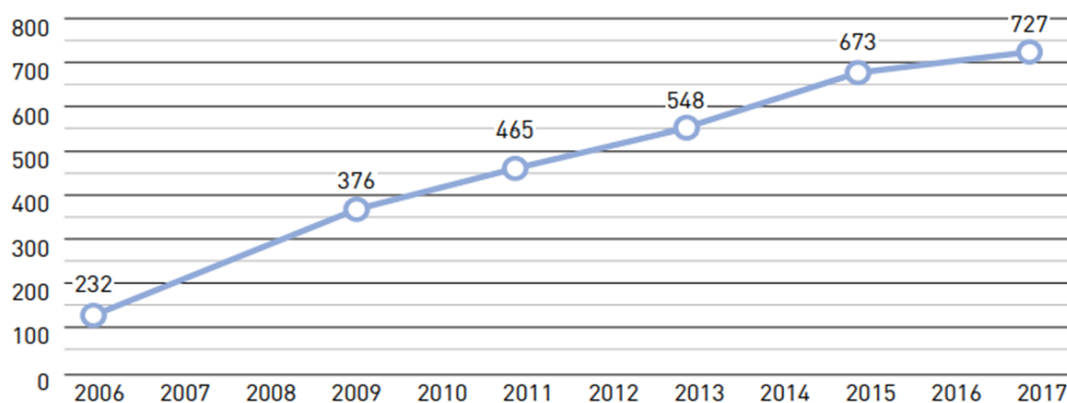
metade do número de mortes por diabetes e suas complicações (IDF, 2017). Outro dado relevante referiu-se às despesas com a saúde proporcionada por pacientes diabéticos. Cerca de US\$ 727 bilhões são gastos anualmente, sendo que o Brasil gerou gastos de aproximadamente US\$ 24 bilhões no ano de 2017 (**Figura 3**) (IDF, 2017). Esta carga pode ser medida através de custos médicos diretos, devido aos gastos com prevenção e tratamento das complicações, além dos custos indiretos associados à perda de produtividade, a mortalidade prematura e o impacto negativo do diabetes no produto interno bruto das nações (PIB). Essas informações são de extrema relevância, uma vez que o diabetes afeta grande parte da população representando um alto custo financeiro decorrente a cuidados médicos e a queda da produtividade (GILMER *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Os 10 principais países/territórios por número de pessoas com diabetes (20-79 anos, em 2017) (em milhões). (*Fonte:* Adaptado de IDF, 2017).



**Figura 2.** Os 10 principais países por número de crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 (< 20 anos, em 2017) (em milhares). (*Fonte:* Adaptado de IDF, 2017).



**Figura 3.** Despesa total com cuidados de saúde para pessoas diabéticas (20-79 anos, em 2017) (em bilhões). (Fonte: Adaptado de IDF, 2017).

Diversas pesquisas já comprovaram que alterações no estilo de vida são medidas viáveis para controlar a incidência do diabetes (LINDSTROM *et al.*, 2006). Resultados do *Diabetes Prevention Program Research Group* (DPPRG) mostraram redução de 34% em 10 anos de acompanhamento na incidência de casos de diabetes mediante o estímulo a uma dieta saudável e à prática de atividades físicas (DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH *et al.*, 2009). No mês de Abril/2016, no Dia Mundial da Saúde, foi realizada uma campanha cujo tema foi o diabetes. Na ocasião, a Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu um Relatório Global sobre a doença. Dentre outras informações, o relatório apresentou objetivos e medidas preventivas para tentar reduzir o aumento do número de novos casos de diabetes. O objetivo da OMS é chamar a atenção para a doença e para o fato de que ações de promoção à saúde, hábitos alimentares saudáveis e práticas de atividades físicas podem reduzir os fatores de risco de desenvolvimento do diabetes (WHO, 2016).

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA), os critérios para diagnóstico do diabetes são realizadas com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares associados à doença. São três os critérios aceitos para o diagnóstico do diabetes com a utilização da glicemia (SBD, 2015-2016; ADA, 2018):

- Glicemia de jejum  $\geq 126\text{mg/dL}$  ( $7\text{mmol/L}$ ). Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia.
- Glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75g de glicose  $\geq 200\text{mg/dL}$  ( $11,1\text{mmol/L}$ )
- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal de peso acrescidos de glicemia casual  $> 200\text{mg/dL}$  ou hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 48\text{mmol/mol}$  (equivalente a 6,5%). Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições.



## 2.2 – Classificação

A classificação atual do diabetes é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto os termos diabetes *mellitus* insulino dependente e diabetes insulino independente devem ser eliminados. A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas:

- tipo 1 (autoimune ou idiopático);
- tipo 2;
- Outros tipos específicos de diabetes (defeitos genéticos na função da célula beta ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, induzidos por drogas e infecções);
- gestacional.

Ainda existem duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

É difícil conhecer a incidência de Diabetes *mellitus* tipo 2 em grandes populações, pois requer seguimento durante alguns anos, com medições periódicas de glicemia. Os estudos de incidência são geralmente restritos ao Diabetes *mellitus* tipo 1, pois suas manifestações iniciais tendem a ser bem características. (KARVONEN *et al.*, 2000).

O Diabetes *mellitus* tipo 1, forma presente em 5% - 10% dos casos, é uma doença crônica caracterizada pela destruição imunomediada das células beta das ilhotas pancreáticas, resultando na incapacidade progressiva destas células em produzir insulina. Esse processo pode levar meses ou anos, mas só se manifesta quando já houve a destruição de pelo menos 80% da massa de ilhotas (SBD, 2015-2016). Desta forma, as células beta são destruídas quando indivíduos com suposta predisposição genética são submetidos a eventos específicos como infecções virais, induzindo a respostas imunopatológicas (ADA, 2018). Na maioria dos casos essa destruição das células é mediada por uma reação autoimune, sendo que os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-ilhota ou antígenos específicos da ilhota e incluem os anticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Znt) (PALMER *et al.*, 1983; BAEKKESKOV *et al.*, 1990; RABIN *et al.*, 1994; GORUS *et al.*, 1997). Esses anticorpos podem ser verificados meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença, e em

até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia. A taxa de destruição das células beta é variável, sendo em geral mais rápida entre as crianças e a forma lentamente progressiva, que ocorre em maior grau em adultos, é referida como *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA). O diabetes tipo 1 é o tipo mais agressivo de diabetes, com sintomas clássicos na época do diagnóstico como hiperglicemia, poliúria, sede, perda de peso, cansaço, cetoacidose, podendo evoluir a complicações crônicas graves causando aumento na susceptibilidade à infecções, neuropatia, retinopatia, nefropatia, aterosclerose acelerada associada ao infarto do miocárdio e amputações de membros (VERNILLO, 2001; ADA, 2018). O tratamento convencional do diabetes tipo 1 consiste na insulinoterapia, através da administração diária de doses subcutâneas de insulina exógena. Entretanto, a terapêutica insulínica intensiva é considerada incômoda pela maioria dos pacientes devido ao rigor necessário para manter níveis glicêmicos próximos ao da normalidade, além da possibilidade de induzir frequentes episódios de hipoglicemia grave. Por este motivo requer monitorização frequente da glicemia, tornando ainda mais difícil a aderência do paciente ao tratamento (AYTA, 2002). Por isto, terapêuticas alternativas à insulinoterapia que se mostrem mais eficientes para a manutenção da glicemia são de extrema importância.

Já o Diabetes *mellitus* tipo 2 é a forma mais comum de diabetes. Está presente em 90% - 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção de insulina (SHAW *et al.*, 2000). Em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. O corpo é capaz de produzir insulina, mas torna-se resistente de modo que a insulina é ineficaz. Ao longo do tempo, os níveis de insulina pode posteriormente tornar-se insuficiente. O quadro de resistência à insulina característico neste tipo é resultante da incapacidade dos tecidos periféricos em responder à insulina (COTRAN *et al.*, 2000). É uma doença metabólica complexa, multifatorial, de presença global e que afeta a qualidade e o estilo de vida dos acometidos, podendo levar a uma redução pronunciada na expectativa de vida dessa população. Embora as causas exatas para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 ainda não sejam conhecidos, sabe-se que pode ocorrer em qualquer idade, embora o diagnóstico geralmente ocorra após os 40 anos de idade, e está diretamente relacionado a pacientes que apresentam fatores de risco como obesidade, sedentarismo, dieta hipercalórica, má nutrição e antecedentes de diabetes gestacional (BLOOMGARDEN, 2006). Muitas pessoas com diabetes tipo 2 continuam a ignorar sua condição por um longo tempo, uma vez que os sintomas são geralmente menos acentuados do que em pacientes com diabetes

tipo 1 e pode levar anos para ser reconhecido. No entanto, durante este tempo o corpo já estará sendo prejudicado devido aos quadros hiperglicêmicos, tendo como provável consequência a presença de evidências de complicações crônicas na ocasião em que o diagnóstico para diabetes tipo 2 é concretizado. Diferentemente do diabetes tipo 1, os pacientes não dependem de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento insulínico para obter controle metabólico adequado.

### **2.3 – Tecnologias e terapêuticas no tratamento do diabetes tipo 1**

Desde o final do século 20 aconteceram grandes avanços tecnológicos no tratamento do diabetes. Esses avanços possibilitaram que milhares de pacientes pudessem ter melhoria nos resultados do tratamento da doença, facilitaram o seu manejo, tanto pela equipe de saúde quanto pelo paciente e sua família, contribuíram para um entendimento mais profundo das variações glicêmicas, possibilitando menores episódios de hipoglicemia e hiperglicemia, além de promover uma melhor qualidade de vida aos indivíduos envolvidos (FOWLER, 2008).

O estímulo à atividade física regular e a orientação alimentar são complementos das bases terapêuticas do diabetes tipo 1, porém não são suficientes para a normalização do perfil metabólico de um paciente. Para isso é necessária uma terapia medicamentosa, uma vez que o uso de insulina é imprescindível no tratamento deste tipo de diabetes, e deve ser instituída assim que o diagnóstico for realizado (DCCT *et al.*, 1993).

Desde a sua descoberta em 1921/1922 por pesquisadores canadenses, a insulina passou a salvar milhares de vidas ao redor do mundo. Essa insulina, no entanto, de ação rápida e sendo necessárias várias aplicações por dia, causava lipodistrofias, reações alérgicas e efeitos colaterais, deixando clara a necessidade de evolução. Após a descoberta da estrutura molecular da insulina, ela se tornou, na década de 1960, a proteína mais estudada do mundo. Da sua associação com a protamina, à protamina zinco, à proteína neutra *Hagedorn* (NPH) e a insulina humana, chegamos às insulinas sintetizadas no DNA bacteriano ou de leveduras. Por meio de técnicas de DNA recombinante, os análogos de insulina de ação ultrarrápida e prolongada, com diferentes mecanismos e tempos de ação, foram sintetizados com o objetivo de se obter a maneira mais próxima de reproduzir a secreção fisiológica da insulina (EYZAGUIRRE e CODNER, 2006). Estudos têm demonstrado que os análogos de insulina de ação prolongada, Glargina® e Detemir®, proporcionam menor frequência de episódios hipoglicêmicos em relação à

insulina NPH, o que seria explicado pela ausência (ou diminuição) de picos dessas insulinas (HEISE *et al.*, 2004). Além disso, em paralelo à evolução da insulina, dispositivos de aplicação e equipamentos de alta tecnologia auxiliam, de modo significativo, a adesão ao tratamento com insulina e favorece o bom controle glicêmico. A caneta de aplicação de insulina, por exemplo, tem se tornado uma opção popular nos últimos anos. No mercado brasileiro estão disponíveis canetas recarregáveis e descartáveis, apresentando como vantagens em relação à seringa: apresentação, praticidade no manuseio e transporte, opção de agulhas mais curtas e finas, assim como maior exatidão da dose. O uso de agulha com comprimento adequado e a realização da técnica correta de aplicação são fatores fundamentais para garantir a injeção de insulina no subcutâneo sem perdas e com mínimo desconforto (FRID *et al.*, 2010).

Tecnologia que demonstrou ser bastante eficaz no tratamento do diabetes tipo 1 refere-se ao sistema de infusão contínua de insulina (SICI). Considerado padrão-ouro no tratamento intensivo da doença, estudos demonstraram que os resultados no controle glicêmico durante a terapia com infusão subcutânea contínua de insulina foram melhores do que aqueles obtidos com múltiplas injeções diárias de insulina (RETNAKARAN *et al.*, 2004), além de possibilitar uma maior exatidão na dose de insulina, melhorar os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) por evitar variações nos níveis de glicemia e reduzir significativamente possíveis episódios de hipoglicemias graves (PICKUP e KEEN, 2002). A bomba de infusão de insulina, que, embora tenha sido desenvolvida e seu uso difundido nos EUA desde 1970, chegou recentemente ao Brasil e está sendo cada vez mais conhecida e prescrita. O objetivo da terapêutica desse sistema de infusão, mais comumente chamado de bomba de infusão de insulina, é simular ao que ocorre no organismo da pessoa sem diabetes, mantendo a liberação de insulina durante 24 horas para tentar obter níveis normais de glicose entre as refeições e liberar insulina nos horários da alimentação (MINICUCCI, 2006; PICKUP, 2012).

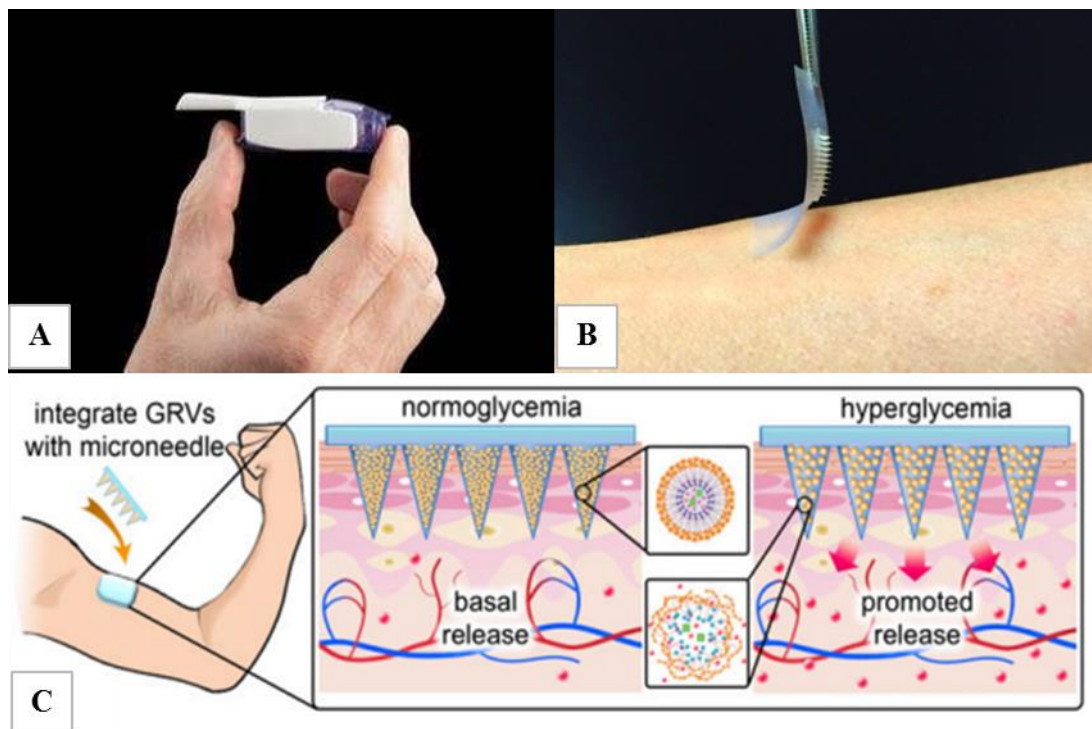
Os sensores de glicose, desde os de uso médico até os de uso individual, vêm ganhando cada vez mais espaço como importantes ferramentas no controle do diabetes, isso porque permitem mensurar a glicemia capilar em tempo real. Embora sejam equipamentos acessíveis aos pacientes e que permitem um melhor controle da doença, a adesão e o comprometimento do paciente em realizar o diário glicêmico são de extrema importância. Um grande número de equipamentos foi desenvolvido e testado: desde relógios de pulso que medem a glicose intersticial, lentes de contato capazes de mudar de cor de acordo com os níveis de glicose da lágrima, até sensores implantados e testados no

tecido celular subcutâneo (KLONOFF, 2005). No Brasil, o sistema de monitoramento contínuo de glicose (CGMS) é um sensor amplamente usado e registra os níveis de glicose no tecido celular subcutâneo por meio de uma pequena cânula inserida sob a pele, semelhante ao *set* de infusão da bomba de insulina. Entre as vantagens apresentadas por esses sistemas, podemos citar: melhora nas excursões glicêmicas, redução na duração e gravidade dos episódios de hipoglicemias e melhora do controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 1 (DEISS *et al.*, 2006; GARG *et al.*, 2006).

Uma grande vantagem alcançada devido à evolução dos tipos de insulina, assim como nas novas tecnologias para aplicação destas, refere-se à possibilidade de um tratamento insulínico intensivo com maior eficácia. Antes do advento dos análogos de insulina com ação ultrarrápida, as hipoglicemias ocorriam em maior número, e isso certamente contribuiu para que houvesse certo receio por parte dos pais, e até mesmo dos profissionais da saúde, em implementar o tratamento intensivo. Esse tipo de tratamento, diferente do convencional, mimetiza o padrão de secreção normal de insulina basal, possibilitando um melhor controle glicêmico. O clássico estudo prospectivo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) demonstrou que o tratamento intensivo do diabetes tipo 1, com três ou mais doses diárias de insulina de ações diferentes ou sistema de infusão contínua de insulina, foi eficaz em reduzir a frequência de complicações crônicas desta doença. Nessa coorte, houve diminuição de 76% dos casos de retinopatia, 60% de neuropatia e 39% de nefropatia nos pacientes diabéticos tratados (DCCT *et al.*, 1993).

Desde que a insulina foi desenvolvida até os dias atuais, um dos problemas mais recorrentes e sempre relatados pela comunidade diabética refere-se à comodidade do tratamento. A necessidade de aplicações subcutâneas de doses diárias de injeções de insulina faz com que o paciente, muitas vezes, não reproduza o tratamento da forma adequada. Para contornar tal limitação, a nova tendência do mercado insulínico refere-se ao desenvolvimento de formulações que substituam as tradicionais injeções. Sendo assim, vias alternativas de administração, como insulinas orais, dérmicas e *spray* bucal têm sido testados para tentar promover uma melhor adequação por parte do paciente. O desafio é desenvolver uma preparação que seja estável e consiga reduzir tanto a glicemia de jejum, a pós-prandial, a hemoglobina glicada e a variação glicêmica. Desenvolvida pelas farmacêuticas *Sanofi* e *MannKind Corp.*, a Afrezza® foi uma formulação em pó inalável de insulina de ação rápida e indicada para controle da glicemia tanto no diabetes tipo 1 quanto no diabetes tipo 2. Em Junho de 2014 a Agência de Alimentos e Medicamentos dos

Estados Unidos (FDA) aprovou a comercialização deste medicamento, que deve ser inalado com a ajuda de um pequeno inalador de fácil uso. O produto dissolve-se rapidamente quando atinge o pulmão e fornece insulina para a corrente sanguínea, cumprindo o papel de regular a quantidade de açúcar no sangue. Depois de seis meses de espera, em Fevereiro de 2015, o produto chegou aos mercados norte-americanos (CAHILL, 2016) (**Figura 4A**). Ainda nesta mesma vertente, cientistas americanos desenvolveram um dispositivo de administração de insulina glicose-dependente através de microagulhas contendo vesículas de insulina e a enzima glicose oxidase. Semelhante a um pequeno adesivo, esse dispositivo é capaz de detectar o aumento nos níveis de glicose e secretar automaticamente as doses necessárias de insulina na corrente sanguínea (**Figura 4B**). Quando em situação de hiperglicemia, as vesículas rapidamente se dissociam e liberam a insulina encapsulada (**Figura 4C**). Em testes realizados *in vivo*, o adesivo apresentou resultados bem sucedidos uma vez que foi eficaz em regular a glicose no sangue de camundongos com diabetes tipo 1, tornando este dispositivo sintético glicose-responsivo liberador de insulina um aparato promissor em evitar picos glicêmicos, se traduzido para terapia humana (YU *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Novas formulações de insulina. (A) Afrezza. Formulação em pó inalável de insulina (Fonte: insulinnation.com, 2016). (B) Dispositivo de administração de insulina glicose-dependente. (C) Mecanismo de liberação da insulina (Fonte: Adaptado JICHENG *et al.*, 2015).

Além das evoluções tecnológicas apresentadas, um método alternativo também praticado no tratamento do diabetes tipo 1 refere-se ao transplante de pâncreas. O sucesso de tal metodologia relaciona-se com a melhora da qualidade de vida dos pacientes, não só pela dieta mais flexível, mas também pela interrupção do uso de múltiplas doses de insulina exógena e das medições diárias de glicemia capilar. Os pacientes passam a apresentar glicemia estável, sem as frequentes excursões glicêmicas e complicações agudas, como hipoglicemia e cetoacidose (ROBERTSON *et al.*, 2000; ADA, 2006). Por ser uma prática cirúrgica bastante invasiva, o transplante de pâncreas é geralmente realizado depois de 20 anos de diabetes estabelecido, período onde existem maiores possibilidades de aparecimento das complicações crônicas, todavia não há dados de medicina baseados em evidências que comprovem a capacidade do transplante em revertê-las, embora vários trabalhos sugiram que alguma estabilização possa ocorrer àquelas relacionadas com neuropatia e microangiopatia. Além disso, não há dados na literatura determinando se o transplante realizado precocemente é capaz de prevenir essas complicações (LARSEN, 2004; ADA, 2006). Uma das limitações que tornam o transplante de pâncreas um procedimento ainda temeroso por parte dos pacientes é devido à necessidade dos pacientes transplantados necessitarem de imunossupressão contínua, o que pode acarretar inúmeros efeitos colaterais. Por conseguinte, deve-se avaliar seu benefício em comparação com a evolução das complicações crônicas do diabetes e da qualidade de vida do candidato ao procedimento.

Em um estudo publicado na revista *Nature* em Janeiro de 2016, a equipe de pesquisadores relatou uma descoberta que pode ajudar a desenvolver uma possível cura para o diabetes tipo 1. No estudo foi demonstrado que o transplante de células produtoras de insulina, derivadas de células embrionárias humanas, quando encapsuladas com biomateriais porosos (derivados de alginato) foram capazes de mitigar a resposta imune do organismo ao “corpo estranho”, funcionando como uma barreira imunológica. Os testes foram realizados em modelo animal de diabetes tipo 1, C57BL/6J induzido com estreptozotocina (STZ) durante 174 dias, e após receberem o implante de células artificiais foi relatada a produção de insulina sem o uso de injeções e sem a necessidade de qualquer imunossupressão. Tais achados demonstraram um grande avanço na tentativa de restauração do controle glicêmico no quadro de diabetes tipo 1 (VEGAS *et al.*, 2016).

Embora sejam inúmeros os benefícios trazidos por essas tecnologias no tratamento do diabetes tipo 1, cada inovação traz consigo limitações e novas necessidades em

continuar desenvolvendo terapias que consigam abranger, ao mesmo tempo, características como a capacidade de resposta rápida, comodidade na via de administração, adequada biocompatibilidade e menores efeitos adversos. Entretanto, não bastasse todo o transtorno e dificuldades fisiológicas acometidas aos diabéticos para terem acesso a tais tecnologias, alguns importantes parâmetros devem ser considerados, sendo que o valor comercial e a sua disponibilidade para toda a população necessitada parecem estar entre os mais relevantes.

Um conjunto de intervenções baseado no custo-benefício está no cerne da questão em melhorar os resultados do diabetes: o controle da glicemia através de uma combinação de dieta, atividade física e medicação; controle da pressão arterial e do metabolismo lipídico para reduzir o risco cardiovascular e outras complicações. Este conjunto de intervenções parece simples, mas a sua realização depende de estruturas adequadas para a prestação de cuidados de saúde, tais como o acesso a medicamentos essenciais e tecnologias, protocolos para a gestão da atenção básica, a formação adequada de prestadores de cuidados à saúde, sistemas de referência envolvendo especialistas, e a participação ativa e a motivação do paciente. A disponibilidade de medicamentos essenciais e tecnologias básicas para a detecção precoce, diagnóstico e monitorização do diabetes em unidades de cuidados de saúde primários é um componente crítico da capacidade de gestão. Serviços de saúde bem estruturados devem fornecer as principais intervenções e acompanhamento regular necessário para ajudar as pessoas com diabetes a viverem vidas longas e relativamente saudáveis, mesmo que seja uma doença crônica e progressiva.

A falta de acesso à insulina, por exemplo, continua a ser um obstáculo chave para o sucesso do tratamento e resulta em complicações desnecessárias e mortes prematuras. A disponibilidade de insulina para o tratamento do diabetes tipo 1 é relatada em apenas uma minoria de países de baixa renda. Embora a insulina esteja na lista modelo da OMS como medicamento essencial, o acesso em locais com poucos recursos ainda pode ser um problema por causa das barreiras nacionais e internacionais, e não apenas por causa dos custos, mas também por causa de problemas de acesso (WHO, 2016; IDF, 2017). Uma discussão da gestão do diabetes deve, portanto, incluir uma observação no acesso a medicamentos essenciais e tecnologias básicas, uma vez que barreiras nacionais e internacionais interagem para dificultar o acesso à insulina, e muitas vezes diabéticos que residem em países de baixa e média renda não recebem este tratamento essencial (BERAN *et al.*, 2014; IDF, 2017) (**Tabela 1**).



	<b>Países de alta renda</b>	<b>Países de renda média</b>	<b>Países de baixa renda</b>
<b>Insulina de ação curta</b>	81%	46%	0%
<b>Insulina de ação intermediária</b>	84%	44%	10%
<b>Insulina de ação rápida</b>	84%	29%	13%
<b>Insulina de ação prolongada</b>	81%	35%	0%
<b>Canetas de insulina</b>	81%	36%	13%
<b>Inibidores da DPP-4</b>	86%	27%	25%
<b>Análogos de GLP-1</b>	77%	17%	33%
<b>Medidores de glicose no sangue e tiras para teste</b>	78%	44%	10%

**Tabela 1.** Número de países com disponibilidade de insulina, medicamentos para diabetes e suprimentos, na pesquisa de acesso de país/renda. (*Fonte:* Adaptado de IDF, 2017).

O mercado da insulina é dominado por um pequeno número de fabricantes multinacionais que constituem apenas 4% do mercado em volume. Este concurso limitado pode potencialmente aumentar os preços da insulina, seja através de tarifas de importação, impostos sobre valor agregado, custos de farmácia e os custos de armazenamento e transporte, aumentando ainda mais o custo para os indivíduos. Fatores adicionais no mercado de insulina que podem impactar no preço incluem, diferentes formulações de insulina saindo de patente e o aumento considerável no uso de análogos de insulina. Ambos os fatores afetam o preço da insulina antes mesmo dela chegar a um determinado país (IDPIG, 2014). Em acréscimo, como a insulina deve ser injetada, isso significa que seringas também fazem parte da necessidade básica de sobrevivência para as pessoas que a utilizam. Impostos de valor agregado são frequentemente aplicados às seringas, e muitas vezes a quantidade presente no Sistema de Saúde é insuficiente e não está ligada a compra de insulina (BERAN e YUDKIN, 2010). Quanto aos dispositivos de injeção de insulina,

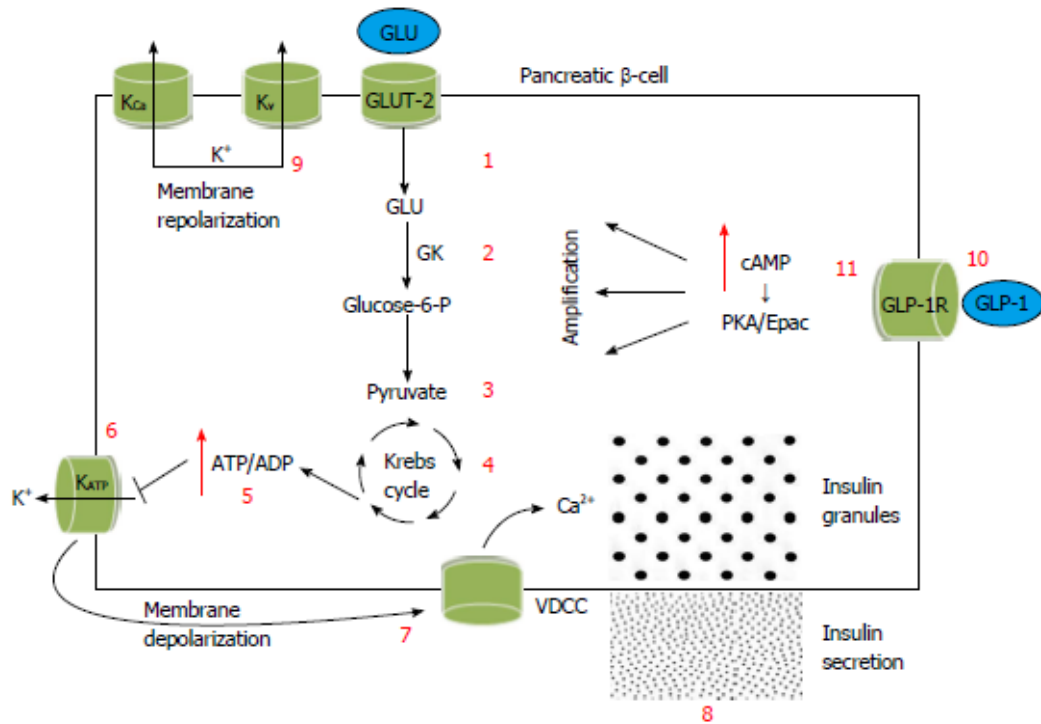
canetas e cartuchos de insulina, apesar das vantagens sobre as seringas tradicionais, o custo limita seu uso para muitos pacientes.

O diabetes tipo 1 é a segunda doença crônica mais frequente da infância (menos prevalente apenas que a asma) e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas, especialmente nas faixas etárias menores que 15 anos (IDF, 2015; 2017). Baseado nesta corrente de pensamento, o programa IDF *Life For A Child* (Vida para uma Criança) foi criado no ano 2000 para fornecer insulina e seringas suficientes, além de equipamentos de monitorização de glicose no sangue, cuidados clínicos e educação em diabetes adequados. Este programa infantil está atualmente ajudando mais de 17.000 crianças e jovens vivendo com diabetes em cerca de 46 países (IDF, 2016).

Sendo assim, não apenas no Brasil, mas principalmente nas regiões de baixa e média renda, intervenções políticas e programas de assistência são necessários para melhorar o acesso equitativo de medicamentos e equipamentos de imprescindível necessidade às populações acometidas de diabetes tipo 1.

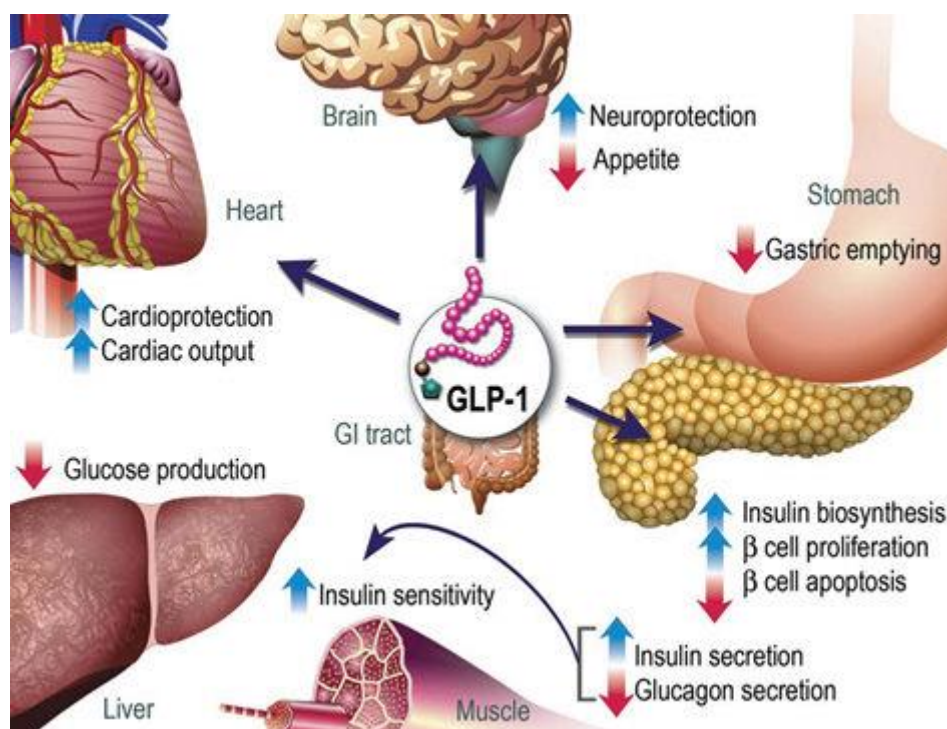
## **2.4 – Inibidores da DPP-4 no Diabetes**

A base teórica do estudo dos Inibidores da DPP-4 no controle do diabetes tipo 2 originou-se quando foi descoberto que as incretinas desempenhavam ações fisiológicas benéficas em relação ao controle glicêmico, com potencial promissor no tratamento do tipo 2 (NAUCK *et al.*, 2004). As incretinas são hormônios sintetizados no trato gastrointestinal e secretados mediante a entrada de nutrientes no intestino (DOYLE e EGAN, 2007; JANG *et al.*, 2007), desenvolvendo um importante papel na homeostase da glicose sanguínea por estimular a secreção de insulina de maneira glicose-dependente (VILSBØLL e HOLST, 2004; DRUCKER e NAUCK, 2006). O hormônio incretina predominante é o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), e estudos demonstraram que o GLP-1 foi capaz de melhorar a homeostase da glicose, incluindo a potencialização da secreção de insulina de maneira glicose-dependente (**Figura 5**) e a inibição da secreção de glucagon (DOYLE e EGAN, 2007).



**Figura 5. Amplificação da secreção de insulina pela célula beta pancreática estimulada por GLP-1.** A glicose é transportada para dentro da célula via transportador GLUT-2 e fosforilada pela GK na glicólise até formar piruvato (1 – 3). Este ao entrar no ciclo de krebs promove aumento da concentração citosólica de ATP/ADP, fechamento dos canais de  $K_{ATP}$  e despolarização da membrana, com abertura do canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependente e aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , culminando no estímulo de secreção de insulina na corrente sanguínea (4 – 8). A repolarização da membrana é mediada principalmente pelos canais de  $K_{Ca}$  e  $K_v$  (9). A ligação do GLP-1 ao seu receptor de membrana estimula o aumento de AMPc intracelular, ocasionando à amplificação do estímulo para exocitose dos grânulos de insulina (10). GLU:glicose; GLUT-2:transportador de glicose tipo 2; GK=glicocinase; Glicose-6-P:glicose-6-fosfato;  $K_{Ca}$ :canal de potássio voltagem dependente sensível a cálcio;  $K_v$ :canal de potássio voltagem dependente; GLP-1:peptídeo-1 semelhante ao glucagon; GLP-1R:receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon; cAMP:adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; PKA:proteína cinase A; ATP:adenosina trifosfato; ADP:adenosina monofosfato. Fonte: (PAPAETIS, 2014).

Além dos efeitos fisiológicos citados anteriormente, foi relatado uma melhoria na sobrevivência das células beta pancreáticas (YABE e SEINO, 2013), um efeito cardioprotetor e neuroprotetor, além do retardamento do esvaziamento gástrico (Figura 6).

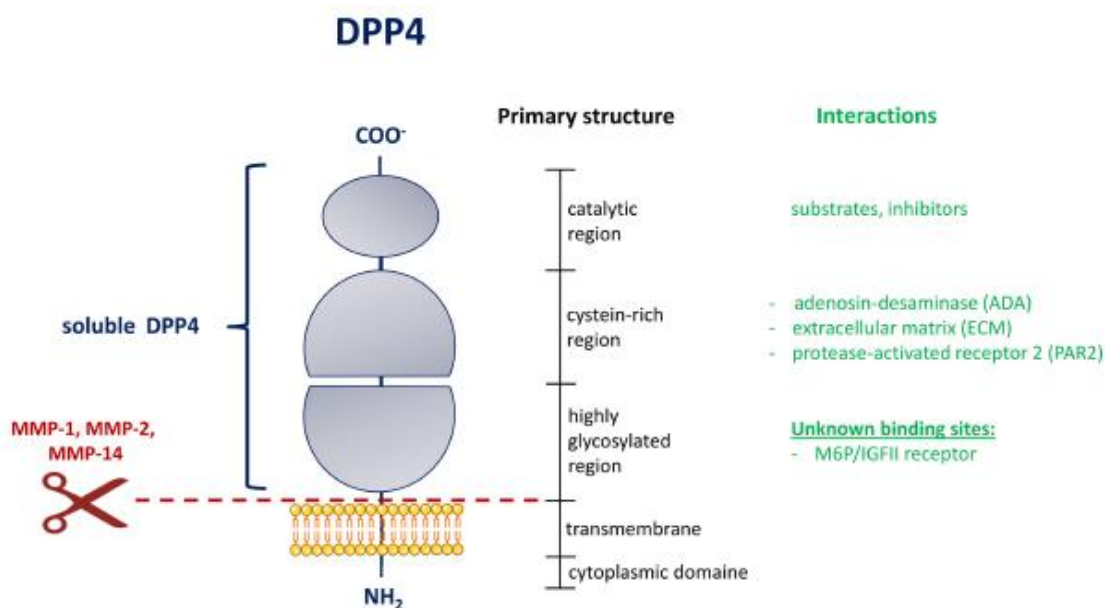


**Figura 6.** Ações do GLP-1 nos tecidos periféricos. *Fonte:* Adaptado de (TAMBASCIA, 2007)

Baseado nestas informações projetou-se, inicialmente, utilizar o GLP-1 como medida terapêutica no diabetes tipo 2, entretanto, estudos relataram que a secreção deste hormônio no estado de diabetes fica comprometida ou mesmo ausente, contribuindo para a deficiência na secreção de insulina (NAUCK *et al.*, 2004). Pesquisas posteriores confirmaram então que o uso terapêutico do GLP-1 como agente antidiabético era inviável devido à sua meia-vida ser relativamente curta como resultado de sua rápida inativação pela enzima Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4) (DRUCKER e NAUCK, 2006; DEACON *et al.*, 2008). O GLP-1 é rapidamente metabolizado pela DPP-4, com uma meia-vida ativa de apenas 1 a 2 minutos (ANDUKURI *et al.*, 2009), dificultando o seu emprego no tratamento do tipo 2. Anteriormente já havia sido demonstrado em estudos que a DPP-4 é também encontrada no endotélio de capilares que drenam a mucosa intestinal, onde as células secretoras de GLP-1 estão situadas (HANSEN *et al.*, 1999;

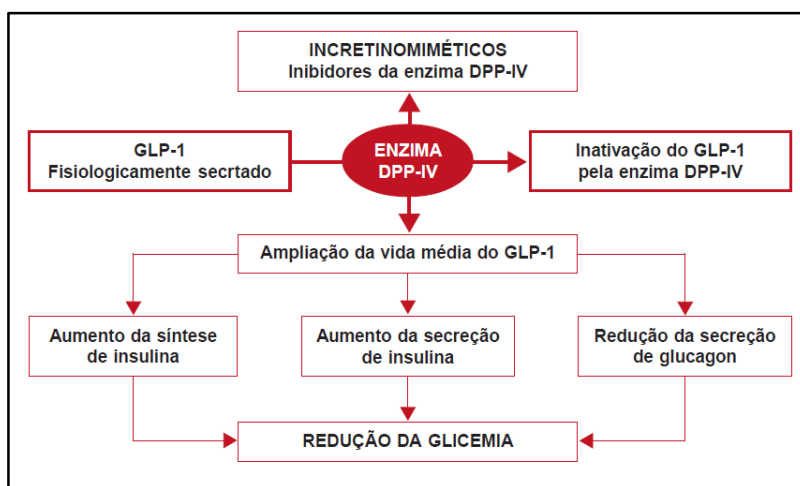
GAUTIER *et al.*, 2008), o que indica que a maior parte do GLP-1 é inativado quase imediatamente após sua secreção (LOTFY, SINGH, KALÁSZ, *et al.*, 2011).

A DPP-4, ou também conhecida como CD26, consiste em uma glicoproteína com peso molecular de 110kDa e foi caracterizada pela primeira vez por *Hopsu-Havu and Glenner* (HOPSU-HAVU e GLENNER, 1966). É representante de uma família de enzimas existentes na circulação e na superfície de múltiplos tecidos, como no fígado, pâncreas, baço, rins, endotélio vascular, etc, (GREEN *et al.*, 2006) sendo que sua atividade consiste em clivar cadeias peptídicas nas quais está presente a prolina ou a alanina como o segundo aminoácido a partir da extremidade N-terminal, incluindo citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e hormônios incretinas (POSPISILIK *et al.*, 2002). Sua estrutura compreende 4 domínios: um domínio citoplasmático curto (1-6), um domínio transmembrana (TMD) (7-28), um segmento de haste flexível (29-39) e um domínio extracelular (40-766), que pode ser ainda dividido em uma região altamente glicosilada, uma região rica em cisteína e a região catalítica (ROHRBORN *et al.*, 2015) (Figura 7).



**Figura 7. Estrutura dos domínios da DPP-4.** Representação esquemática do monômero DPP-4 ligada à membrana. A extensão da forma circulante e solúvel de DPP-4 está ilustrada na parte esquerda em azul. O desprendimento da DPP-4 da membrana por metaloproteinases de matriz é mostrado por uma tesoura vermelha. A barra preta vertical à direita representa a estrutura primária com a delimitação das diferentes regiões. Em verde estão as interações que ocorrem nas regiões indicadas da estrutura de DPP-4. MMP, metaloproteinase de matriz; M6P/IGFII, manose-6fosfato/fator de crescimento 2 semelhante a insulina. *Fonte:* Adaptado de (RÖHRBORN *et al.*, 2015).

Após a ineficácia do tratamento do diabetes tipo 2 com GLP-1, as novas estratégias terapêuticas basearam-se na tentativa de contornar a degradação pela DPP-4. Ao longo da trajetória foram sendo desenvolvidos medicamentos incretinomiméticos (KNUDSEN *et al.*, 2000), e por fim os Inibidores da DPP-4. Estes, por sua vez, são responsáveis pela inibição da enzima DPP-4, aumentando a vida média do GLP-1 para algumas horas, estendendo, assim, sua ação fisiológica benéfica (TAMBASCIA, 2007) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Ações fisiológicas dos Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-4.

*Fonte:* (ELIASCHEWITZ, 2007).

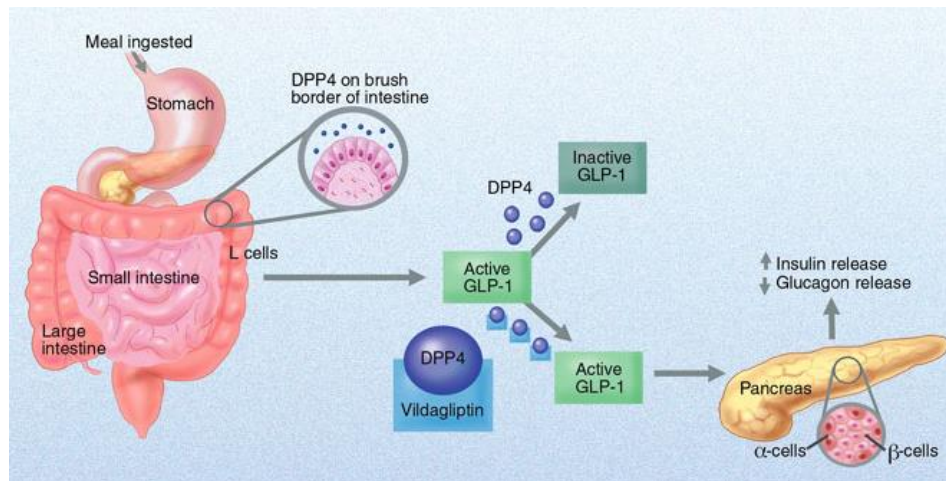
Pratley e colaboradores demonstraram que os inibidores de DPP-4 podem inibir mais de 90% da atividade plasmática da enzima-alvo por um período superior a 24 horas, aumentando os níveis de incretinas ativas pela prevenção da sua rápida degradação (PRATLEY e GILBERT, 2008). Sendo assim, mesmo que por mecanismo indireto, estes Inibidores da DPP-4 influenciam na secreção endógena de incretinas, melhorando a hiperglicemia de maneira glicose-dependente devido ao aumento dos níveis séricos de insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (DRUCKER e NAUCK, 2006; HERMAN *et al.*, 2006).

Além do efeito no controle glicêmico promovido pelos Inibidores da DPP-4, foram relatados também trabalhos que sugerem efeitos positivos no pâncreas. Uma vez que é sabido que o processo de regeneração da massa de células beta é regulado por uma constante interação entre o crescimento de células beta (replicação de células maduras e formação *de novo* de células precursoras no tecido pancreático) e a morte dessas células, principalmente devido a apoptose (BUTLER *et al.*, 2003), objetivou-se a tentar demonstrar as possíveis influências geradas pelos Inibidores da DPP-4 no tecido

pancreático. (FARILLA *et al.*, 2002) demonstraram que o GLP-1 protegeu as células beta da apoptose, assim como (YABE e SEINO, 2013) observaram que o GLP-1 foi capaz de ativar a proliferação e diferenciação dessas células, além de inibir sua apoptose, contribuindo para a regulação da secreção de insulina a longo prazo, devido à manutenção de uma massa de células beta funcionais. Em outro estudo, a utilização de um Inibidor da DPP-4 sobre a morfologia das ilhotas, distribuição de células beta na ilhota e sobre o índice de proliferação de células beta em modelo animal de diabetes tipo 2 revelou a integridade das ilhotas, maior proporção de células beta, além de maior nível do indicador de proliferação celular (LI *et al.*, 2013).

Desde o lançamento da classe medicamentosa de Inibidores da DPP-4, várias formulações foram desenvolvidas. Neste contexto, a Vildagliptina, com nome comercial de Galvus<sup>®</sup>, foi o segundo Inibidor da DPP-4 aprovado pela União Europeia para o tratamento do diabetes. Diferentemente dos outros Inibidores da DPP-4, a Vildagliptina tem alta afinidade pela DPP-4 (AHREN *et al.*, 2007; EL-OUAGHLIDI *et al.*, 2007) e atua como substrato da enzima, provocando assim a inibição da sua ligação à molécula-alvo (LOTFY, SINGH, KALÁSZ, *et al.*, 2011).

Em relação ao uso da Vildagliptina como alternativa terapêutica no tratamento do diabetes tipo 2, triagens clínicas conduzidas mostraram que ela é bem tolerada e eficaz na melhora do controle glicêmico (AHREN *et al.*, 2011). Estudos em 2008 e 2009 evidenciaram que a Vildagliptina foi eficaz em diminuir a glicemia em pacientes com diabetes tipo 2, especialmente a hiperglicemia pós-prandial e com baixo risco de hipoglicemia e sem ganho de peso (KIM e EGAN, 2008; BANERJEE *et al.*, 2009). Embora alguns autores observaram que os Inibidores da DPP-4 são benéficos apenas nas fases iniciais do diabetes, em 2015 a pesquisa de *Kumar e Gupta* mostrou efeitos benéficos da Vildagliptina, Saxagliptina e Sitagliptina em reduzir a HbA1c em pacientes com 2 ou há mais de 10 anos, comprovando que esses inibidores também desempenham um papel importante independentemente da duração do diabetes (KUMAR e GUPTA, 2015). Além disso, a Vildagliptina pode aumentar consideravelmente a liberação de insulina e simultaneamente reduzir os níveis de glucagon (**Figura 9**), o que resulta em uma redução na relação glucagon/insulina, diminuindo a produção de glicose endógena tanto no período pós-prandial quanto na fase pós-absortiva (LOTFY, SINGH, KALASZ, *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Ações fisiológicas dos inibidores de DPP-4: as incretinas são liberadas pelo intestino após a ingestão de alimentos e exercem uma série de efeitos fisiológicos no pâncreas que poderiam culminar com a liberação de insulina para homeostase glicêmica, caso não fossem rapidamente degradados pela ação da DPP-4. Os inibidores dessa enzima estendem a meia-vida das incretinas, prolongando assim seus efeitos fisiológicos nas células alfa e beta pancreáticas. *Fonte:* (BANERJEE *et al.*, 2009).

Em relação ao perfil lipídico, parâmetro bastante considerável quando se refere ao diabetes tipo 2 devido às complicações cardiovasculares, estudos demonstraram que as gliptinas apresentaram efeitos sobre o perfil lipídico e a pressão sanguínea (AROR *et al.*, 2014), sendo eficazes também em reduzir a lipólise assim como a hipertrigliceridemia pós-prandial, provavelmente devido ao aumento da concentração plasmática de incretinas, processo que tem sido relacionado com a redução da absorção intestinal de triglicérides em estudos animais (QIN *et al.*, 2005; AZUMA *et al.*, 2008).

Uma vez que dados da literatura abordaram efeitos benéficos dos Inibidores da DPP-4 em modelo de diabetes tipo 2 tanto no controle glicêmico quanto na melhora da arquitetura pancreática, e considerando que a redução da população de células beta é um dos mecanismos responsáveis tanto pelo estabelecimento quanto pela progressão do diabetes, se for demonstrado que a terapia baseada em incretinas é capaz de deter a progressão da doença através da preservação das células beta, então essa classe de medicamentos poderia ser utilizada desde o estágio de pré-diabetes até as fases mais avançadas da doença, seja no diabetes do tipo 1 ou 2 (GEORGE e MCCRIMMON, 2013).

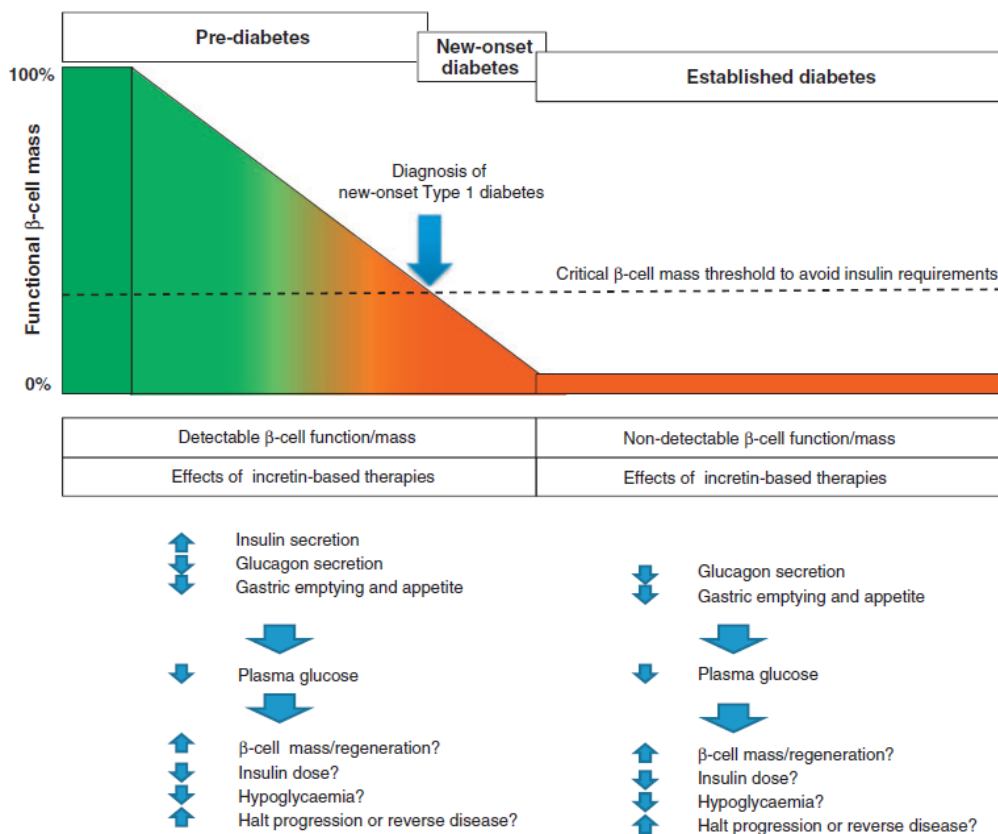


## 2.5 – Potencial Terapêutico dos Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-4 no diabetes tipo 1

No capítulo anterior foram apresentadas informações referentes à classe dos Inibidores da DPP-4 e os avanços alcançados ao incorporar esses medicamentos na lista de formulações para o tratamento do diabetes tipo 2. Dentre os Inibidores da DPP-4, vários foram os estudos que demonstraram os benefícios de se manter o hormônio incretina GLP-1 ativo através do bloqueio da enzima DPP-4. Dentre as principais vantagens avaliadas no tipo 2, podemos citar o aumento na síntese e secreção de insulina assim como uma redução na secreção de glucagon e com menores episódios de hipoglicemia, efeitos cardioprotetores e de redução do esvaziamento gástrico, além desta medicação ter apresentado efeitos na preservação e proliferação das células beta pancreáticas.

Uma vez que os Inibidores da DPP-4 demonstraram indícios de possuir efeitos promissores sobre a regeneração e aumento da massa de células beta em modelo de diabetes tipo 2, acrescido da informação de que os danos progressivos na função das células beta é a base primária de todas as manifestações diabéticas (PRENTKI e NOLAN, 2006), e aliado ao fato de que poucos são os estudos que verificaram o efeito da inibição da DPP-4 em modelos animais diabéticos tipo 1 (DUPRE, 2005), tais razões justificam a necessidade de serem estudadas novas estratégias que possam induzir a regeneração de células beta e um potencial terapêutico mais eficaz para o diabetes tipo 1.

As excursões glicêmicas, com picos de hiper e hipoglicemias, que acometem os pacientes com diabetes tipo 1 fazem com que a homeostase da glicose, assim como a HbA1c, sejam parâmetros bastante difíceis de serem controlados. Como, até então, a única terapia medicamentosa eficaz no tratamento do diabetes tipo 1 trata-se das injeções de insulina, existe então a necessidade de tratamentos coadjuvantes que possam oferecer um potencial meio de complementar a terapia insulínica intensiva no tipo 1 através da abordagem de alguns dos distúrbios fisiológicos resultantes da destruição das células beta, particularmente através da preservação da massa de células beta, prevenção da apoptose e supressão da liberação de glucagon pelas células alfa pancreáticas no estado pós-prandial (GEORGE e MCCRIMMON, 2013) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Mecanismos potenciais pelos quais terapias à base de incretinas podem complementar a insulina no tratamento da 1 em indivíduos com ou sem a função das células beta detectável. *Fonte:* (GEORGE e MCCRIMMON, 2013).

Achados científicos demonstram que infusões de GLP-1 reduzem excursões glicêmicas em pacientes com diabetes tipo 1, e este resultado foi atribuído à redução dos níveis de glucagon e retardamento do esvaziamento gástrico (DUPRE, 2005). Além disso, existem relatos de pesquisadores quanto à dificuldade em se obter um controle glicêmico no modelo tipo 1, com resultados distintos quando comparados os dois principais tipos de diabetes. (GIAMPIETRO *et al.*, 2013) demonstraram que o tratamento crônico com Sitagliptina em associação com terapia insulínica apresentou resultados diferentes em pacientes com diabetes tipo 1 e 2. O grupo confirmou que a combinação medicamentosa melhorou o controle metabólico (glicemia jejum e HbA1c), o perfil lipídico e diminuiu o requerimento diário de insulina nos pacientes com tipo 2. Já nos pacientes com tipo 1, tanto o perfil lipídico quanto o requerimento diário de insulina apresentaram melhoras, porém o controle metabólico ocorreu apenas temporariamente, retornando aos níveis basais ao final do experimento.

Recentes estudos têm relatado que a estimulação do crescimento, diferenciação e inibição da apoptose de células beta aumentam a lista de efeitos dos Inibidores da

DPP-4. Estes achados providenciam uma razão inicial para investigar os efeitos, em longo prazo, dos Inibidores da DPP-4 na homeostase da glicose e integridade das ilhotas pancreáticas (efeito citoprotetor) no modelo de diabetes tipo 1. Segundo KIM *et al.*, o Inibidor da DPP-4 MK0431 prolongou a sobrevivência de células beta em ratos tipo 1 induzidos por estreptozotocina (STZ) (KIM *et al.*, 2009).

O diabetes tipo 1 leva a uma resposta imune e destruição seletiva das células beta produtoras de insulina. Dados da literatura também indicam que Inibidores da DPP-4, além das várias funções já citadas, apresentam atividade anti-inflamatória em modelo animal de diabetes tipo 1 (JELSING *et al.*, 2012). JELSING e colaboradores avaliaram o efeito do Inibidor da DPP-4 Linagliptina na massa de células beta e na insulite, na progressão do diabetes em camundongo NOD (non-obese diabetic). Ao final do estudo, o tratamento diminuiu a incidência do diabetes, aumentou a massa de ilhotas e de células beta, além de reduzir significativamente a massa de linfócitos infiltrados ao redor das ilhotas, comprovando que o tratamento com Linagliptina atrasa o início do diabetes em camundongos NOD devido à proteção da massa de células beta (JELSING *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados por KIM *et al.*, onde demonstraram que o pré-tratamento com Sitagliptina (MK0431) foi capaz de reduzir a incidência de diabetes em camundongos NOD com ilhotas transplantadas, além de aumentar a área de células beta e diminuir o grau de insulite através de mecanismos que incluem a modulação da migração de células T CD4<sup>+</sup> (KIM *et al.*, 2009).

Referindo-se ao medicamento utilizado para a realização deste trabalho, o Inibidor da DPP-4, Vildagliptina, algumas informações quanto ao uso terapêutico no diabetes tipo 1 devem ser considerados.

Em pesquisa realizada no Laboratório de Bioquímica Metabólica da Universidade Federal de Ouro, UFOP - MG, ÁVILA *et al.*, avaliaram o possível efeito protetor do tratamento com Vildagliptina na preservação de células beta pancreáticas em um modelo experimental de diabetes tipo 1 induzido por STZ. No referido estudo foram utilizadas duas concentrações de Vildagliptina (5 ou 10mg/kg de peso corpóreo/dia) que foram administradas por via orogástrica durante 4 semanas em ratos. Foram avaliados glicemia, níveis de insulina, marcadores de estresse oxidativo, atividade de enzimas antioxidantes e histologia pancreática. Dos resultados encontrados, o tratamento com Vildagliptina foi eficaz em aumentar os níveis de insulina, porém este aumento não foi suficiente para melhorar a glicemia jejum. O tratamento com Vildagliptina também foi capaz de aumentar a capacidade de defesa antioxidante das enzimas (SOD e catalase) e,

consequentemente, reduziu a formação dos biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS e proteína carbonilada), possibilitando uma redução dos efeitos deletérios no pâncreas dos animais. Em relação aos resultados da análise histológica, foi observado aumento no número de ilhotas e células beta pancreáticas nos animais diabéticos tratados (ÁVILA *et al.*, 2013).

Neste sentido, vários são os estudos que demonstraram a capacidade dos Inibidores da DPP-4 em aumentar a massa de células beta, podendo este efeito ser explicado por diferentes mecanismos, tais como a redução do estresse oxidativo pancreático (ÁVILA *et al.*, 2013), a diminuição da apoptose das células beta (HAMAMOTO *et al.*, 2013), ou ainda pelo aumento da regeneração ou efeito neogênico destas células (CHO *et al.*, 2011; ANSARULLAH *et al.*, 2013). Baseado nestas diferentes hipóteses houve a necessidade em esclarecer melhor como a Vildagliptina possibilitaria o aumento na massa das células beta no modelo de diabetes tipo 1: preservação celular e/ou neogênese? Sendo assim, com o intuito de elucidar qual seria o mecanismo principal em nosso modelo de diabetes, uma pesquisa sequencial foi realizada.

Desenvolvido no mesmo Laboratório de Bioquímica Metabólica da Universidade Federal de Ouro, UFOP - MG, MIRANDA *et al.*, avaliaram o potencial da Vildagliptina em promover a neogêneses de células beta pancreáticas em um modelo de diabetes tipo 1 em fase tardia. No referido estudo, ratas albinas da linhagem Fisher foram submetidas ao estado de diabetes tipo 1 através da indução intraperitoneal com Alozano. Nesta pesquisa foi utilizada Vildagliptina na concentração de 5mg/kg de peso corpóreo/dia que foi administrada por via orogástrica durante 4 semanas em ratos. Foram avaliados glicemia, níveis de insulina, perfil lipídico e histologia pancreática. A análise dos resultados revelou que a Vildagliptina foi eficaz em aumentar os níveis séricos de insulina, embora este aumento não tenha sido suficiente em normalizar os níveis de glicemia jejum. Esses resultados corroboram com os achados por ÁVILA *et al.*, 2013. Além disso, o tratamento também propiciou uma melhora significativa no perfil lipídico, revelando que houve aumento nos níveis da fração HDL-C, seguido por redução nos níveis das frações aterogênicas (não-HDL) e redução nos níveis de triacilgliceróis. Em relação à histologia pancreática, os resultados demonstraram que a Vildagliptina foi capaz de aumentar o número de células beta pancreáticas, assim como em melhorar a funcionalidade destas células, mesmo após a destruição quase total das células beta. Tendo em vista esses resultados, pode-se inferir que o possível mecanismo pela qual a

Vildagliptina propiciava o aumento do número de células beta em modelo de diabetes tipo 1 em fase tardia corresponderia à neogênese (MIRANDA *et al.*, 2015).

Tendo sido então sugerido a capacidade neogênica da Vildagliptina no diabetes tipo 1, existia ainda outro parâmetro que necessitava de novos estudos, o controle glicêmico. Diversos autores relataram a ineficiência dos Inibidores da DPP-4 na redução da glicose sanguínea no modelo de diabetes tipo 1. (MAEDA *et al.*, 2012) avaliaram o efeito da administração de Vildagliptina após 2 semanas de tratamento em ratos diabéticos induzidos com STZ. Em relação aos parâmetros avaliados, foram observados efeitos benéficos sobre os danos vasculares induzidos pelo diabetes, entretanto não houve melhora nos níveis de glicemia jejum.

Apesar da relevância dos resultados encontrados por ÁVILA *et al.* e MIRANDA *et al.*, era esperado que o somatório destes efeitos culminassem em um melhor controle glicêmico, todavia o mesmo não ocorreu. Sendo assim, existe ainda a necessidade em buscar terapias adicionais que pudessem promover uma melhora no perfil glicêmico. Uma vez traçado novo objetivo, a estratégia de pesquisa consistiu em potencializar os efeitos do Inibidor da DPP-4, e neste estudo atual foi associado ao tratamento farmacológico com Vildagliptina o composto flavonólico denominado Quercetina.

## **2.6 – Potencial Terapêutico da Quercetina no diabetes tipo 1**

Os flavonoides constituem o grupo mais abundante dentro dos compostos fenólicos, com mais de 6.500 compostos identificados (HENDRICH, 2006). Dentre os flavonóis, tem-se a Quercetina, que é uma aglicona que pode ser encontrada em diferentes tipos de alimentos de origem vegetal e medicamentos fitoterápicos tradicionais, apresentando diversas atividades biológicas como antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório, hipoglicemiantes e hipolipemiantes. Vários estudos demonstraram que a Quercetina e seus glicosídeos foram eficazes na prevenção e tratamento de doenças crônicas não infecciosas, tais como diabetes, obesidade e hiperlipidemia. Eficaz no controle da glicose sanguínea via proteção das células pancreáticas ou melhorando a sensibilidade à insulina, e na regulação do metabolismo lipídico, resultado da regulação do catabolismo e/ou do anabolismo (YAN *et al.*, 2015).

O aumento do consumo de alimentos que são boas fontes de fitoquímicos biologicamente ativos, como flavonoides, e que apresentam atividade antioxidante tem recebido considerável interesse por parte de pesquisadores e profissionais da saúde

(JACQUES *et al.*, 2013; JENNINGS *et al.*, 2014). Sob o ponto de vista farmacológico, é atribuída uma série de ações biológicas à Quercetina, dentre elas, atividade antioxidante (AQUINO *et al.*, 2002; KESSLER *et al.*, 2003; PADUA *et al.*, 2010). (LÓPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006) demonstraram que flavonoides possuem uma atividade antioxidante e uma função protetora no tratamento de doenças degenerativas mediadas pelo estresse oxidativo. Baseado nesta informação e sabendo que o diabetes está intimamente associado à produção de espécies reativas de oxigênio, isso possibilitaria a Quercetina ser um possível agente terapêutico no tratamento coadjuvante do diabetes. Dados da literatura confirmam essa possibilidade uma vez que já foi sugerido que a Quercetina apresenta um potencial antidiabético, melhorando o estado hiperglicêmico e reduzindo a incidência de complicações periféricas no diabetes (WANG *et al.*, 2011; JEONG *et al.*, 2012). Além disso, outras pesquisas também mostraram que o consumo em longo prazo de Quercetina parece controlar os níveis de glicose sanguínea jejum e pós-prandial (KIM *et al.*, 2011), além de ser sugerido que ela também protege o pâncreas contra o estresse oxidativo e melhora o estado hiperglicêmico, ambos em modelo animal diabético induzido com STZ (COSKUN *et al.*, 2005; ADEWOLE *et al.*, 2006).

Em 2014, pesquisadores relataram que o tratamento com Quercetina promoveu vários benefícios em camundongos com nefropatia diabética. Os achados laboratoriais resumiram-se em uma redução significativa dos níveis glicêmicos, de triacilgliceróis e de creatinina plasmática, além de reduzir a hiperplasia glomerular e o quadro de estresse oxidativo (GOMES *et al.*, 2014). Resultados promissores também foram encontrados quando WANG *et al.*, avaliaram o efeito antidiabético da Pentametilquercetina (PMQ) em ratos neonatos diabéticos induzidos com STZ. Foi relatado pelo grupo que a PMQ promoveu uma redução dose-dependente na glicemia pós-prandial e aumentou a sensibilidade à insulina, prevenindo o desenvolvimento do diabetes (WANG *et al.*, 2011).

Em relação à apoptose e viabilidade celular, vários estudos já demonstraram a eficácia de compostos flavonólicos. (LIN *et al.*, 2012) avaliaram o efeito protetor de alguns flavonoides, dentre eles a Quercetina, contra a apoptose de células beta mediada por citocinas em cultura de células secretoras de insulina INS-1. Eles concluíram que o tratamento com Quercetina foi capaz de minimizar a apoptose das células beta, sugerindo que este flavonoide seja capaz de proteger tais células contra a toxicidade das citocinas, aumentando a sobrevivência celular. Em 2010, YOUL *et al.* também observaram que a Quercetina foi capaz de estimular a secreção de insulina de maneira glicose dependente tanto em cultura de células INS-1 quanto em ilhotas pancreáticas de ratos, além de

aumentar a viabilidade celular mesmo na presença do dano oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (YOUL *et al.*, 2010). Além dos modelos *in vitro* citados, efeito protetor mediado pela Quercetina também foi demonstrado em modelo experimental *in vivo* de diabetes tipo 1, observando-se melhora no controle glicêmico e na arquitetura pancreática (VESSAL *et al.*, 2003; COSKUN *et al.*, 2005; KOBORI *et al.*, 2009).

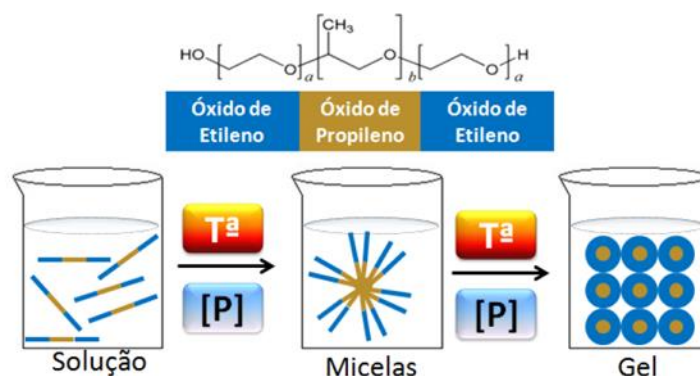
Embora tenha sido sugerido que o tratamento com Quercetina é capaz de reduzir a glicemia no modelo experimental de diabetes tipo 1, um passo limitante ao uso da Quercetina como um agente antidiabético oral coadjuvante é a sua baixa absorção intestinal, conduzindo a uma baixa biodisponibilidade. Dados da literatura relatam que a baixa solubilidade em água da Quercetina leva a uma mínima absorção no trato gastrointestinal, e sua biodisponibilidade oral é < 17% em ratos e apenas 1% em homens tornando-se assim um obstáculo para a exploração farmacológica (GUGLER *et al.*, 1975; FEARN e HIRST, 2006). Para contornar esta limitação, a proposta deste estudo foi elaborar uma formulação que permitisse uma melhor absorção da Quercetina com o objetivo de potencializar os efeitos benéficos do Inibidor da DPP-4 na homeostase metabólica em um modelo experimental de diabetes tipo 1.

## **2.7 – Importância da Formulação**

Sistemas de administração de fármacos à base de micelas poliméricas feitas a partir de polímeros anfifílicos têm sido amplamente aplicados para a liberação de fármacos fracamente solúveis (TORCHILIN, 2001; GAUCHER *et al.*, 2005). O núcleo hidrofóbico das micelas pode servir como um espaço de carga para a encapsulação de vários agentes terapêuticos pouco solúveis e é responsável pela estabilidade e liberação do fármaco, enquanto a camada hidrofílica exterior protege contra o ataque do sistema retículo-endotelial (RES) e benéficamente modifica a farmacocinética e o comportamento de biodistribuição, em geral, resultando em um aumento na biodisponibilidade (JONES e LEROUX, 1999; LU e PARK, 2013).

A baixa hidrofiliabilidade da Quercetina afeta a sua atividade biológica, e como resultado as aplicações clínicas desta são muito restritas. Baseado nisso, estratégias em tecnologias farmacêuticas para melhorar a solubilidade em água e biodisponibilidade da Quercetina tem sido desenvolvidas, como por exemplo, o seu encapsulamento em estruturas poliméricas. Neste contexto, um sistema polimérico de interesse são os géis

aquosos termorreversíveis do copolímero polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno, ou poloxamer 407 (P-407), com ação tensoativa e tem sido estudado como formador de géis de liberação controlada (RICCI *et al.*, 2005). O P-407 atua como carreador em função da sua propriedade tensoativa e apresenta vantagens como baixo ponto de fusão, baixa toxicidade e compatibilidade com outras substâncias (ZHANG *et al.*, 2002). À baixas temperaturas (0~18°C), as cadeias individuais do polímero quando em concentrações superiores a 20% se agregam em solução formando micelas esféricas consistidas de um centro de óxido de polipropileno (hidrofóbico) circundado por camadas de óxido de polietileno (hidrofílico). À alta temperatura (18~40°C), as micelas se enovelam devido a desidratação da região hidrofóbica, formando um hidrogel homogêneo (DUMORTIER *et al.*, 2006; NIU *et al.*, 2009) (**Figura 11**). Estes géis apresentam uma estrutura muito peculiar, favorecendo a solubilização de fármacos e aditivos de baixa solubilidade em água.



**Figura 11.** O poloxamer 407 é composto por 95 – 105 unidades de óxido de etileno (a) e por 54 – 60 unidades de óxido de propileno (b). Com o aumento da concentração ([P]) e/ou da temperatura ( $T^a$ ) a solução de poloxamer se organiza em micelas, formando uma estrutura ordenada na forma de gel. (Fonte: DUMORTIER, 2006).

Pesquisa recente, utilizando um sistema micelar de liberação, preparado com polímeros anfifílicos e lecitina (LMPM), demonstrou que a solubilidade da Quercetina no sistema Que-LMPM aumentou para 5,81 mg/ml quando comparado com a Quercetina livre em água de 0,17-7,7 µg/ml. O estudo farmacocinético *in vivo* demonstrou que Que-LMPM apresentaram maior área sob a curva concentração-tempo e uma meia-vida maior, conduzindo a uma melhor biodisponibilidade em comparação com a injeção de Quercetina livre (CHEN *et al.*, 2016). Além disso, foi comprovado também que o encapsulamento da Quercetina corresponde a uma metodologia capaz de aumentar a sua atividade biológica. (POOL *et al.*, 2012) ao promoverem o encapsulamento da Quercetina em nanopartículas de PLGA, esta foi capaz de aumentar as propriedades antioxidante e



quelante deste flavonoide, fazendo com que este sistema de entrega possa ser útil na terapia para retardar o desenvolvimento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, como por exemplo, o diabetes.

Diversos autores também conseguiram reproduzir o efeito gerado por diferentes complexos fosfolipídicos em aumentar a biodisponibilidade oral de flavonoides, seja utilizando flavonoides acoplados a fosfatidilcolina (TFH-PC) (WANG *et al.*, 2015), seja sintetizando nanopartículas de sílica carregadas com Quercetina pelo método de micro-emulsão óleo-em-água, que é um sistema adequado para a produção de nanopartículas funcionais de dimensão e de forma controlada. Neste estudo, os resultados sugerem que a atividade antioxidante e anti-inflamatória da Quercetina foram mantidas após o encapsulamento em sílica (LEE *et al.*, 2016).

Desta forma, baseado em dados confirmados pela literatura, as formulações de microesferas são promissoras estruturas de transporte de flavonoides, como a Quercetina, possibilitando incorporação estável e favorável à liberação controlada de fármacos hidrofóbicos (HAZRA *et al.*, 2015). Além disso, existe ainda a necessidade de estudos serem conduzidos com o referido polímero P-407 em dispersões sólidas na melhoria da dissolução de fármacos pouco solúveis (AHUJA *et al.*, 2007; MAJERIK *et al.*, 2007).

Uma vez que o histórico de incidência do diabetes mostra um crescimento vertiginoso (IDF, 2017), acrescido de informações da literatura que revelam efeitos benéficos dos flavonoides no quadro diabético (JEONG *et al.*, 2012) e estudos do nosso grupo de pesquisa que comprovaram o efeito promissor da Vildagliptina no diabetes tipo 1 (ÁVILA *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2015), a proposta inicial deste trabalho em desenvolver e administrar concomitantemente a Vildagliptina e Quercetina em uma formulação oral para tratamento do diabetes tipo 1 produzirá contribuições significativas, considerando que não há relatos de trabalhos sobre a administração simultânea destes dois compostos na obtenção de efeito complementar. Além dos efeitos farmacológicos dos ativos já exibidos em publicações anteriores, o desenvolvimento de uma formulação oral para o tratamento do diabetes tipo 1 aparece como proposta inovadora, considerando que, até o presente momento, a única terapia eficaz no controle dessa doença consiste em aplicações subcutâneas de insulina. O desenvolvimento de uma formulação oral de Vildagliptina em associação com Quercetina que possibilite a liberação simultânea destes fármacos permitirá conhecer o impacto deste tratamento no controle da glicemia e na produção de insulina pelo pâncreas. A formulação que propomos é simples, de fácil preparação e não necessita de equipamentos sofisticados para o seu desenvolvimento.

Estes fatores podem levar a redução do custo de produção do medicamento quando comparado a outras formas de tratamentos tradicionais, bem como nos gastos de prevenção e controle do SUS com o paciente diabético, além de proporcionar uma melhor adesão e comodidade ao paciente por evitar a dor da picada causada por formulações de insulina.

## CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

### 3.1 – Objetivo Geral

Desenvolvimento e avaliação do potencial antidiabético de uma formulação oral contendo Vildagliptina e Quercetina em ratos diabéticos tipo 1 induzidos por aloxano.

### 3.2 – Objetivos Específicos

#### 3.2.1 – Ensaio *in vitro*

- Desenvolver uma formulação contendo Vildagliptina e Quercetina a partir de soluções de P-407.

#### 3.2.2 – Ensaio *in vivo*

- Quantificar a glicemia final de jejum e sua variação ao longo do tempo de tratamento.
- Avaliar a taxa de sobrevivência dos animais.
- Quantificar os níveis séricos de insulina e glucagon.
- Avaliar a atividade da enzima Hexocinase pancreática e hepática.
- Quantificar o glicogênio hepático.
- Quantificar os níveis do receptor de GLP-1 (GLP1R) pancreático e hepático.
- Quantificar os níveis do transportador de glicose (GLUT-2) pancreático e hepático.
- Avaliar os níveis séricos de frações lipídicas
- Avaliar os níveis séricos de enzimas e metabólitos relacionados às funções hepática e renal
- Avaliar a atividade da enzima Metaloproteinase-2 (MMP-2) no pâncreas e rim.
- Quantificar o número de ilhotas pancreáticas e avaliar a capacidade funcional das células beta pancreáticas (índice HOMA%BETA).
- Quantificar a insulina no tecido pancreático.

## CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – Ensaio *in vitro*

#### 4.1.1 – Preparo da formulação contendo Vildagliptina e Quercetina a partir de soluções de P-407 (MIRANDA *et al.*, 2016) (Registro de Patente: BR1020160055482)

A Formulação foi preparada em 3 etapas, conforme descrito abaixo:

##### Etapa 1: Preparo da Fase A – Dispersão da Quercetina em sistema micelar polimérico de P-407

Uma quantidade precisamente pesada, em gramas, de Quercetina referente à 50mg/Kg de peso corpóreo para um volume final de 0,5mL foi adicionada lentamente a um tubo Falcon contendo um volume preciso de solução de hidróxido de sódio (NaOH 1,0M). A suspensão foi colocada no vortex e posteriormente no sonicador até completa dispersão da Quercetina. Após a dispersão, um volume preciso de solução de ácido clorídrico (HCl 1,0M) foi adicionado a suspensão, e sob agitação magnética constante, moderada e em banho de gelo (4-8°C), foi adicionado, lentamente, uma quantidade precisamente pesada referente à 16% do polímero P-407. Após a completa dispersão do polímero, um volume preciso de ácido oleico (5%) foi adicionado à formulação e esta foi mantida sob agitação magnética constante enquanto a Fase B era preparada.

##### Etapa 2: Preparo da Fase B – Dispersão da Vildagliptina

Inicialmente, duas suspensões foram preparadas separadamente. A primeira suspensão contém a quantidade, em gramas, de Vildagliptina referente à 10mg/Kg de peso corpóreo para um volume final de 0,5mL. O valor pesado de Vildagliptina foi colocado em um erlenmeyer ao qual foi adicionado o mesmo volume, em mL, de Tween 80. A segunda suspensão é composta por metilcelulose (76mg de metilcelulose para cada 400mg de Vildagliptina), mesmo volume, em µL, de Tween 80 e quantidade suficiente de água destilada para completar o volume total da solução. As duas suspensões foram sonicadas, separadamente, em um aparelho de ultrassom durante 15 minutos. Após serem sonicadas, a segunda solução foi mantida em um agitador magnético durante 15 minutos e posteriormente as duas suspensões foram misturadas e novamente sonicadas por 15 minutos. Para finalizar, a mistura final foi agitada em agitador magnético por 30 minutos, visando garantir a total dissolução do medicamento.

### Etapa 3: Junção das Fases – Formulação QV

Ainda sob agitação magnética constante, a Fase B foi vertida, lentamente, à Fase A. Após completa homogeneização da mistura, o pH foi avaliado e corrigido para o valor final de 7,0 – 7,2. Em seguida, a formulação foi mantida em repouso sob refrigeração à 4°C.

## **4.2 – Ensaios *in vivo***

### **4.2.1 – Animais e Cuidados Éticos**

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Fisher, com idade aproximada de 120 dias e peso médio de 200 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição (ENUT) da *Universidade Federal de Ouro Preto*. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura, luminosidade e umidade controladas e receberam água e comida “*ad libitum*”. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob número de protocolo 2014/17 (em anexo).

### **4.2.2 – Delineamento Experimental**

Foram utilizadas 43 ratas albinas da linhagem Fisher. Após a indução e confirmação do diabetes (glicemia  $\geq 300\text{mg/dL}$ ), as ratas foram submetidas ao tratamento medicamentoso por 30 dias consecutivos. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais:

Controle (C): receberam 1mL da formulação contendo o veículo (n= 6) via orogástrica;

Diabético (D): receberam 1mL da formulação contendo o veículo (n=11) via orogástrica;

Diabético formulação (DQV): receberam 1mL da formulação contendo Vildagliptina (10mg/Kg) e Quercetina (50 mg/Kg) (n=14) via orogástrica;

Diabético insulina (DI) (controle positivo): receberam 2UI de insulina NPH, às 09:00 horas da manhã, diariamente, (n=12) por injeção intraperitoneal.



**Figura 12.** Linha temporal para o delineamento experimental

### **4.2.3 – Indução do diabetes**

Para indução do diabetes as ratas pertencentes aos 3 grupos diabéticos receberam, após 8 horas de jejum, dose única de injeção intraperitoneal a 135mg/Kg de massa corpórea de Alozano (ALX) (Alloxan Monohydrate Sigma®), também conhecido como 2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina monoidratada dissolvida em 0,2mL de NaCl a 0,9% (ROSSONI-JUNIOR *et al.*, 2012). O grupo controle recebeu injeção intraperitoneal contendo o mesmo volume de solução de NaCl a 0,9%.

Posteriormente à indução, foi fornecida aos animais uma solução de glicose 10%, como única fonte hídrica, por aproximadamente 4 horas, para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células beta do pâncreas (MAZZANTI *et al.*, 2003).

Para confirmação do diabetes, três dias após a injeção de alozano, os animais foram submetidos a uma avaliação dos níveis de glicose plasmática em jejum de 8 horas, empregando-se amostra de sangue coletada da cauda. Os níveis de glicose foram medidos por meio de um glicosímetro Accu-Chek Advantage (Boehringer Mannheim, IN, USA). Os animais com glicemia de jejum superior a 300 mg/dl (~16.6 mmol/L) foram considerados diabéticos (MIRANDA *et al.*, 2015).

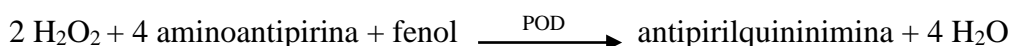
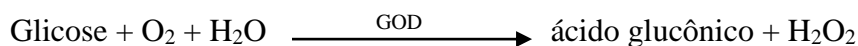
### **4.2.4 – Eutanásia e coleta do material biológico**

Ao fim dos 30 dias de tratamento os animais foram mantidos em jejum de 8 horas, anestesiados por inalação com isoflurano e a eutanásia procedeu-se por exsanguinação. O sangue foi coletado através de secção de vasos sanguíneos da região axilar e armazenado em tubos de polipropileno com ou sem 15µL de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 10000rpm por 15 minutos e o plasma ou soro armazenados em freezer -80°C. O pâncreas, rins e fígado foram extraídos e imediatamente armazenados em freezer -80°C para a realização das análises posteriores. Uma fração do pâncreas e fígado foram armazenados em formol 4% para posterior confecção de lâminas para a análise histológica.

#### 4.2.5 – Análise dos parâmetros bioquímicos

##### ➤ Glicemia

Os níveis plasmáticos de glicose foram determinados por método colorimétrico utilizando Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este, através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), reage com 4-aminoantipirina e fenol formando uma antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja absorvância medida em 505nm é proporcional à concentração de glicose na amostra. O kit fornece um padrão de glicose com concentração de 100 mg/dL.



Resumidamente, em 3 tubos de polipropileno foram adicionados 10 µL de plasma (teste) ou solução padrão de glicose e 1000 µL de reagente 1 (tampão 50mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥ 11.000 U/L; peroxidase ≥ 700 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 µmol/L; fenol ≥ 1 mmol/L e azida sódica 7,5 mmol/L). Os tubos foram misturados vigorosamente e incubados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Reagente 1 será utilizado como branco. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 505nm. A concentração de glicose nas amostras foi obtida dividindo a absorvância do teste pela absorvância do padrão e multiplicada por 100. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,0556 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

##### Cálculos:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 100$$

Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0556

➤ Insulina sérica

Para determinação da concentração de insulina sérica foi utilizado o kit comercial “*Rat/Mouse Insulin ELISA kit*” (Merck Millipore, USA). Este kit é sensível para determinação de insulina em ratos, utilizando-se o método de “ELISA sanduiche” (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). Resumidamente, nesta técnica, o anticorpo (anti-insulina) foi imobilizado na microplaca. A amostra (10  $\mu$ L) contendo a insulina foi adicionada, reagindo com o anticorpo anti-insulina imobilizado. Após a lavagem de poços, um segundo anticorpo anti-insulina ligado a uma peroxidase foi adicionado, permitindo-se a reação com o complexo anticorpo/insulina presente na microplaca. Após o segundo anticorpo livre ser removido por lavagem, o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado, e o produto da reação colorido foi medido no leitor de microplaca a 450 e 590nm. A concentração de insulina foi determinada pela interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância versus a concentração correspondente do padrão de insulina de rato.

➤ Glucagon sérico

Para determinação da concentração de glucagon sérico foi utilizado o kit comercial “Cloud-Clone Corp. para Glucagon” (Katy, TX, USA). Este kit é sensível para determinação de glucagon em ratos, utilizando-se o método de “ELISA sanduiche” (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). Este ensaio emprega a técnica de imunensaio enzimático de inibição competitiva. Um anticorpo monoclonal específico para o glucagon foi pré-revestido sobre a microplaca. Uma reação de inibição competitiva entre o glucagon marcado com biotina e o glucagon não marcado (Padrões ou amostras) com o anticorpo pré-revestido específico do glucagon. Após incubação, o conjugado não ligado é lavado. Em seguida, a avidina conjugada com peroxidase (HRP) é adicionada a cada “well” da microplaca e incubada. A quantidade de conjugado HRP ligado é inversamente proporcional à concentração de glucagon na amostra. Após a adição da solução de substrato, a intensidade de cor desenvolvida é inversamente proporcional à concentração de glucagon na amostra.



➤ HOMA%BETA

O “Homeostasis Model Assessment” – HOMA%BETA - é um modelo matemático desenvolvido há mais de quinze anos por DR Matthews, RC Turner e colaboradores do Laboratório de Investigação de Diabetes de Radcliffe, Oxford UK, como uma forma alternativa de avaliar a capacidade funcional da célula beta, mediante a determinação da concentração de glicose e insulina plasmática em jejum. Uma vez determinados os níveis de glicose e insulina, o índice HOMA%BETA pode ser calculado pela seguinte fórmula matemática:

$$\text{HOMA}_{\text{betacell}} = \frac{20 \times \text{Insulina Jejum} \left(\frac{\text{mU}}{\text{L}}\right)}{\text{Glicose Jejum} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right) - 3,5}$$

➤ Perfil Lipídico

Os níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e fração HDL foram determinados por método colorimétrico utilizando Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

Fração Colesterol não-HDL

Os níveis séricos de colesterol não-HDL foram determinados por método indireto, subtraindo-se os valores do colesterol total menos os valores da fração HDL-C, como demonstrado a seguir.

$$\text{Colesterol não-HDL (mmol/L)} = \text{Colesterol total (mmol/L)} - \text{Colesterol HDL (mmol/L)}$$

➤ Função Hepática e Função Renal

Os níveis séricos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), e dos compostos Creatinina e Ureia foram determinados por método colorimétrico. As enzimas hepáticas foram dosadas utilizando Kit BioVision, enquanto os níveis de creatinina e ureia foram dosados por Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil). Todas as análises seguiram de acordo com as instruções do fabricante.

➤ Atividade da enzima Hexocinase

A atividade da enzima Hexocinase foi mensurada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio de Hexoquinase *BioVision*. A glicose é convertida em glicose-6P pela Hexocinase; a glicose-6P é oxidada pela enzima glicose-6P desidrogenase para formar NADH que reduz uma sonda incolor em um produto colorido com forte absorvância a 450 nm. Consiste de um ensaio cinético e a atividade da hexocinase foi avaliada pela seguinte fórmula:

$$\text{Ativ. Hexocinase} = B / (\Delta T \times V) \times \text{Fator Diluição (mU/mL)}$$

Onde: B = quantidade de NADH da curva padrão (nmol)

$\Delta T$  = tempo de reação (min)

V = volume de amostra adicionado no poço de reação (mL)

➤ Concentração do transportador de glicose isoforma 2 (GLUT2)

Para determinação da concentração do receptor Glut2 nos tecidos pancreático e hepático foi utilizado o kit comercial “Cloud-Clone Corp. para GLUT2” (Katy, TX, USA). A microplaca do kit encontra-se pré-revestida com um anticorpo específico para GLUT2. Padrão ou amostra são adicionados aos poços da placa com um anticorpo, conjugado com biotina, específico para GLUT2. Em seguida, a avidina conjugada com peroxidase (HRP) foi adicionada a cada “well” da microplaca e incubada. Após a adição da solução de substrato, apenas os poços que contem GLUT2, anticorpo conjugado com biotina e avidina conjugada com peroxidase exibiram a mudança de cor. A reação substrato-enzima foi terminada pela adição de ácido sulfúrico e a mudança de cor foi mensurada por espectrofotometria em 450nm. A concentração de GLUT2 nas amostras foram determinadas através da absorvância das amostras na curva padrão.

➤ Concentração do receptor de GLP-1 (GLP-1R)

Para determinação da concentração do receptor GLP1R nos tecidos pancreático e hepático foi utilizado o kit comercial “Cloud-Clone Corp. para GLP1R” (Katy, TX, USA). A microplaca do kit encontra-se pré-revestida com um anticorpo específico para

GLP1R. Padrão ou amostra foram adicionados aos poços da placa com um anticorpo, conjugado com biotina, específico para GLP1R. Em seguida, a avidina conjugada com peroxidase (HRP) foi adicionada a cada “well” da microplaca e incubada. Após a adição da solução de substrato, apenas os poços que contem GLP1R, anticorpo conjugado com biotina e avidina conjugada com peroxidase exibiram a mudança de cor. A reação substrato-enzima foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico e a mudança de cor foi mensurada por espectrofotometria em 450nm. A concentração de GLP1R nas amostras foram determinadas através da absorbância das amostras na curva padrão.

#### ➤ Atividade de Metaloproteinases

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito por (SUNG *et al.*, 2007) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% contendo gelatina do tipo A de pele suína (Sigma Chem. Co, St. Louis, Mo. EUA) na concentração de 2mg/mL e os géis de entrada poliacrilamida 5% (w/v) em placas de 0,75mm. A eletroforese foi realizada com a concentração de 30µg de proteína para cada amostra, acrescido de tampão RIPA e tampão de amostra para SDS-PAGE. Antes da aplicação no gel as mesmas foram aquecidas por dois minutos a 37°C banho úmido. Um volume de 10µL do marcador padrão de massa molecular (*BLUeye Prestained Protein Ladder – Genedirex*) foi utilizado em todas as corridas.

A corrida da eletroforese foi realizada durante 120 minutos a 100V no mesmo sistema utilizado para o *western blotting*. Após a eletroforese os géis foram cuidadosamente lavados 3 vezes em 2,5% Triton X-100 para total remoção do SDS seguido de incubação a 37°C por 18 horas em tampão contendo o substrato 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% NaN<sub>3</sub> (pH 7,5). SDS é o agente responsável pela ativação das metaloproteases mesmo na forma inativa sem clivagem proteolítica. Os géis foram corados com 0,05% *Coomassie Brilliant blue G-250* por 3 horas e descorados com solução descorante (4% metanol, 8% ácido acético e água). A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. As metaloproteases são secretadas na forma latente e necessitam de clivagem do terminal peptídico NH<sub>2</sub> para sua ativação.

Após descorar o gel da zimografia e após a revelação da membrana, as bandas foram quantificadas com auxílio do software *Quantity One* (BioRad) utilizando uma estação de captura de imagem (*Carestream 4000 MM Pro Image Station*) e do software

*ImageJ* versão 1.32j de domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/> onde a densidade óptica de cada banda foi detectada. Utiliza-se como parâmetro para análise o volume ajustado das bandas, que significa o volume total diminuído do *background*. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade óptica pra a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada quando se passa a analisar a outra banda.

#### **4.2.6 – Análise dos parâmetros histológicos**

##### ➤ Número de ilhotas pancreáticas

Fragmentos de pâncreas de até 4mm de diâmetro foram fixados em uma solução de formaldeído 4%. Foram então desidratados e embebidos em parafina. O tecido pancreático foi fixado e processado em série decrescente de álcoois e posteriormente embebido em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente 4µm foram obtidas em micrótomo semiautomático, montadas e coradas pela técnica Hematoxilina & Eosina (H&E), para visualização de danos histológicos. As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital 5000, com o software de análises *Leica Application Suite*. A contagem morfométrica foi realizada no software *Leica QWin Plus* versão 3.0 (Leica Microsystems INC., Buffalo Grove, IL, USA) no qual foi realizada a contagem do número de ilhotas pancreáticas (SILVA *et al.*, 2011; ÁVILA *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2015).

##### ➤ Quantificação de insulina no tecido pancreático

Os cortes do tecido pancreático inicialmente parafinados foram desparafinados em xilol (30 minutos em xilol 1 e xilol 2), hidratados por 5 minutos em série graduada de álcool (absoluto 1, absoluto 2, 90°, 80° e 70°) e lavados em PBS 1x durante 5 minutos. O primeiro bloqueio referente ao da peroxidase endógena foi feito pela incubação com água oxigenada (4%) durante 30 minutos, seguido de 3 lavagens em PBS 1x, durante 5 minutos. O segundo bloqueio referente aos sítios inespecíficos foram feitos com leite desnatado Molico® 7% durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo específico primário anti-insulina diluído 1:5000 (Monoclonal Anti-Insulin,

I2018-2mL, lot:084M4769, Sigma-Aldrich) e armazenadas em câmara úmida a 4°C *overnight*. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS 1x durante 5 minutos, cada, seguido da adição do anticorpo secundário biotilado (DAKO, NIH) e novamente incubado em câmara úmida durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se com 3 lavagens em PBS 1x durante 5 minutos, cada, e incubadas com estreptavidina conjugada a peroxidase (DAKO, NIH) em câmara úmida durante 30 minutos à temperatura ambiente. As seções foram lavadas em PBS 1x contendo 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) (0,005%) e peróxido de hidrogênio (0,03%). A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 440x e as células positivas apresentaram coloração amarronzada.

➤ Quantificação de glicogênio no tecido hepático

A técnica de coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) é usada principalmente para a coloração de estruturas que contenham uma alta proporção de carboidratos, como glicogênio, glicoproteínas e proteoglicanos, geralmente encontrados em tecidos conjuntivos, muco e membranas basais. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para a evidenciação e quantificação de depósitos de glicogênio no fígado. O ácido periódico oxida seletivamente os seguintes grupos: 1,2 glicólico, amínico primário (1-hidroxi-2-amínico); amínico secundário (1-hidroxi-2-amínico) e 1-hidroxi-2-cetônico. Durante o processo de oxidação, as ligações entre átomos de carbono na posição 1,2 se partem e, conseqüentemente, formam-se grupos aldeídicos. Na reação seguinte, a fúscsa sulfúrea presente no reagente de Schiff transforma esses 2 grupos aldeídicos contíguos em um composto corado insolúvel semelhante à fucsina básica. Entretanto, são necessárias três condições para que essas reações ocorram: 1) grupos hidroxílicos livres; 2) compostos formados após a oxidação não devem disseminar pelo tecido; 3) deve haver grupos aldeídicos suficientes nos compostos para um estudo histoquímico. Somente macromoléculas como glicanos e mucinas atendem a tais requisitos. O ácido periódico é utilizado como oxidante porque retém a oxidação na fase aldeídica. Os cortes do tecido hepático inicialmente parafinados foram desparafinados em xilol (30 minutos em xilol 1 e xilol 2), hidratados por 5 minutos em série graduada de álcool (absoluto 1, absoluto 2, 90°, 80° e 70°) e lavados em PBS 1x durante 5 minutos. Em seguida realizou-se a coloração utilizando kit *Easy Path Periodic Acid Schiff* (EP-12-20014) seguindo a metodologia proposta pelo fabricante.

#### **4.2.7 – Análise estatística**

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e histológicos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Os dados seguiram a distribuição normal e foram analisados pelo teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (San Diego, California, USA).

# CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

## 5.1 – Ensaio *in vitro*

### 5.1.1 – Desenvolvimento da Formulação QV

Foi obtida a Fase A, uma dispersão homogênea, de aspecto cremoso e coloração amarelo-esverdeada, coloração essa característica do ativo Quercetina.

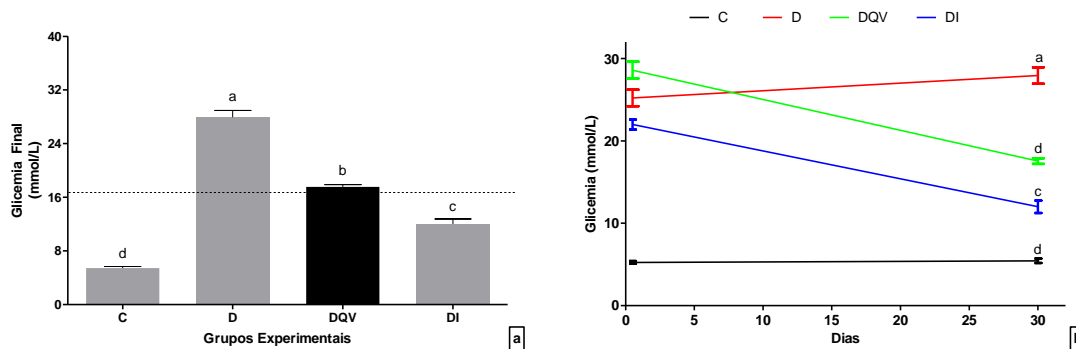
A Fase B obtida caracterizou-se por uma dispersão homogênea e translúcida com coloração esbranquiçada.

A junção das duas fases resultou na Formulação QV com aparência leitosa e coloração amarronzada. Essa formulação apresentou-se homogênea, não observando-se fenômenos de instabilidade como cremeação e floculação.

## 5.2 – Ensaio *in vivo*

### 5.2.1 – Glicemia de jejum

Para avaliarmos a eficiência dos tratamentos com a formulação QV e a insulina (controle positivo) analisamos o perfil glicêmico dos grupos experimentais. Análise da glicemia final de jejum (**Figura 13a**) revelou que os animais do grupo diabético não tratado apresentaram glicemia significativamente superior aos animais do grupo controle, enquanto que tanto a formulação QV quanto as doses diárias de insulina foram eficazes em reduzir a condição hiperglicêmica a qual os animais estavam submetidos. O tratamento com insulina reduziu os níveis glicêmicos para valores abaixo do nível de glicemia padronizado neste estudo para considerar um animal diabético (>300mg/dL ou 16,6mmol/L). Embora o tratamento com a formulação não tenha possibilitado um retorno à normoglicemia, foi observado uma redução significativa na glicemia chegando à níveis próximos da meta glicêmica padronizada (linha pontilhada). Foi avaliada também a variação glicêmica ao longo do tempo de tratamento (**Figura 13b**). Ao compararmos a redução glicêmica proporcionada pelos tratamentos notamos que a porcentagem de redução da glicemia após 30 dias de tratamento com a formulação QV possibilitou uma redução de 70% nos níveis de glicose sanguíneo, ao passo que a insulina permitiu uma redução de aproximadamente 55%.

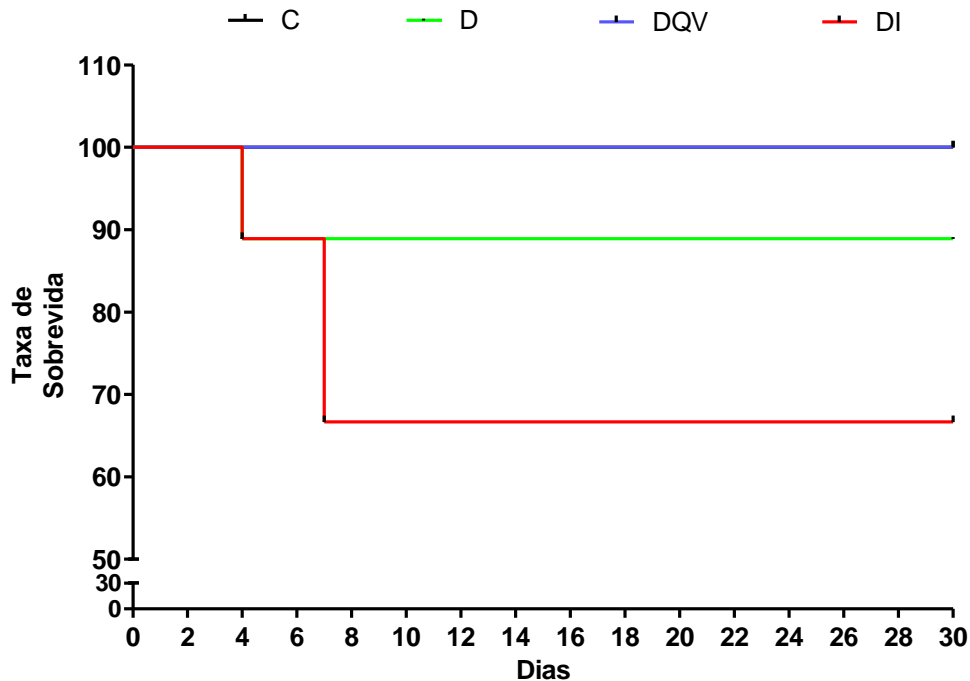


**Figura 13. Formulação QV reduz a glicemia.** (a) Glicemia final dos animais tratados ou não com a formulação QV ou insulina. (b) Variação glicêmica ao longo do tratamento (30 dias). C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ . Linha tracejada (Figura a) representando limiar de glicemia para animais serem considerados diabéticos ou não diabéticos (concentração de glicose sanguínea: 300mg/dL ou 16,6mmol/L).

### 5.2.2 – Taxa de sobrevivência dos animais

Uma vez estado de diabetes compromete a saúde dos animais, a taxa de sobrevivência ao longo do tempo de tratamento dos grupos experimentais foi acompanhada (**Figura 14**). No grupo de animais diabéticos que recebeu a formulação QV todos os animais sobreviveram após os 30 dias de experimentação. Resultado semelhante foi observado no grupo de animais não diabéticos, o grupo controle. A análise dos dados também revelou que 11,2% dos animais pertencentes ao grupo diabético morreram no intervalo de 4 dias pós indução do diabetes. A morte dos animais deste grupo possivelmente foi devido aos danos ocasionados pela indução do diabetes com a injeção intraperitoneal do aloxano. Dos animais que receberam tratamento insulínico, 33,3% vieram a óbito, o que pode ser justificado por possíveis picos hipoglicêmicos.

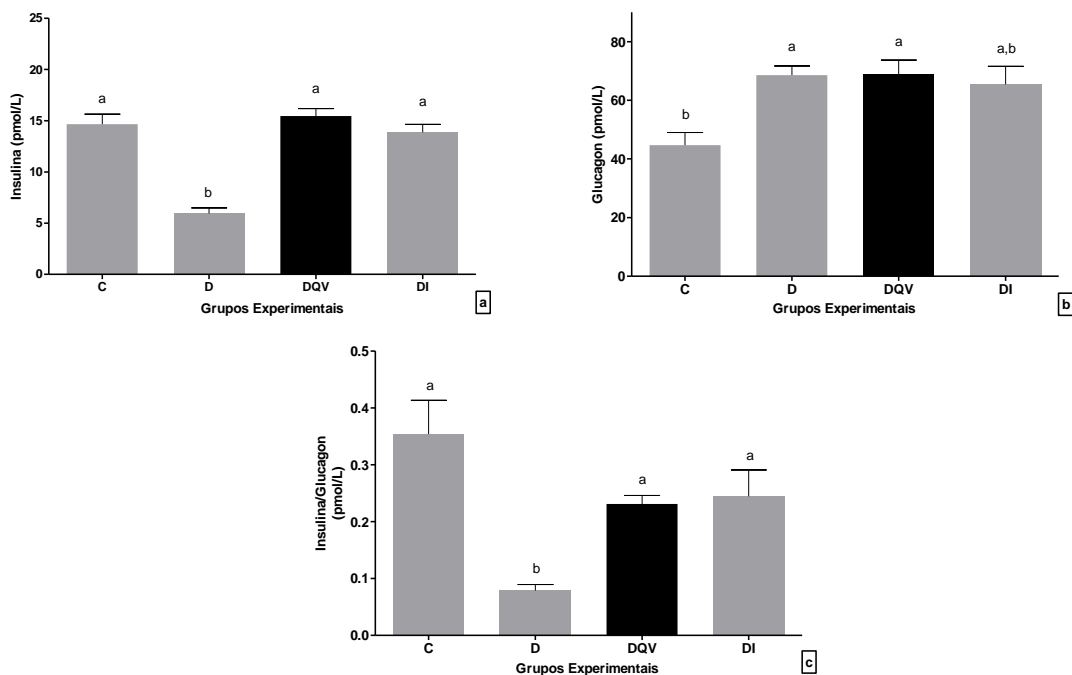




**Figura 14. Taxa de sobrevida dos grupos experimentais ao longo de 30 dias.** C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina.

### 5.2.3 – Níveis séricos de insulina e glucagon

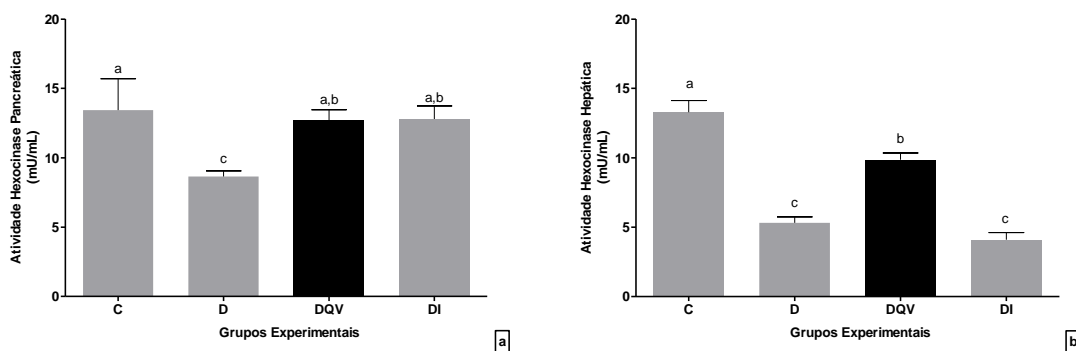
A análise da insulinemia (**Figura 15a**) revelou que os animais do grupo diabético apresentaram uma diminuição significativa nos níveis séricos de insulina em comparação com os animais do grupo controle. Como esperado do grupo controle positivo tratado com insulina, houve um aumento significativo nos níveis deste hormônio. Fato semelhante ocorreu após o tratamento farmacológico com a formulação QV, ou seja, ambos os tratamentos normalizaram a insulina sérica. Avaliação da glucagonemia (**Figura 15b**) revelou que os animais do grupo diabético apresentaram níveis séricos de glucagon superiores aos dos animais do grupo controle. Diferentemente do resultado anterior, nenhum dos tratamentos promoveu alteração significativa nos níveis deste hormônio, no entanto, ao avaliarmos a relação entre Insulina/Glucagon (**Figura 15c**), foi evidenciado que essa razão entre os hormônios, após o tratamento com a formulação QV e com a insulina, foi, estatisticamente igual ao grupo controle.



**Figura 15. Formulação QV mantém positiva a razão Insulina/Glucagon.** (a) Serum insulin levels. (b) Serum glucagon levels. (c) Insulin/Glucagon ratio. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

#### 5.2.4 – Atividade da Hexocinase pancreática e hepática

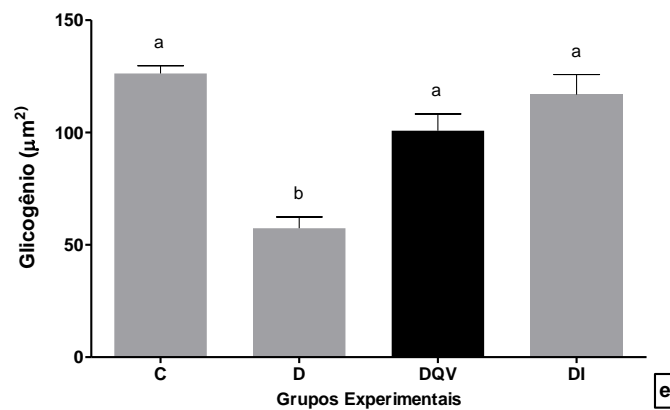
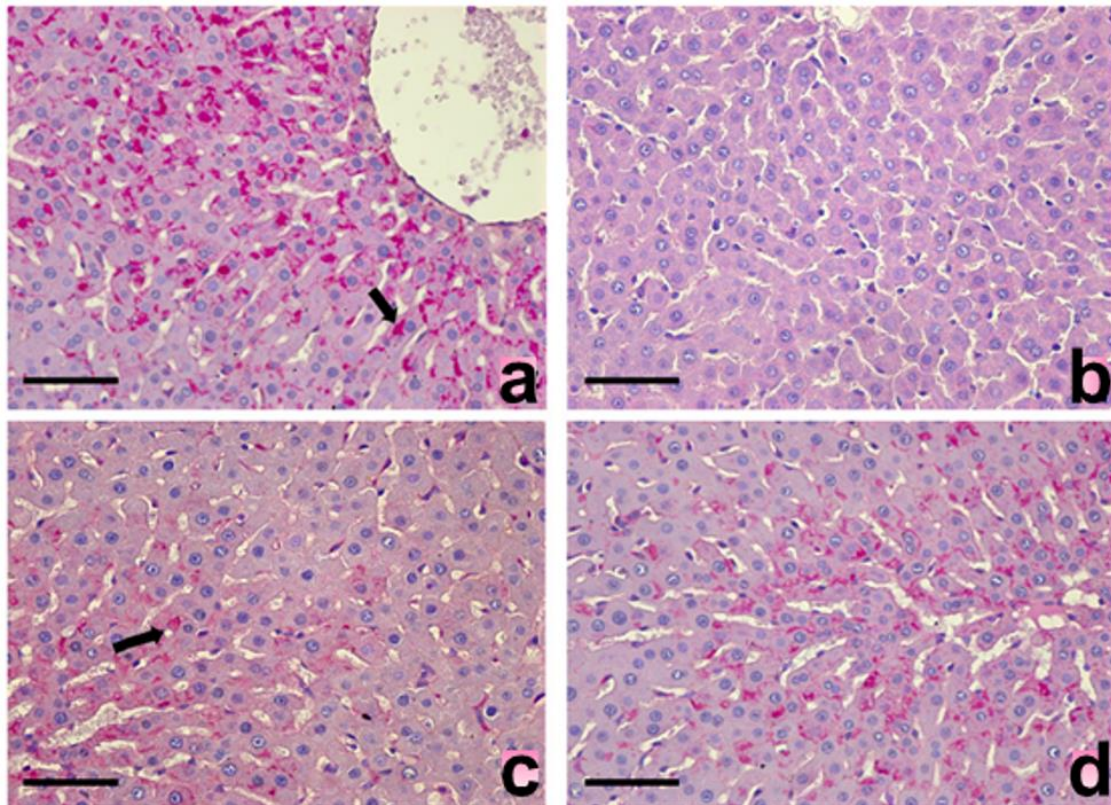
A análise da atividade da enzima hexocinase revelou que, tanto no pâncreas (**Figura 16a**) quanto no fígado (**Figura 16b**) de animais diabéticos não tratados essa enzima apresentou uma redução na sua atividade, sendo que em ambos os órgãos a administração da formulação QV possibilitou um aumento na capacidade funcional da hexocinase em fosforilar a molécula de glicose presente no meio e internalizá-la no ambiente intracelular. A atividade da hexocinase pancreática foi reestabelecida para níveis semelhantes à atividade enzimática em animais do grupo controle, em ambos os tratamentos medicamentosos. No fígado, o tratamento insulínico não foi eficaz em promover melhora na função desta cinase.



**Figura 16. Formulação QV aumenta a atividade da enzima Hexocinase pancreática e hepática.** (a) Atividade da Hexocinase Pancreática. (b) Atividade da Hexocinase Hepática. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.5 – Quantificação do glicogênio hepático

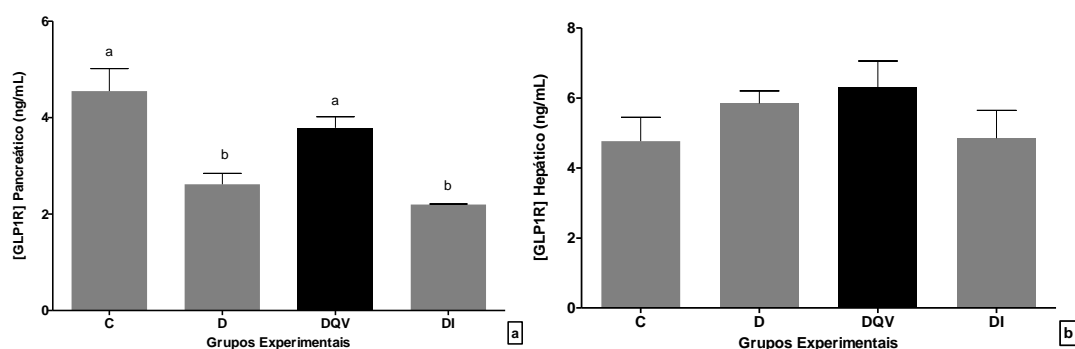
A representação histológica qualitativa dos resultados pode ser vista pela análise das fotomicrografias do tecido hepático corado por meio da técnica de PAS, indicando os depósitos de glicogênio (**Figura 17a – d**). Análise quantitativa comprovou que o armazenamento de glicogênio no fígado de animais diabéticos não tratados foi significativamente inferior em relação aos animais do grupo controle (**Figura 17e**). Os tratamentos, tanto com a formulação QV quanto com a insulina foram capazes de reestabelecer a reserva energética de glicogênio nos hepatócitos.



**Figura 17. Formulação QV aumenta a reserva energética de glicogênio hepático.** (a-d) Seções histológicas de fígado de animais experimentais corados por PAS em aumento de 440x. (a) Arquitetura normal do fígado e depósito de glicogênio dentro dos hepatócitos em animais do grupo controle. (b) Nenhum depósito de glicogênio foi visualizado no grupo de animais diabéticos não tratados. (c) Depósitos de glicogênio em animais diabéticos tratados com a formulação QV e (d) tratados com insulina. Setas indicando depósito de glicogênio. Barra de escala: 50µm. (e) Concentração de glicogênio nos hepatócitos. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.6 – Concentração de GLP-1R pancreático e hepático

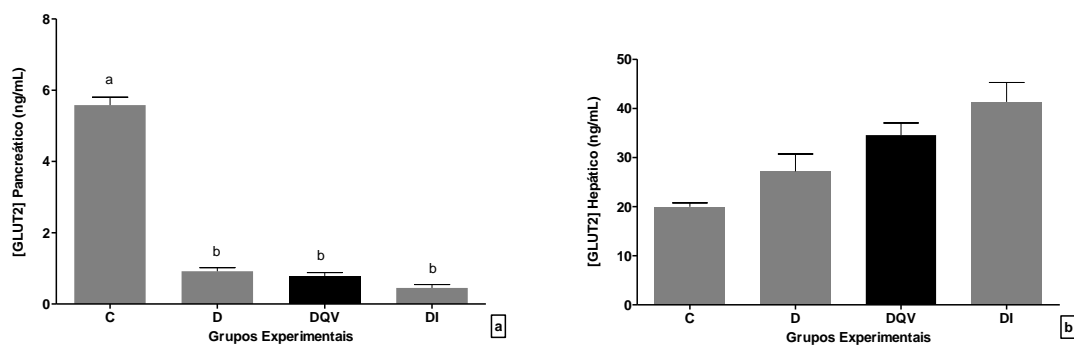
Os resultados abaixo mostram que a concentração do receptor pancreático do GLP-1 (GLP-1R) (**Figura 18a**) em animais diabéticos não tratados é significativamente menor em relação aos animais do grupo controle. A formulação QV foi eficiente em aumentar o nível tecidual de GLP-1R, diferentemente do tratamento com insulina. Assim como visualizado nos níveis de GLUT-2. Já a concentração hepática deste receptor da incretina não revelou nenhuma diferença entre os grupos experimentais (**Figura 18b**).



**Figura 18. Formulação QV aumenta os níveis pancreáticos de GLP-1R.** (a) Concentração pancreática de GLP-1R. (b) Concentração hepática de GLP-1R. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.7 – Concentração de GLUT-2 pancreático e hepático

Ao avaliarmos a concentração do receptor de glicose, GLUT-2, os resultados revelaram que a presença deste receptor no tecido pancreático (**Figura 19a**) de animais diabéticos não tratados é significativamente menor em relação à animais do grupo controle. Em acréscimo, nenhum dos tratamentos mostraram efeito positivo em aumentar os níveis de GLUT-2 no pâncreas. No fígado não foi observado nenhuma diferença nos níveis deste receptor entre os grupos experimentais (**Figura 19b**).



**Figura 19. Formulação QV não altera os níveis pancreáticos e hepáticos de GLUT-2.** (a) Concentração pancreática de GLUT-2. (b) Concentração hepática de GLUT-2. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.8 – Perfil lipídico

Mensuradas as dosagens de perfil lipídico (**Tabela 2**), a análise estatística revelou que o grupo de animais diabéticos não tratado apresentou altas concentrações séricas de frações não-HDL do colesterol em comparação com os animais do grupo controle. O tratamento com a formulação QV possibilitou uma redução significativa no nível destas frações aterogênicas, de forma que esses valores foram similares ao grupo controle. As aplicações diárias de insulina foram responsáveis pelo aumento nos níveis das frações não-HDL em relação ao animais controle, mantendo-se estatisticamente igual ao grupo de animais diabéticos não tratados. Quanto a fração colesterol de alta densidade (HDL), esses níveis foram significativamente menores nos animais do grupo diabético quando comparados aos animais do grupo controle, sendo que o tratamento com a formulação QV foi responsável por aumentar significativamente esta fração. Uma vez que a redução dos níveis de frações aterogênicas foi acompanhada pela aumento na fração HDL, nenhuma diferença foi evidenciada quando avaliado o parâmetro colesterol total. Os níveis séricos de triacilgliceróis também foram avaliados, sendo que este apresentou-se elevado no grupo de animais diabéticos não tratados, ao passo que nenhum dos tratamentos surtiu efeito em reduzir tais níveis. Além disso, notamos que a administração exógena de insulina foi responsável por aumentar consideravelmente os níveis de triacilgliceróis em relação aos animais do grupo controle.

Grupos Experimentais	C	D	DQV	DI
Fração não-HDL (mmol/L)	1,55 ± 0,19 <sup>c</sup>	2,24 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,09 <sup>b,c</sup>	2,18 ± 0,13 <sup>a,b</sup>
Fração HDL (mmol/L)	1,77 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,03 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>b,c</sup>
Colesterol total (mmol/L)	3,32 ± 0,21	3,00 ± 0,16	2,81 ± 0,07	3,06 ± 0,13
Triacilglicerol (mmol/L)	1,49 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,63 ± 0,18 <sup>a,b</sup>	2,05 ± 0,11 <sup>b,c</sup>	3,27 ± 0,30 <sup>a</sup>

**Tabela 2. Efeito da formulação QV no perfil lipídico.** Avaliação da disfunção lipídica para frações não-HDL e HDL, colesterol total e triacilglicerol. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.9 – Avaliação de parâmetros das funções hepática e renal

Para a análise da função hepática avaliamos os níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e da proteína albumina. Os resultados da **Tabela 3** mostram que os níveis séricos das enzimas hepáticas ALT/AST foram significativamente maiores nos grupos diabéticos quando comparados aos animais do grupo controle. O tratamento dos animais diabéticos com a formulação QV não alterou os níveis séricos de ALT/AST, no entanto os animais que receberam doses de insulina apresentaram maiores níveis da enzima AST quando comparados aos animais diabéticos. Somado a estes resultados, também observamos que o diabetes foi responsável por reduzir os níveis séricos da proteína albumina, entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de normalizar seus níveis séricos.

Para análise da função renal foram mensurados os níveis séricos de creatinina e ureia. Segundo nossos resultados, os animais diabéticos apresentaram níveis de ureia significativamente maiores em relação aos animais controle, sendo que o tratamento com a formulação QV conseguiu promover uma melhora neste parâmetro. Diferentemente da formulação, a insulina não conseguiu normalizar os níveis de ureia, mantendo-os estatisticamente igual aos níveis do grupo diabético não tratado. Os níveis séricos de creatinina também foram mensurados, porém não observamos nenhuma alteração significativa deste parâmetro em nenhum dos grupos avaliados, apesar de termos observado uma redução de aproximadamente 40% nos níveis de creatinina no grupo de animais tratados com a formulação QV em relação aos animais do grupo diabético sem tratamento.

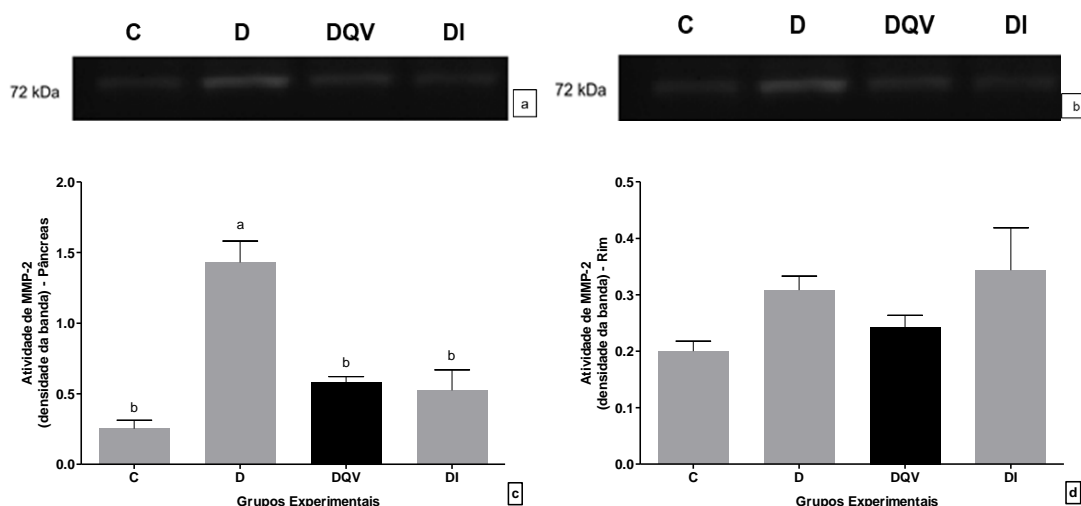
Grupos Experimentais	C	D	DQV	DI
ALT (U/L)	17,02 ± 1,71 <sup>b</sup>	43,77 ± 3,85 <sup>a</sup>	39,29 ± 1,13 <sup>a</sup>	39,29 ± 2,18 <sup>a</sup>
AST (U/L)	18,19 ± 0,94 <sup>c</sup>	40,16 ± 4,23 <sup>b</sup>	36,84 ± 0,98 <sup>b</sup>	53,84 ± 2,46 <sup>a</sup>
Albumina (µmol/L)	583,20 ± 29,16 <sup>a</sup>	454,30 ± 7,70 <sup>b</sup>	468,60 ± 5,20 <sup>b</sup>	494,20 ± 15,51 <sup>b</sup>
Ureia (mmol/L)	7,33 ± 0,30 <sup>b</sup>	15,31 ± 0,60 <sup>a</sup>	10,11 ± 0,57 <sup>b</sup>	14,76 ± 1,29 <sup>a</sup>
Creatinina (µmol/L)	84,14 ± 3,51	114,50 ± 21,40	70,28 ± 6,39	94,16 ± 7,00

**Tabela 3. Efeito da formulação QV nas funções hepática e renal.** Função hepática (ALT, AST e albumina). Função renal (ureia e creatinina). C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.10 – Atividade de Metaloproteinase pancreática e renal

A representação qualitativa dos resultados pode ser vista pela análise das bandas da MMP-2 pancreática (**Figura 20a**) e renal (**Figura 20b**). Em relação aos dados quantitativos, a avaliação da capacidade de remodelamento da matriz extracelular promovida pelas MMP-2 do pâncreas (**Figura 20c**) revelou que nos animais diabéticos sem tratamento a atividade desta metaloproteinase foi significativamente aumentada em relação aos animais controle. Já os tratamentos farmacológicos com a formulação QV ou com a insulina reduziram significativamente a atividade de MMP-2 em relação ao grupo diabético e foram estatisticamente iguais aos animais do grupo controle. Quanto a avaliação da atividade da MMP-2 renal, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. (**Figura 20d**).

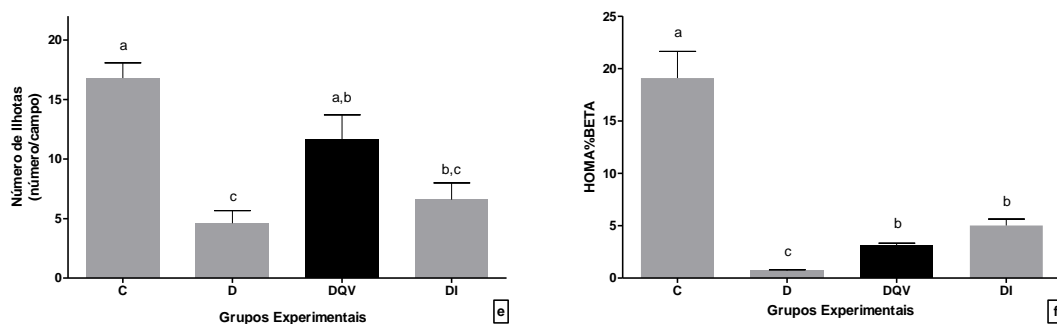
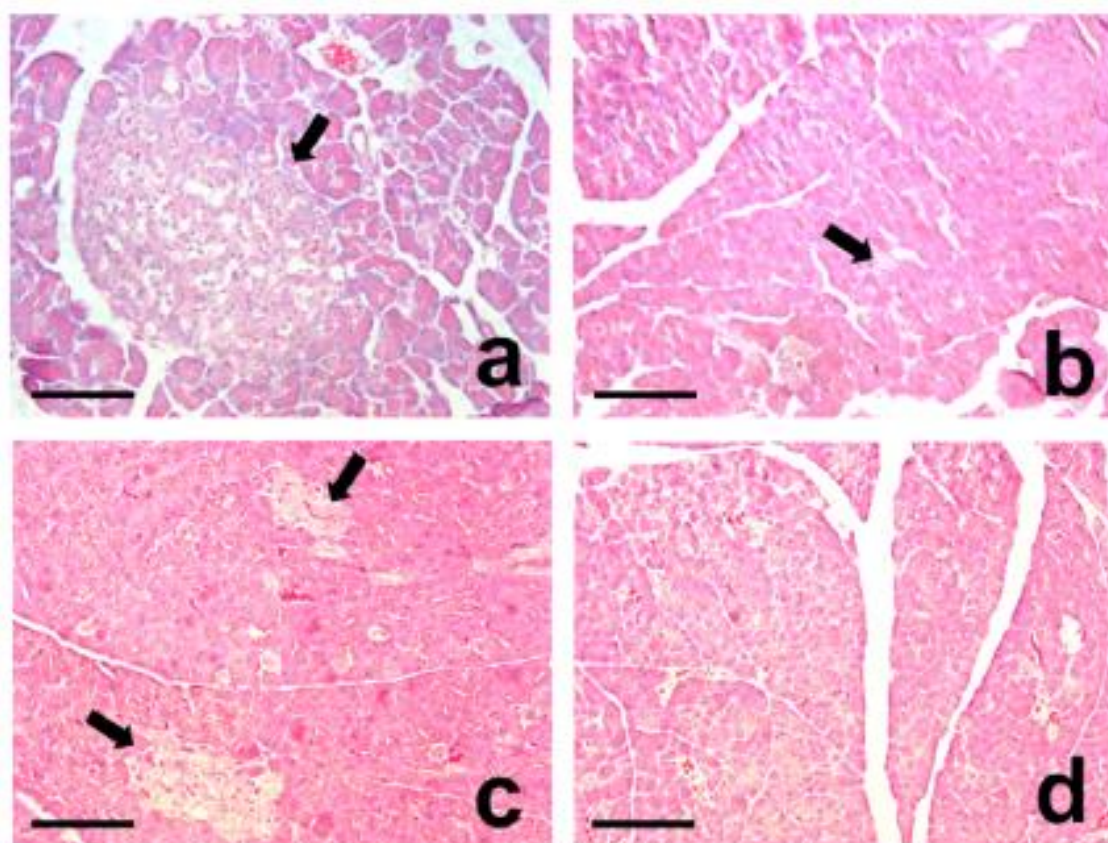




**Figura 20. Formulação QV reduz atividade enzimática de MMP-2 no pâncreas.** (a,b) Imagem representativa das bandas de MMP-2, pancreática e renal, respectivamente, no gel da zimografia. (c) Atividade de MMP-2 pancreática. (d) Atividade de MMP-2 renal. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.11 – Número de ilhotas pancreáticas e índice HOMA%BETA

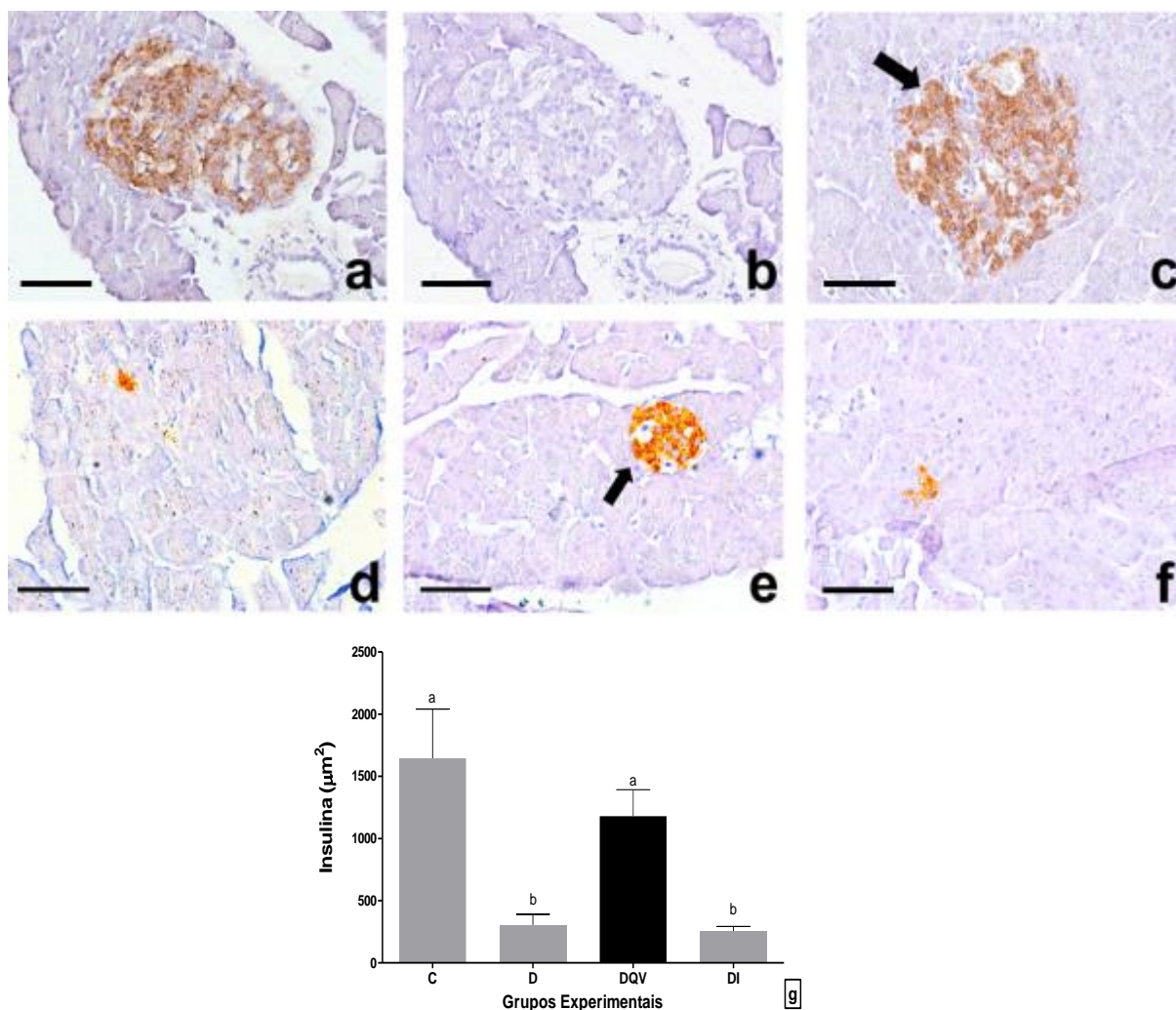
A representação histológica qualitativa dos resultados pode ser vista pela análise das fotomicrografias de pâncreas coradas com H&E, indicando a presença de ilhotas pancreáticas (**Figura 21a – d**). Histologicamente, a avaliação em microscopia óptica não revelou alterações significativas na estrutura tecidual pancreática. Não foram encontrados sinais inflamatórios, áreas degenerativas ou de fibrose em nenhum dos animais dos grupos experimentais, tanto nos componentes acinares quanto nas ilhotas pancreáticas. Já a representação quantitativa dos resultados pode ser visualizada pelo número de ilhotas pancreáticas (**Figura 21e**). O gráfico mostra que os animais do grupo diabético apresentaram uma redução significativa no número de ilhotas pancreáticas quando comparado aos animais do grupo controle, ao passo que a administração da formulação QV promoveu aumento no número destas ilhotas. A funcionalidade das células beta também foi avaliada através do cálculo do índice HOMA%BETA, que fornece uma medida indireta da capacidade funcional destas células em secretar insulina (**Figura 21**). Os resultados indicam que o índice HOMA%BETA dos animais do grupo diabético foi menor quando comparado ao respectivo grupo controle. Os tratamentos, seja com a formulação QV ou com a insulina, foram capazes de estimular as células beta a secretarem uma maior quantidade do hormônio insulina.



**Figura 21. Formulação QV aumenta o número de ilhotas pancreáticas e a funcionalidade das células beta.** (a-d) Seções histológicas de pâncreas de animais experimentais corados por H&E em aumento de 440x. (a-d) Grupos experimentais com arquitetura normal das ilhotas pancreáticas. Setas indicando as ilhotas pancreáticas. Barra de escala: 50 $\mu$ m. (e) Número de ilhotas pancreáticas. (f) Funcionalidade da célula beta, mensurado pelo índice HOMA%BETA. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

### 5.2.12 – Quantificação de insulina no tecido pancreático

Seções histológicas de ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais revelaram imunomarcção positiva com anticorpo anti-insulina (**Figura 22a – f**). A quantificação imunohistoquímica de ilhotas pancreáticas indicou que nos animais do grupo diabético o conteúdo de insulina foi consideravelmente menor quando comparado ao respectivo grupo controle. Além disso, a formulação QV foi o único tratamento responsável por aumentar a produção de insulina pelas células beta pancreáticas (**Figura 22g**).



**Figura 22. Formulação QV aumenta a biossíntese de insulina nas ilhotas pancreáticas.** (a–f) Seções histológicas de pâncreas de animais experimentais corados por imunohistoquímica, com anticorpo anti-insulina (diluído 1:5000), em aumento de 440x. (a) Controle positivo (representado por uma ilhota pancreática imunomarcada com anticorpo anti-insulina). (b) Controle negativo (representado pela mesma ilhota pancreática anterior, porém sem marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-insulina). (c) Grupo controle mostrando imunomarcção normal para insulina. (d) Grupo de animais diabéticos mostrando pouca imunomarcção de insulina. (e) Grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV mostrando imunomarcção para insulina. (f) Grupo de animais diabéticos tratados com insulina mostrando pouca imunomarcção para insulina. Setas indicam as ilhotas pancreáticas imunomarcadas. Barra de escala: 50 $\mu\text{m}$ . (g) Concentração de insulina na ilhota pancreática. C, grupo de animais controle; D, grupo de animais diabéticos; DQV, grupo de animais diabéticos tratados com formulação QV; DI, grupo de animais diabéticos tratados com insulina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

## CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO

A existência de um número relativamente baixo de alternativas terapêuticas medicamentosas e com efeitos comprovados para o tratamento do diabetes tipo 1 torna o insulina a única opção para pacientes acometidos por esta doença. O domínio do mercado insulínico por uma pequena gama de empresas multinacionais afeta diretamente o preço final do produto, aliado à extrema discrepância da disponibilidade de determinados medicamentos e produtos para o diabetes entre países de alta renda e os chamados países subdesenvolvidos (IDF, 2017). Baseado nisso, o desenvolvimento de uma Formulação oral contendo um Inibidor da DPP-4 associado à Quercetina que permita a liberação concomitante de ambos os ativos para serem alcançados efeitos antidiabéticos parece promissora. Apesar de controversos e não totalmente conclusivos, existem indícios experimentais da eficácia dos Inibidores da DPP-4 no tratamento do diabetes tipo 1 (ÁVILA *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2015). Um dos aspectos importantes do desenvolvimento de uma formulação contendo concomitantemente Quercetina e Vildagliptina é a manutenção de concentrações adequadas destes fármacos no sítio de absorção no momento em que ocorre a liberação dos mesmos da formulação. No entanto, em relação ao flavonoide Quercetina, a baixa solubilidade em sistema aquoso interfere diretamente na sua biodisponibilidade (GUGLER *et al.*, 1975; FEARN e HIRST, 2006), fator este que a inviabiliza de ser administrada por via oral. Neste contexto, o seu encapsulamento em estruturas poliméricas correspondem a uma interessante estratégia e tem sido estudada como formadores de géis de liberação controlada (RICCI *et al.*, 2005). Quando submetido à baixas temperaturas (0-18°C), as cadeias individuais do polímero 407, quando em concentrações superiores a 20%, se agregam em solução formando micelas esféricas consistidas de um centro hidrofóbico circundado por camadas hidrofílicas. Em temperatura na faixa de 18-40°C, as micelas se enovelam formando um gel homogêneo. Estes géis apresentam uma estrutura muito peculiar, a qual favorece a solubilização de fármacos e aditivos de baixa solubilidade em água (DUMORTIER *et al.*, 2006; NIU *et al.*, 2009). Além disso, foi comprovado também que o encapsulamento da Quercetina corresponde a uma metodologia capaz de aumentar a sua atividade biológica. (POOL *et al.*, 2012). A partir do exposto, uma vez que a formulação QV foi desenvolvida, essa nova alternativa terapêutica foi administrada, via orogástrica, para os grupos experimentais do estudo. Uma das metas desejadas com o desenvolvimento da formulação foi proporcionar um melhor controle da homeostase metabólica no modelo

de diabetes tipo 1, já que a homeostase dos níveis glicêmicos é um dos parâmetros que apresenta resultados contraditórios na literatura.

As flutuações glicêmicas são um dos principais fatores de risco para pacientes com diabetes tipo 1. Nos últimos anos, a relação entre diabetes e o uso de medicamentos Inibidores da DPP-4 tem sido o foco de muitos estudos, uma vez que vários dos danos ocasionados pelo diabetes têm sido melhorados pelo uso desta classe medicamentosa (HAMAMOTO *et al.*, 2013). Assim como observado nesta pesquisa, outros resultados da literatura já haviam reportado sobre a capacidade dos Inibidores da DPP-4 em reduzir a variação da glicemia em modelo experimental de diabetes (AWATA *et al.*, 2017). Aliado a isso, o uso crescente de produtos naturais e medicamentos fitoterápicos com finalidade curativa/paliativa indicam também o uso da Quercetina como possível agente antidiabético. O consumo em longo prazo de Quercetina parece controlar os níveis de glicose sanguínea jejum e pós-prandial (KIM *et al.*, 2011), além de ser sugerido que ela também protege o pâncreas contra o estresse oxidativo, melhorando a hiperglicemia, ambos em modelo animal diabético induzido com STZ (COSKUN *et al.*, 2005; ADEWOLE *et al.*, 2006). Contudo, seja utilizando os Inibidores da DPP-4, seja utilizando a Quercetina, triagens clínicas e estudos experimentais em diabetes tipo 1 indicam que a administração isolada de cada um destes agentes não apresenta resultados consistentes em alterar os parâmetros glicêmicos (ÁVILA *et al.*, 2013; GEORGE e MCCRIMMON, 2016), gerando resultados conflitantes e não conclusivos. O desenvolvimento da formulação QV foi primeiramente baseado no possível efeito antidiabético da Vildagliptina (Inibidor da DPP-4) e da Quercetina, e este permitiu inferir que a associação de ambos os ativos no formato de uma formulação oral foi capaz não apenas de melhorar a condição hiperglicêmica, mas de promover uma redução de aproximadamente 70% da glicemia em relação aos 55% observados pelo tratamento com insulina. Como consequência, essa melhora na homeostase da glicose permitiu uma maior taxa de sobrevivência no grupo de animais que receberam diariamente a formulação QV, em relação aos animais diabéticos não tratados ou tratados com dose diária de insulina, sugerindo que a formulação testada pode estar associada a um menor risco de hipoglicemia resultante das administrações de insulina (GOOßEN e GRÄBER, 2012).

A homeostase da glicose está diretamente relacionada ao balanço hormonal dos níveis de insulina e glucagon secretados pelas células pancreáticas. Enquanto os inibidores da DPP-4 regulam a glicemia por estimular a liberação de insulina pelas células beta pancreáticas de maneira glicose-dependente, a função da Quercetina no controle

glicêmico ocorre principalmente devido à sua atividade antioxidante (COSKUN *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2012). Os inibidores de DPP-4, por aumentarem a meia vida do hormônio incretina GLP-1, aumentam a síntese e secreção de insulina, bem como reduzem a secreção de glucagon pelas células alfa pancreáticas (MALMGREN, 2015). O tratamento de ratos diabéticos tipo 1 com Vildagliptina aumentou a secreção de insulina, no entanto este aumento não foi suficiente em proporcionar redução da glicose sanguínea (ÁVILA *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2015). Efeito insulínico semelhante também foi relatado pela Quercetina, seja pela melhora da sensibilidade à insulina (WANG *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2015), seja impedindo a elevação da glicemia em decorrência do aumento da concentração de insulina em ratos diabéticos induzidos por STZ (ADEWOLE *et al.*, 2006). Alguns achados também revelaram que a Vildagliptina reduziu os níveis de glucagon durante o estado hiperglicêmico e foi capaz de manter sua contra regulação durante hipoglicemia no diabetes tipo 1 (FARNGREN *et al.*, 2012; MALMGREN e AHREN, 2015), resultando na redução da glicose plasmática de jejum, pós-prandial e prevenindo crises hipoglicêmicas. Supressão similar na secreção de glucagon em resposta ao GLP-1 também foi observada em pacientes saudáveis, assim como em pacientes com diabetes tipo 1 e 2 (MEIER *et al.*, 2003). O glucagon além de antagonizar a ação da insulina também induz a gliconeogênese (STEVENSON *et al.*, 1987), e a regulação incorreta da secreção de glucagon em pacientes diabéticos tipo 1 contribui diretamente para o aumento da produção de glicose hepática e piora no controle da glicose pós-prandial, bem como a variabilidade da glicemia (SALEHI *et al.*, 2006). A principal função do hormônio glucagon é mobilizar a glicose dos tecidos periféricos para manter os níveis glicêmicos durante o jejum, enquanto que o GLP-1 atua principalmente durante o estado pós-absortivo para estimular a liberação de insulina. Um estudo recente sugere que a supressão do glucagon pode ser compensada pela possível redução na função da célula beta em liberar insulina, sendo então o mecanismo predominante pelo qual o controle glicêmico é melhorado após o tratamento com inibidor da DPP-4 (KOZLOVSKI *et al.*, 2017). Em nossos resultados, embora a melhora da glicemia tenha sido visualizada nos animais tratados com a formulação QV, o mecanismo foi diferente do proposto por KOZLOVSKI *et al.* Nossa formulação foi capaz de aumentar os níveis de insulina, mas a supressão do glucagon aparentemente não ocorreu. Os GLP-1Rs são escassos ou inexistentes em células alfa pancreáticas, o que torna improvável que o GLP-1 tenha ação direta em reduzir a secreção do glucagon nestas células (AHREN *et al.*, 2011). Baseado nestes achados, podemos inferir, até certo ponto, que a homeostase da glicose é regulada

principalmente pela insulina e em menor extensão pelo glucagon. Além disso, nossa hipótese é sustentada uma vez que a relação insulina/glucagon manteve-se positiva após os tratamentos, contribuindo para a manutenção da glicemia em níveis próximos à normalidade.

O metabolismo da glicose é influenciado por uma complexa via regulatória que envolve a atividade da enzima hexocinase IV, presente no fígado e pâncreas. Essa isoenzima é responsável pela fosforilação da molécula de glicose e seu aprisionamento no ambiente intracelular. Nas células beta pancreáticas, a hexocinase atua como um sensor de glicose que ativa a secreção de insulina. Nos hepatócitos, a atividade da hexocinase é dependente da relação insulina/glucagon para remover o excesso de glicose da corrente sanguínea e direcioná-la para a via glicolítica ou glicogênica, através da oxidação da glicose ou da estimulação da síntese de glicogênio glicose-dependente (HERS, 1976; AUKRUST *et al.*, 2013). Na ausência de insulina endógena, como ocorre em indivíduos com diabetes tipo 1, a atividade da hexocinase está reduzida, ao mesmo tempo em que a glicogenólise e gliconeogênese estão ativadas. Estes efeitos em conjunto conduzem a um estado de hiperglicemia crônica. O aloxano é uma substância usada como agente diabetogênico para induzir diabetes tipo 1 em experimentação animal e é capaz de inibir seletivamente a secreção de insulina induzida por glicose por inibição da hexocinase (LENZEN, 2008). Esta informação corrobora com nossos achados a respeito da inibição da atividade da hexocinase no grupo de animais diabéticos não tratados. Nossos resultados mostraram que, via preservação da atividade da enzima pancreática, a formulação QV ao aumentar a secreção de insulina, induziu a ativação da enzima hepática para armazenar o glicogênio nos hepatócitos dos animais diabéticos. Esse efeito provavelmente ocorreu devido a ação da Vildagliptina, presente na formulação, que ao inibir a enzima DPP-4, aumenta a meia vida do GLP-1 e possibilita a ligação ao seu receptor, desencadeando a ativação da hexocinase e a exocitose dos grânulos de insulina (PAPAETIS, 2014). Em relação aos receptores das incretinas, a administração da formulação QV também modulou os níveis teciduais de GLP-1R. Em 2011, Wooten *et al.* observaram que a Quercetina apresenta um papel importante na modulação e ativação do GLP-1R (WOOTTEN *et al.*, 2011). Além disso, os GLP-1Rs são expressos em vários tecidos além das ilhotas pancreáticas (RICHARDS *et al.*, 2014), como nos hepatócitos, mas estudos sugerem que certas ações do GLP-1 no metabolismo hepático da glicose ocorrem através de mecanismos que independem do seu receptor GLP-1R, mas nenhuma rota alternativa foi elucidada até o momento (TOMAS e HABENER, 2010). Sendo assim,

o aumento dos níveis pancreáticos de GLP-1R proporcionado pela Formulação QV pode indicar um possível aumento dos efeitos de GLP-1 neste tecido, ao passo que no fígado os níveis deste receptor não alteraram. Neste sentido, nossos resultados são suportados com base nos relatos anteriores de Tomas and Habener em 2010, a ponto de sugerirmos que a sequência de efeitos modulatórios na homeostase metabólica da glicose exibida pela ligação de GLP-1 ao seu receptor são possivelmente influenciados, em maior extensão, pela interação do GLP-1 com seu receptor pancreático e menos dependente da interação com o seu receptor hepático. Ainda sobre a cascata de sinalização, o tratamento à base de incretinas e quercetina é capaz de aumentar a regulação do transportador de glicose 2 (GLUT2) (WANG *et al.*, 1999; LENZEN, 2008).

A formulação QV também apresentou efeito positivo quando analisado o perfil lipídico dos grupos experimentais. A fração HDL do colesterol aumentou ao mesmo tempo em que as frações não-HDL do colesterol reduziram, o que tem significância particular uma vez que metabolismo lipídico está diretamente relacionado à dislipidemias, bem como complicações micro e macrovasculares que são típicas do quadro diabético (SOEDAMAH-MUTHU *et al.*, 2006). Um dado interessante observado em nossa pesquisa referiu-se ao efeito benéfico da formulação QV em reduzir as frações aterogênicas do colesterol (redução da fração não-HDL acompanhada por aumento da fração HDL), enquanto que a administração diária de insulina foi responsável por aumentar os níveis de triacilgliceróis. Embora não tenhamos observado melhora nos níveis de triacilgliceróis, alguns autores já haviam reportado que o aumento da concentração plasmática de hormônios incretinas reduz a absorção intestinal de triacilgliceróis em estudos animais (QIN *et al.*, 2005). Tem sido mostrado que a Vildagliptina diminui os níveis pós-prandiais de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis no diabetes tipo 2, sugerindo que os inibidores da DPP-4 mobilizam e queimam a gordura durante as refeições, impedindo assim o seu acúmulo que está associado ao risco cardiovascular (MATIKAINEN *et al.*, 2006). Em pesquisa anterior realizada por nosso grupo foi demonstrado que o tratamento com Vildagliptina durante 30 dias melhorou o perfil lipídico em modelo crônico de diabetes tipo 1. A Vildagliptina, administrada isoladamente, reduziu os níveis de colesterol total, sendo que esta redução foi devido a diminuição na concentração das frações aterogênicas, além da queda nos níveis sanguíneos de triacilgliceróis (MIRANDA *et al.*, 2015). Quando comparado ao estudo atual, a formulação QV não promoveu alterações significativas nas partículas de triacilglicerol, e uma provável justificativa que podemos utilizar refere-se ao modelo de



diabetes utilizado, sendo que em 2015, *Miranda et al* trabalharam com modelo crônico de diabetes tipo 1, e o estudo atual utilizou modelo agudo de diabetes tipo 1. *Nath et al.* também mostraram que a Vildagliptina foi capaz de melhorar o perfil lipídico em camundongos diabéticos (*NATH et al., 2017*). Em contraste, em ratos diabéticos tipo 1, *Maeda et al.* não observaram efeitos benéficos da Vilgaglitpina nos níveis de colesterol total, frações e triacilgliceróis (*MAEDA et al., 2012*). O efeito da Quercetina também foi reportado na prevenção e tratamento de doenças crônicas não infecciosas, como o diabetes, obesidade e hiperlipidemias, principalmente por seu efeito antioxidante. Além de ser capaz de regular o metabolismo lipídico, resultado da regulação do catabolismo e/ou do anabolismo (*YAN et al., 2015*), a Quercetina suprimiu a formação de placa aterosclerótica em modelo animal com aterosclerose (*KAWABATA et al., 2015*), apresentou atividade em diminuir a síntese de triglicérides e melhorar a dislipidemia em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (*KOBORI et al., 2011*). Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, a Quercetina também atenuou o quadro de hiperglicéridemia (*GOMES et al., 2014*) e demonstrou atividade hipolipemiante (*VESSAL et al., 2003; TORRES-PIEDRA et al., 2010*). Em relação ao colesterol e suas frações, *Jeong et al* em 2012 relataram que a Quercetina foi eficaz em melhorar o colesterol plasmático e aumentar o HDL-C (*JEONG et al., 2012*). Assim, suportados por dados da literatura, nossos resultados mostram que 30 dias de tratamento com a formulação QV foram eficazes em melhorar o perfil de lipídeos dos animais diabéticos.

O diabetes é responsável por causar danos a vários órgãos, incluindo o fígado e rim. Avaliação de parâmetros da função hepática revelou que o tratamento com a formulação QV não reduziu os níveis séricos das enzimas ALT e AST. Foi observado ao final do experimento que o tratamento com insulina aumentou os níveis de AST, e uma vez que esta enzima é encontrada em vários compartimentos do organismo como coração, músculo, rins e cérebro, e sua liberação na corrente sanguínea pode ser indício de algum tipo de dano tecidual, foi sugerida presença de uma provável lesão extra-hepática causada pela insulina. Diferentemente da AST, a enzima ALT é encontrada amplamente no fígado, sendo liberada na circulação como resultado de injúria hepática (*ELSNER et al., 2002*). O aumento nos níveis de ALT e AST em animais diabéticos pode ter sido induzido pelo aloxano, uma vez que a sua similaridade estrutural com a molécula de glicose permite que este seja absorvido pelas células que expressam o GLUT2, ocasionando possíveis danos teciduais (*THORENS et al., 1988*). Sendo assim, o metabolismo hepático do aloxano pode ter sido responsável pelo aumento destas transaminases. O tratamento com

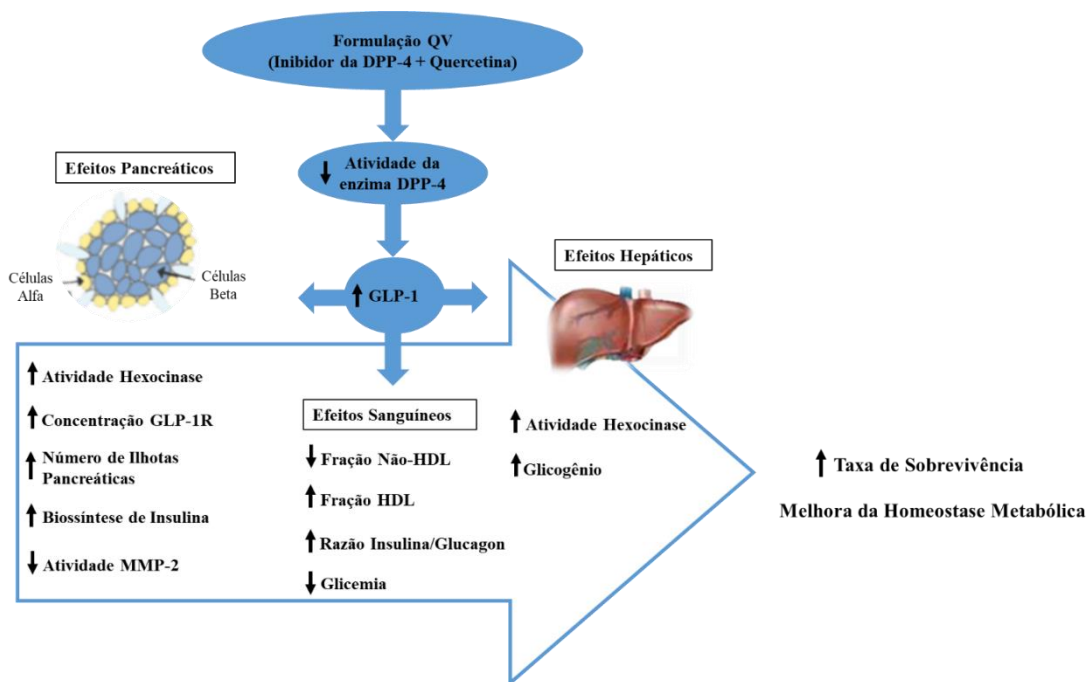
a formulação QV também não alterou os níveis séricos de albumina, uma proteína produzida no fígado. O diabetes é responsável por reduzir os níveis sanguíneos de albumina, que também é um indicativo de falência hepática. Pesquisadores relataram que o tratamento com Vildagliptina em adição à terapia insulínica não alterou o nível de enzimas hepáticas em modelo de diabetes tipo 2 descontrolado (LI *et al.*, 2017), enquanto que em modelo de fibrose hepática a administração de Quercetina resultou na manutenção dos níveis de ALT/AST e aumentou a concentração de albumina, permitindo os autores a sugerir um possível efeito hepatoprotetor deste flavonoide (LEE *et al.*, 2013). Uma das características do diabetes refere-se ao desequilíbrio no sistema redox, podendo afetar diferentes órgãos, como os rins, ocasionando o quadro de nefropatia diabética. Além disso, a toxicidade do aloxano também pode afetar os rins devido a presença do transportador GLUT2 nas células tubulares (THORENS *et al.*, 1988). Baseado nisso, em relação a função renal, os níveis de ureia foram avaliados e estes apresentaram-se aumentados nos grupos de animais diabéticos. Este resultado pode ser justificado pelas próprias características do quadro de diabetes, onde existe um aumento do catabolismo proteico e maior excreção deste metabólito (RAVI *et al.*, 2004). O tratamento com a formulação QV, ao contrário do tratamento com insulina, promoveu melhora neste parâmetro para valores semelhantes aos do grupo controle, caracterizando um possível efeito renoprotetor. Alguns estudos indicam possíveis efeitos benéficos dos inibidores da DPP-4 em complicações renais causadas pelo diabetes, além de proteger contra danos tubulares (REICHETZEDER *et al.*, 2017) e desacelerar a progressão de doença renal crônica. Tem sido sugerido que os efeitos renoprotetores dos inibidores da DPP-4 estão relacionados ao aumento dos níveis circulantes de GLP-1 (HASAN e HOCHER, 2017). Embora em nosso estudo não tenhamos encontrado diferenças nos níveis de creatinina, em 2004, pesquisa experimental revelou que o tratamento com Quercetina promoveu vários benefícios em camundongos com nefropatia diabética. Os achados laboratoriais resumiram-se em uma redução significativa dos níveis de creatinina plasmática, assim como restabeleceu o *clearance* de creatinina para um nível normal, além de reduzir a hiperplasia glomerular e o quadro de estresse oxidativo (GOMES *et al.*, 2014). Uma gama de efeitos biológicos benéficos como anti-inflamatório, anti-apoptótico, hepato, reno, neuro e cardioprotetores permitiu classificar a Quercetina como um provável alvo terapêutico para o tratamento de complicações não apenas renais, mas de diferentes tipos de condições patológicas (CAI *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2016).

Uma vez que o aparecimento e progressão do diabetes está intimamente associado ao estresse oxidativo (ROSEN *et al.*, 2001; JOHANSEN *et al.*, 2005) e aos eventos hiperglicêmicos, estudo recente demonstrou ainda que a hiperglicemia é responsável pelo aumento de metaloproteinasas (ZHENG *et al.*, 2015). As metaloproteinasas (MMPs) são enzimas especializadas no remodelamento da matriz extracelular. Os níveis plasmáticos de MMPs em indivíduos com diabetes tipo 1 são relativamente altos quando comparados com indivíduos sadios (GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009), e qualquer alteração no mecanismo regulatório dessas enzimas pode contribuir para complicações no quadro de diabetes, como exemplificado por Liu *et al.* No referido estudo foi descrito que a expressão de MMP-2 e sua atividade intracelular apresentaram-se aumentadas devido ao estresse oxidativo, e esta condição contribuiu para a disfunção celular e apoptose de células INS-1 secretoras de insulina (LIU *et al.*, 2014). Análise de nossos resultados nos permitiu verificar que ambos os tratamentos farmacológicos, seja com a formulação QV ou com a insulina, reduziram a atividade da metaloproteinase 2 (MMP-2), sendo que essas apresentavam-se aumentadas no grupo de animais diabéticos não tratados. Uma vez que o estado hiperglicêmico, característico do diabetes tipo 1, é responsável pelo aumento de MMP-2 (ZHENG *et al.*, 2015), a melhora no parâmetro glicêmico após os tratamentos pode justificar a redução na atividade desta enzima. De acordo com Peeters *et al.* em estudo recente, os níveis de MMP-2 contribuem para complicações vasculares no diabetes tipo 1. O grupo de pesquisa associou o aumento nos níveis plasmáticos de MMP-2 com o aumento na incidência de eventos cardiovasculares, além de nefropatia diabética, em pacientes acometidos pelo diabetes tipo 1 (PEETERS *et al.*, 2017). MMP-2 também é responsável pela clivagem proteolítica da enzima DPP-4, o que resulta no desprendimento da DPP-4 da membrana e liberação do seu sítio de produção para que ela possa inativar os hormônios incretinas (RÖHRBORN *et al.*, 2015). A baixa atividade MMP-2 relatada neste estudo pode estar diretamente relacionada à ação reduzida da enzima DPP-4 sobre o GLP-1, ocasionando no aumento de sua concentração. Em adição, os efeitos antioxidantes da Quercetina já relatados anteriormente tem relação direta com doenças mediadas pelo estresse oxidativo (LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006), ou seja, tal atividade também pode estar associada com a modulação das enzimas metaloproteinasas. Baseado nisso, nós hipotetizamos que a enzima DPP-4 sofreu ação direta da Vildagliptina, via sua inibição, e indiretamente da Quercetina, por efeitos antioxidantes. Além disso, a menor atividade MMP-2 sobre a DPP-4 provavelmente amplificou a

preservação e aumentou a biodisponibilidade do GLP-1, resultando na amplificação dos efeitos benéficos desta incretina.

A gênese do diabetes tipo 1 refere-se a destruição parcial ou total das células beta das ilhotas pancreáticas, e neste sentido objetivamos avaliar a capacidade da formulação QV em aumentar a massa de células pancreáticas em animais diabéticos. Avaliação da histologia pancreática revelou que a formulação QV foi capaz de aumentar não apenas o número de ilhotas pancreáticas, mas aumentou também o conteúdo de insulina presente no interior das células beta, assim como a habilidade funcional destas células em secretar este hormônio, como demonstrado pelo índice HOMA%BETA. Estes resultados nos permitiu inferir que a formulação exerceu um efeito protetor no tecido pancreático mesmo após a indução com o aloxano. O dano progressivo na função das células beta é a base primária das manifestações diabéticas (PRENTKI e NOLAN, 2006). Vários autores já relataram influência positiva dos inibidores da DPP-4 e das incretinas no tecido pancreático em modelo de diabetes tipo 2, seja através da proliferação/manutenção da função das células beta e inibição da apoptose (HAMAMOTO *et al.*, 2013; YABE e SEINO, 2013), ou ainda de promover a neogênese de células beta (CHO *et al.*, 2011; ANSARULLAH *et al.*, 2013). Uma vez que as ilhotas expressam a enzima DPP-4 e podem produzir o hormônio GLP-1, então é possível que a melhora na função das ilhotas também tenha sido em resposta a inibição da DPP-4 local e preservação do GLP-1 pancreático (AHREN e FOLEY, 2016). Esta classe de drogas melhoram a disfunção da ilhota pancreática, no entanto são restritos os estudos que verificaram esses efeitos em modelo animal de diabetes tipo 1, seja na presença ou ausência detectável da função das células beta (GEORGE e MCCRIMMON, 2013). Foi esta limitação de estudos que impulsionou Miranda *et al.*, em 2015, a estudarem os possíveis efeitos dos inibidores da DPP-4 no modelo crônico de diabetes tipo 1. Ao final da pesquisa foi verificado que, dentre os demais efeitos benéficos em outros parâmetros, encontrou-se efeito neogênico das células beta pancreáticas (MIRANDA *et al.*, 2015). Além da classe de inibidores da DPP-4, foi sugerido também, que os flavonoides, em exemplo a Quercetina, tem participação na proteção de células beta pancreáticas e sobrevivência celular, principalmente por sua atividade antioxidante. Algumas pesquisas relataram que a Quercetina foi capaz de minimizar a apoptose, além de aumentar a viabilidade de células beta, mesmo na presença de dano oxidativo, seja gerado pelo peróxido de hidrogênio, seja mediado por citocinas (YOUL *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2012). Efeito protetor deste flavonoide também foi demonstrado em modelo experimental *in vivo* de diabetes tipo 1.

As pesquisas observaram melhora na arquitetura pancreática (VESSAL *et al.*, 2003; COSKUN *et al.*, 2005; KOBORI *et al.*, 2009), além de proteção e preservação da integridade das células beta em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ADEWOLE *et al.*, 2006). A ínfima relação envolvendo danos oxidativos mediados pela hiperglicemia no diabetes tipo 1 sugere que agentes capazes de melhorar o índice glicêmico e/ou estresse oxidativo podem ter efeitos positivos no tratamento ou controle do diabetes. Este é o primeiro estudo a demonstrar os efeitos de uma formulação contendo um inibidor da DPP-4 (Vildagliptina) juntamente com um flavonoide (Quercetina), ambos com propriedades antidiabéticas, em promover a melhora da homeostase metabólica e aumento da sobrevivência em modelo experimental de diabetes tipo 1, conforme ilustrado na **Figura 23**.



**Figura 23. Proposta de mecanismo de ação da Formulação QV em modelo de diabetes tipo 1.** A Formulação QV reduz a atividade da enzima DPP-4 e promove maior biodisponibilidade do GLP-1, que é capaz de promover efeitos benéficos em parâmetros sanguíneos e nos tecidos pancreático e hepático. Em conjunto, esses efeitos foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência e melhorar a homeostase metabólica em modelo de diabetes tipo 1. (↑) Aumentou, (↓) Diminuiu.

## **CAPÍTULO 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Pesquisas futuras envolvendo novas drogas para o tratamento do diabetes tipo 1 e o desenvolvimento de uma formulação associando dois agentes capazes de promover uma melhora na homeostase metabólica pode ser uma terapêutica promissora para estudos futuros que visem reduzir a dependência de pacientes diabéticos tipo 1 à insulina exógena. Um produto administrado por via oral e usado uma vez ao dia pode tornar o tratamento mais aceitável, atrativo e proporcionar maior comodidade aos pacientes, se compararmos com o atual regime de injeções de insulina. Administração de aproximadamente 3 doses por dia de insulina, acompanhado por questões de aderência ao tratamento injetável, além de possíveis problemas de acerto de dose, faz-se da terapia oral uma estratégia menos invasiva e com menor risco de crises hipoglicêmicas. Em adição, os presentes achados sugerem que os benefícios potenciais da formulação QV em relação à glicemia e à melhora de parâmetros lipídicos e histológicos estão diretamente relacionados à homeostase metabólica.

## **CAPÍTULO 8 – CONCLUSÃO**

Os resultados desta pesquisa, analisados em conjunto, sugerem que a formulação contendo Vildagliptina e Quercetina é responsável por melhorar a resposta glicêmica e a homeostase metabólica em ratos diabéticos tipo 1.

## **CAPÍTULO 9 – LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Uma provável limitação da pesquisa atual pode referir-se à ausência de dois grupos experimentais: o grupo de animais diabéticos que receberia apenas o ativo Quercetina, assim como o grupo de animais diabéticos que receberia apenas o ativo Vildagliptina. Podemos justificar a ausência de tais grupos mediante a restrição e ao uso racional de animais nos experimentos, baseado nos 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement), que objetiva diminuir o número de animais, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo*. Além disso, tivemos indícios através de dados da literatura e dos resultados apresentados na dissertação de mestrado que isoladamente os dois ativos não trariam efeitos tão promissores quando comparados a tais efeitos mediante sua associação

## CAPÍTULO 10 – REFERÊNCIAS

ADA. American Diabetes Association: Clinical practice recommendations: pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 4, p. 935, 2006.

\_\_\_\_\_. American Diabetes Association: 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. Suppl 1, p. S13-S27, Jan 2018.

ADEWOLE, S. O.; CAXTON-MARTINS, E. A.; OJEWOLE, J. A. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 4, n. 1, p. 64-74, Aug 28 2006. ISSN 2505-0044 (Electronic) 2505-0044 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162074> >.

AHREN, B.; FOLEY, J. E. Improved glucose regulation in type 2 diabetic patients with DPP-4 inhibitors: focus on alpha and beta cell function and lipid metabolism. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 907-17, May 2016. ISSN 1432-0428. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26894277>  
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00125-016-3899-2.pdf> >.

AHREN, B. et al. Improved meal-related insulin processing contributes to the enhancement of B-cell function by the DPP-4 inhibitor vildagliptin in patients with type 2 diabetes. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 11, p. 826-9, Nov 2007. ISSN 0018-5043 (Print) 0018-5043 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992639> >.

AHREN, B. et al. Mechanisms of action of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in humans. **Diabetes Obes Metab**, v. 13, n. 9, p. 775-83, Sep 2011. ISSN 1463-1326 (Electronic) 1462-8902 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507182> >.

AHUJA, N.; KATARE, O. P.; SINGH, B. Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 65, n. 1, p. 26-38, Jan 2007. ISSN 0939-6411 (Print) 0939-6411 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962750> >.

ANDUKURI, R.; DRINCIC, A.; RENDELL, M. Alogliptin: a new addition to the class of DPP-4 inhibitors. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 2, p. 117-26, Jul 2009. ISSN 1178-7007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21437125>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048010/pdf/dmso-2-117.pdf> >.

ANSARULLAH et al. Stimulating beta-cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-4 inhibitor. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53345, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382843> >.

AQUINO, R. et al. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 2, p. 183-91, Feb 2002. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801380> >.

AROOR, A. R. et al. Pleiotropic effects of the dipeptidylpeptidase-4 inhibitors on the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 307, n. 4, p. H477-92, Aug 15 2014. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929856> >.

AUKRUST, I. et al. SUMOylation of pancreatic glucokinase regulates its cellular stability and activity. **J Biol Chem**, v. 288, n. 8, p. 5951-62, Feb 2013. ISSN 1083-351X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297408> >.

ÁVILA, D. E. L. et al. Vildagliptin ameliorates oxidative stress and pancreatic beta cell destruction in type 1 diabetic rats. **Arch Med Res**, v. 44, n. 3, p. 194-202, Apr 2013. ISSN 1873-5487. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523961> >.

AWATA, T. et al. Possible Long-Term Efficacy of Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, for Slowly Progressive Type 1 Diabetes (SPIDDM) in the Stage of Non-Insulin-Dependency: An Open-Label Randomized Controlled Pilot Trial (SPAN-S). **Diabetes Ther**, v. 8, n. 5, p. 1123-1134, Oct 2017. ISSN 1869-6953. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28929327> >.

AYTA, C. A. M. **Clonagem e caracterização de genes regulados por glicose em ilhotas pancreáticas humanas**. 2002. 115 Tese de Doutorado Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP

AZUMA, K. et al. Measurements of islet function and glucose metabolism with the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin in patients with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 2, p. 459-64, Feb 2008. ISSN 0021-972X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042650> >.

BAEKESKOV, S. et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, v. 347, n. 6289, p. 151-6, Sep 13 1990. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697648> >.

BANERJEE, M.; YOUNIS, N.; SORAN, H. Vildagliptin in clinical practice: a review of literature. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 16, p. 2745-57, Nov 2009. ISSN 1744-7666 (Electronic) 1465-6566 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874253> >.

BERAN, D. et al. Improving global access to medicines for non-communicable diseases. **Lancet Glob Health**, v. 2, n. 10, p. e561-2, Oct 2014. ISSN 2214-109X (Electronic) 2214-109X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304626> >.

BERAN, D.; YUDKIN, J. S. Looking beyond the issue of access to insulin: what is needed for proper diabetes care in resource poor settings. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 88, n. 3, p. 217-21, Jun 2010. ISSN 1872-8227 (Electronic) 0168-8227 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20447710> >.

BLOOMGARDEN, Z. T. Developments in diabetes and insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1, p. 161-7, Jan 2006. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373919> >.



BUTLER, A. E. et al. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2304-14, Sep 2003. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941770> >.

CAHILL, J. 9 Things We Learned About Afrezza's Future. 2016. Available at: < <http://insulinnation.com/treatment/9-things-we-learned-about-afrezzas-future/> >. Acesso em 25 de Maio de 2016.

CAI, X. et al. Bioavailability of quercetin: problems and promises. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, p. 2572-2582, 2013.

CHEN, L. C. et al. Development and characterization of self-assembling lecithin-based mixed polymeric micelles containing quercetin in cancer treatment and an in vivo pharmacokinetic study. **Int J Nanomedicine**, v. 11, p. 1557-66, 2016. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143878> >.

CHO, J. M. et al. A novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor DA-1229 ameliorates streptozotocin-induced diabetes by increasing beta-cell replication and neogenesis. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 91, n. 1, p. 72-9, Jan 2011. ISSN 1872-8227 (Electronic) 0168-8227 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093089> >.

COSKUN, O. et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacol Res**, v. 51, n. 2, p. 117-23, Feb 2005. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629256> >.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro 2000.

DCCT et al. Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 977-86, Sep 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366922> >.

DEACON, C. F.; CARR, R. D.; HOLST, J. J. DPP-4 inhibitor therapy: new directions in the treatment of type 2 diabetes. **Front Biosci**, v. 13, p. 1780-94, Jan 2008. ISSN 1093-9946. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981667> >.

DEISS, D. et al. Improved glycemic control in poorly controlled patients with type 1 diabetes using real-time continuous glucose monitoring. **Diabetes Care**, v. 29, n. 12, p. 2730-2, Dec 2006. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130215> >.

DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH, G. et al. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. **Lancet**, v. 374, n. 9702, p. 1677-86, Nov 14 2009. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878986> >.

DOYLE, M. E.; EGAN, J. M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 3, p. 546-93, Mar 2007. ISSN 0163-7258. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306374> >.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696-705, Nov 2006. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098089> >.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm Res**, v. 23, n. 12, p. 2709-28, Dec 2006. ISSN 0724-8741 (Print) 0724-8741 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096184> >.

DUPRE, J. Glycaemic effects of incretins in Type 1 diabetes mellitus: a concise review, with emphasis on studies in humans. **Regul Pept**, v. 128, n. 2, p. 149-57, Jun 15 2005. ISSN 0167-0115 (Print) 0167-0115 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780434> >.

EL-OUAGHLIDI, A. et al. The dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin does not accentuate glibenclamide-induced hypoglycemia but reduces glucose-induced glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 11, p. 4165-71, Nov 2007. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698900> >.

ELIASCHEWITZ, F. G. **Perfil terapêutico dos inibidores da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-4). Novas perspectivas para o tratamento do diabetes tipo 2: incretinomiméticos e inibidores da DPP-4 – Posicionamentos Oficiais SBD.** *Revista Brasileira de Medicina*. São Paulo. 3: 11-15 p. 2007.

ELSNER, M. et al. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. **Diabetologia**, v. 45, n. 11, p. 1542-9, Nov 2002. ISSN 0012-186X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12436338> >.

EYZAGUIRRE, F.; CODNER, E. [Insulin analogues: searching for a physiological replacement]. **Rev Med Chil**, v. 134, n. 2, p. 239-50, Feb 2006. ISSN 0034-9887 (Print) 0034-9887 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554934> >.

FARILLA, L. et al. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 11, p. 4397-408, Nov 2002. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399437> >.

FARNGREN, J. et al. Vildagliptin reduces glucagon during hyperglycemia and sustains glucagon counterregulation during hypoglycemia in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 10, p. 3799-806, Oct 2012. ISSN 1945-7197. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855332> >.

FEARN, R. A.; HIRST, B. H. Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic in vitro cell models. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, n. 2, p. 168-78, Feb 2006. ISSN 1382-6689 (Print) 1382-6689 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783654> >.

FOWLER, M. J. Diabetes devices. **Clinical Diabetes**, v. 26, p. 130-133, 2008.

FRANDBSEN, C. S.; DEJGAARD, T. F.; MADSBAD, S. Non-insulin drugs to treat hyperglycaemia in type 1 diabetes mellitus. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 4, n. 9, p. 766-780, Sep 2016. ISSN 2213-8595. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26969516> >.

FRID, A. et al. New injection recommendations for patients with diabetes. **Diabetes Metab**, v. 36 Suppl 2, p. S3-18, Sep 2010. ISSN 1878-1780 (Electronic) 1262-3636 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933208> >.

GARG, S. et al. Improvement in glycemic excursions with a transcutaneous, real-time continuous glucose sensor: a randomized controlled trial. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1, p. 44-50, Jan 2006. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373894> >.

GAUCHER, G. et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **J Control Release**, v. 109, n. 1-3, p. 169-88, Dec 5 2005. ISSN 0168-3659 (Print) 0168-3659 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289422> >.

GAUTIER, J. F.; CHOUKEM, S. P.; GIRARD, J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. **Diabetes Metab**, v. 34 Suppl 2, p. S65-72, Feb 2008. ISSN 1262-3636 (Print) 1262-3636 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640588> >.

GEORGE, P.; MCCRIMMON, R. J. Potential role of non-insulin adjunct therapy in Type 1 diabetes. **Diabet Med**, v. 30, n. 2, p. 179-88, Feb 2013. ISSN 1464-5491 (Electronic) 0742-3071 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804102> >.

GEORGE, P. S.; MCCRIMMON, R. J. Saxagliptin co-therapy in C-peptide negative Type 1 diabetes does not improve counter-regulatory responses to hypoglycaemia. **Diabet Med**, v. 33, n. 9, p. 1283-90, Sep 2016. ISSN 1464-5491. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26642301> >.

GHARAGOZLIAN, S. et al. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. **BMC Clin Pathol**, v. 9, n. 7, 2009.

GIAMPIETRO, O. et al. Sitagliptin as add-on therapy in insulin deficiency: biomarkers of therapeutic efficacy respond differently in type 1 and type 2 diabetes. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 99-104, 2013. ISSN 1177-8881 (Electronic) 1177-8881 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439744> >.

GILMER, T. P. et al. Predictors of health care costs in adults with diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 59-64, Jan 2005. ISSN 0149-5992. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616234> >.

GOLDENBERG, P. **Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gêneros e igualdade entre os sexos.** Revista Brasileira de Epidemiologia. 6: 18-28 p. 2003.

GOMES, I. B. et al. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. **Lipids Health Dis**, v. 13, p. 184, Dec 2014. ISSN 1476-511X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481305> >.

GOOßEN, K.; GRÄBER, S. Longer term safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 12, p. 1061-72, Dec 2012. ISSN 1463-1326. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519906> >.

GORUS, F. K. et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. **Diabetologia**, v. 40, n. 1, p. 95-9, Jan 1997. ISSN 0012-186X (Print) 0012-186X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028724> >.

GREEN, B. D.; FLATT, P. R.; BAILEY, C. J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. **Diab Vasc Dis Res**, v. 3, n. 3, p. 159-65, Dec 2006. ISSN 1479-1641 (Print) 1479-1641 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160910> >.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H. J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 9, n. 2-3, p. 229-34, Dec 19 1975. ISSN 0031-6970 (Print) 0031-6970 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1233267> >.

GUO, H. et al. The efficacy and safety of DPP4 inhibitors in patients with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 121, p. 184-191, Nov 2016. ISSN 1872-8227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27741478> >.

HAMAMOTO, S. et al. Vildagliptin preserves the mass and function of pancreatic beta cells via the developmental regulation and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. **Diabetes Obes Metab**, v. 15, n. 2, p. 153-63, Feb 2013. ISSN 1463-1326 (Electronic) 1462-8902 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950702> >.

HANSEN, L. et al. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5356-63, Nov 1999. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537167> >.

HASAN, A. A.; HOCHER, B. Role of soluble and membrane-bound dipeptidyl peptidase-4 in diabetic nephropathy. **J Mol Endocrinol**, v. 59, n. 1, p. R1-R10, Jul 2017. ISSN 1479-6813. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420715> >.

HAZRA, M. et al. Designing polymeric microparticulate drug delivery system for hydrophobic drug quercetin. **Saudi Pharm J**, v. 23, n. 4, p. 429-36, Sep 2015. ISSN 1319-0164 (Print) 1319-0164 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27134546> >.

HEISE, T. et al. Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 6, p. 1614-20, Jun 2004. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161770> >.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacol Sin**, v. 27, n. 1, p. 27-40, Jan 2006. ISSN 1671-4083 (Print) 1671-4083 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364208> >.

HERMAN, G. A. et al. Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 11, p. 4612-9, Nov 2006. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912128> >.

HERS, H. G. The control of glycogen metabolism in the liver. **Annu Rev Biochem**, v. 45, p. 167-89, 1976. ISSN 0066-4154. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/183599> >.

HOPUSU-HAVU, V. K.; GLENNER, G. G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. **Histochemie**, v. 7, n. 3, p. 197-201, 1966. ISSN 0018-2222 (Print) 0018-2222 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5959122> >.

IDF. **International Diabetes Federation: Diabetes Atlas**. 7th. INTERNATIONAL FEDERATION OF DIABETES, 2015.

\_\_\_\_\_. International Diabetes Federation: "LIFE FOR A CHILD" PROGRAMME 2016. Available at: < <http://www.idf.org/lifeforachild/the-programme> >. Acesso em 20 de Maio de 2016.

\_\_\_\_\_. **International Diabetes Federation: Diabetes Atlas**. 8th. INTERNATIONAL FEDERATION OF DIABETES, 2017. Available at: < <http://www.diabetesatlas.org> >.

IDPIG. **International Drug Price Indicator Guide**. Management Sciences for Health World Health Organization, 2014. 393.

JACQUES, P. F. et al. Higher dietary flavonol intake is associated with lower incidence of type 2 diabetes. **J Nutr**, v. 143, n. 9, p. 1474-80, Sep 2013. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902957> >.

JANG, H. J. et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 38, p. 15069-74, Sep 2007. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724330> >.

JELSING, J. et al. The DPP4 inhibitor linagliptin delays the onset of diabetes and preserves beta-cell mass in non-obese diabetic mice. **J Endocrinol**, v. 214, n. 3, p. 381-7, Sep 2012. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761275> >.

JENNINGS, A. et al. Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. **J Nutr**, v. 144, n. 2, p. 202-8, Feb 2014. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336456> >.

JEONG, S. M. et al. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. **Nutr Res Pract**, v. 6, n. 3, p. 201-7, Jun 2012. ISSN 2005-6168. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22808343> >.

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabetol**, v. 4, p. 5, Apr 29 2005. ISSN 1475-2840 (Electronic) 1475-2840 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862133> >.

JONES, M.; LEROUX, J. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 48, n. 2, p. 101-11, Sep 1999. ISSN 0939-6411 (Print) 0939-6411 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469928> >.

KARVONEN, M. et al. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. **Diabetes Care**, v. 23, n. 10, p. 1516-26, Oct 2000. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023146> >.

KAWABATA, K.; MUKAI, R.; ISHISAKA, A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. **Food Funct**, v. 6, n. 5, p. 1399-417, May 2015. ISSN 2042-650X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25761771> >.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, n. 1, p. 131-42, Jan 2003. ISSN 0022-3573 (Print) 0022-3573 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625877> >.

KIM, J. H. et al. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. **Nutr Res Pract**, v. 5, n. 2, p. 107-11, Apr 2011. ISSN 2005-6168. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556223> >.

KIM, S. J. et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition with MK0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 641-51, Mar 2009. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073764> >.

KIM, W.; EGAN, J. M. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 4, p. 470-512, Dec 2008. ISSN 1521-0081 (Electronic) 0031-6997 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074620> >.

KLONOFF, D. C. Continuous glucose monitoring: roadmap for 21st century diabetes therapy. **Diabetes Care**, v. 28, n. 5, p. 1231-9, May 2005. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855600> >.

KNUDSEN, L. B. et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. **J Med Chem**, v. 43, n. 9, p. 1664-9, May 4 2000. ISSN 0022-2623 (Print) 0022-2623 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794683> >.

KOBORI, M. et al. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. . **Mol Nutr Food Res**, v. 55, p. 530 - 540, 2011.

KOBORI, M. et al. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 7, p. 859-68, Jul 2009. ISSN 1613-4133. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19496084> >.

KOZLOVSKI, P.; BHOSEKAR, V.; FOLEY, J. E. DPP-4 inhibitor treatment:  $\beta$ -cell response but not HbA1c reduction is dependent on the duration of diabetes. **Vasc Health Risk Manag**, v. 13, p. 123-126, 2017. ISSN 1178-2048. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408838> >.

KUMAR, K. V.; GUPTA, A. K. Clinical audit of patients using DPP4 inhibitors in longstanding type 2 diabetes. **Diabetes Metab Syndr**, v. 9, n. 4, p. 277-9, Oct-Dec 2015. ISSN 1878-0334 (Electronic) 1871-4021 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470636> >.

LARSEN, J. L. Pancreas transplantation: indications and consequences. **Endocr Rev**, v. 25, n. 6, p. 919-46, Dec 2004. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583023> >.

LEE, C. C. et al. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury. **Food Funct**, v. 4, n. 5, p. 794-802, Apr 2013. ISSN 2042-650X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584161> >.

LEE, G. H. et al. Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 143, p. 511-517, Jul 1 2016. ISSN 1873-4367 (Electronic) 0927-7765 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27038916> >.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-26, Feb 2008. ISSN 0012-186X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087688> >.

LI, F. F. et al. Effects of Vildagliptin Add-on Insulin Therapy on Nocturnal Glycemic Variations in Uncontrolled Type 2 Diabetes. **Diabetes Ther**, v. 8, n. 5, p. 1111-1122, Oct 2017. ISSN 1869-6953. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28921310> >.

LI, Y. et al. The DPP-4 inhibitor MK0626 and exercise protect islet function in early pre-diabetic kka mice. **Peptides**, v. 49, p. 91-9, Nov 2013. ISSN 1873-5169. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025600> >.

LIN, C. Y. et al. Flavonoids protect pancreatic beta-cells from cytokines mediated apoptosis through the activation of PI3-kinase pathway. **Cytokine**, v. 59, n. 1, p. 65-71, Jul 2012. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1043-4666 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579112> >.

LINDSTROM, J. et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1673-9, Nov 11 2006. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098085> >.

LIU, C. et al. Matrix metalloproteinase 2 contributes to pancreatic Beta cell injury induced by oxidative stress. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110227, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333278> >.

LOPEZ-REVUELTA, A. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chem Biol Interact**, v. 161, n. 1, p. 79-91, May 15 2006. ISSN 0009-2797 (Print) 0009-2797 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16620793> >.

LÓPEZ-REVUELTA, A. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chem Biol Interact**, v. 161, n. 1, p. 79-91, May 2006. ISSN 0009-2797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16620793> >.

LOTIFY, M. et al. Medicinal Chemistry and Applications of Incretins and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Open Med Chem J**, v. 5, n. Suppl 2, p. 82-92, 2011. ISSN 1874-1045 (Electronic). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21966329> >.

LOTIFY, M. et al. Medicinal Chemistry and Applications of Incretins and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Open Med Chem J**, v. 5, n. Suppl 2, p. 82-92, 2011. ISSN 1874-1045. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21966329> >.

LU, Y.; PARK, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. **Int J Pharm**, v. 453, n. 1, p. 198-214, Aug 30 2013. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22944304> >.

MAEDA, S.; MATSUI, T.; YAMAGISHI, S. Vildagliptin inhibits oxidative stress and vascular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int J Cardiol**, v. 158, n. 1, p. 171-3, Jun 2012. ISSN 1874-1754. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564388> >.

MAJERIK, V. et al. Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, n. 1, p. 101-110, 2007.

MALMGREN, S. Deciphering the Hypoglycemic Glucagon Response: Development of a Graded Hyperinsulinemic Hypoglycemic Clamp Technique in Female Mice. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3866-71, Oct 2015. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132921> >.

MALMGREN, S.; AHREN, B. DPP-4 inhibition contributes to the prevention of hypoglycaemia through a GIP-glucagon counterregulatory axis in mice. **Diabetologia**, v. 58, n. 5, p. 1091-9, May 2015. ISSN 1432-0428 (Electronic) 0012-186X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660260> >.



MATIKAINEN, N. et al. Vildagliptin therapy reduces postprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2049-57, Sep 2006. ISSN 0012-186X (Print) 0012-186X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816950> >.

MAZZANTI, C. M. et al. Extrato da casca de *Syzyium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. . **Cienc Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.

MEIER, J. J. et al. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 798-801, Jun 2003. ISSN 0012-186X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764578> >.

MINICUCCI, W. J. **Diabetes: uso de bomba de infusão contínua e sensores de glicose**. Rio de Janeiro: 2006.

MIRANDA, P. H. A. et al. Vildagliptin induces  $\beta$ -cell neogenesis and improves the lipid profile in a later phase of type 1 diabetes. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 16, n. 1, p. 60-5, 2015. ISSN 1873-4316. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395211> >.

MIRANDA, P. H. D. A. et al. **FORMULAÇÃO MICELAR TERMORREVERSÍVEL CONTENDO QUERCETINA E VILDAGLIPTINA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL EM DIABETES TIPO 1**. Universidade Federal de Ouro Preto. INDUSTRIAL, I. N. D. P. Brasil. BR 10 2016 005548 2 2016.

NATH, S.; GHOSH, S. K.; CHOUDHURY, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 84, p. 20-30, 2017 Mar - Apr 2017. ISSN 1873-488X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773844> >.

NAUCK, M. Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Diabetes Obes Metab**, v. 18, n. 3, p. 203-16, Mar 2016. ISSN 1463-1326. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26489970> >.

NAUCK, M. A.; BALLER, B.; MEIER, J. J. Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S190-6, Dec 2004. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561910> >.

NIU, G. et al. Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications. **J Control Release**, v. 138, n. 1, p. 49-56, Aug 19 2009. ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19409430> >.

PADUA, B. C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **J Ethnopharmacol**, v. 129, n. 3, p. 381-6, Jun 16 2010. ISSN 1872-7573 (Electronic) 0378-8741 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430095> >.

PALMER, J. P. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, n. 4630, p. 1337-9, Dec 23 1983. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6362005> >.

PAPAETIS, G. S. Incretin-based therapies in prediabetes: Current evidence and future perspectives. **World J Diabetes**, v. 5, n. 6, p. 817-34, Dec 2014. ISSN 1948-9358. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512784> >.

PEETERS, S. A. et al. Plasma matrix metalloproteinases are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. **Cardiovasc Diabetol**, v. 16, n. 1, p. 55, Apr 2017. ISSN 1475-2840. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28446168> >.

PICKUP, J.; KEEN, H. Continuous subcutaneous insulin infusion at 25 years: evidence base for the expanding use of insulin pump therapy in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 3, p. 593-8, Mar 2002. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874953> >.

PICKUP, J. C. Insulin-pump therapy for type 1 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 366, n. 17, p. 1616-24, Apr 26 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533577> >.

POOL, H.; QUINTANAR, D.; FIGUEROA, J. D. Antioxidant effects of quer-cetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, p. 12, 2012.

POSPISILIK, J. A. et al. Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and beta-cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 943-50, Apr 2002. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916911> >.

PRATLEY, R. E.; GILBERT, M. Targeting Incretins in Type 2 Diabetes: Role of GLP-1 Receptor Agonists and DPP-4 Inhibitors. **Rev Diabet Stud**, v. 5, n. 2, p. 73-94, Summer 2008. ISSN 1614-0575 (Electronic) 1613-6071 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18795210> >.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1802-12, Jul 2006. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823478> >.

QIN, X. et al. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 5, p. G943-9, May 2005. ISSN 0193-1857. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677555> >.

RABIN, D. U. et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. **J Immunol**, v. 152, n. 6, p. 3183-8, Mar 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144912> >.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 2717 - 2731, 2004.

REICHETZEDER, C. et al. Head-to-head comparison of structurally unrelated dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the setting of renal ischemia reperfusion injury. **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 14, p. 2273-2286, Jul 2017. ISSN 1476-5381. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28423178> >.

REN, J. et al. Quercetin Inhibits Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis Involving the Suppression of Mammalian Target of Rapamycin and  $\beta$ -catenin Signaling. **Sci Rep**, v. 6, 2016.

RETNAKARAN, R. et al. Continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily injections: the impact of baseline A1c. **Diabetes Care**, v. 27, n. 11, p. 2590-6, Nov 2004. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504991> >.

RICCI, E. J. et al. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **Int J Pharm**, v. 288, n. 2, p. 235-44, Jan 20 2005. ISSN 0378-5173 (Print) 0378-5173 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620863> >.

RICHARDS, P. et al. Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. **Diabetes**, v. 63, n. 4, p. 1224-33, Apr 2014. ISSN 1939-327X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296712> >.

ROBERTSON, R. P. et al. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 112-6, Jan 2000. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10857979> >.

ROHRBORN, D.; WRONKOWITZ, N.; ECKEL, J. DPP4 in Diabetes. **Front Immunol**, v. 6, p. 386, 2015. ISSN 1664-3224 (Print) 1664-3224 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284071> >.

RÖHRBORN, D.; WRONKOWITZ, N.; ECKEL, J. DPP4 in Diabetes. **Front Immunol**, v. 6, p. 386, 2015. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284071> >.

ROSEN, P. et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, n. 3, p. 189-212, May-Jun 2001. ISSN 1520-7552 (Print) 1520-7552 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424232> >.

ROSSONI-JUNIOR, J. V. et al. Annato extract and beta-carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. **J Clin Biochem Nutr**, v. 50, n. 3, p. 177-83, May 2012. ISSN 1880-5086 (Electronic) 0912-0009 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573917> >.

SALEHI, A.; VIEIRA, E.; GYLFE, E. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2318-23, Aug 2006. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873696> >.

SBD, S. B. D. D.-. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2009. 329.

\_\_\_\_\_. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2015-2016. 348.

SHAW, J. E. et al. Type 2 diabetes worldwide according to the new classification and criteria. **Diabetes Care**, v. 23 Suppl 2, p. B5-10, Apr 2000. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860184> >.

SILVA, M. et al. Effects of the interaction of diabetes and iron supplementation on hepatic and pancreatic tissues, oxidative stress markers, and liver peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  expression. **J Clin Biochem Nutr**, v. 49, n. 2, p. 102-8, Sep 2011. ISSN 1880-5086 (Electronic) 0912-0009 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980225> >.

SOEDAMAH-MUTHU, S. S. et al. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. **Diabetes Care**, v. 29, n. 4, p. 798-804, Apr 2006. ISSN 0149-5992. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567818> >.

STEVENSON, R. W. et al. Similar dose responsiveness of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon in vivo. **Diabetes**, v. 36, n. 3, p. 382-9, Mar 1987. ISSN 0012-1797. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2879758> >.

SUNG, M. M. et al. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein  $\alpha$ -actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. **J Mol Cell Cardiol**, v. 43, n. 4, p. 429-36, Oct 2007. ISSN 0022-2828 (Print) 0022-2828 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854826> >.

TAMBASCIA, M. A. **O complexo insulina/glucagon/incretinas e seu papel no controle glicêmico. Novas perspectivas para o tratamento do diabetes tipo 2: incretinomiméticos e inibidores da DPP-4 – Posicionamentos Oficiais SBD.** Revista Brasileira de Medicina. São Paulo. 3: 4-7 p. 2007.

THORENS, B. et al. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. **Cell**, v. 55, n. 2, p. 281-90, Oct 1988. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3048704> >.

TOMAS, E.; HABENER, J. F. Insulin-like actions of glucagon-like peptide-1: a dual receptor hypothesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 2, p. 59-67, Feb 2010. ISSN 1879-3061. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018525> >.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **J Control Release**, v. 73, n. 2-3, p. 137-72, Jun 15 2001. ISSN 0168-3659 (Print) 0168-3659 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516494> >.

TORRES-PIEDRA, M.; ORTIZ-ANDRADE, R.; VILLALOBOS-MOLINA, R. A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. **Eur J Med Chem**, v. 45, p. 2606 - 2612, 2010.

VEGAS, A. J. et al. Corrigendum: Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. **Nat Med**, v. 22, n. 4, p. 446, Apr 2016. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050590> >.

VERNILLO, A. T. Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n. 3, p. 263-70, Mar 2001. ISSN 1079-2104 (Print) 1079-2104 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11250621> >.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 135C, n. 3, p. 357-64, Jul 2003. ISSN 1532-0456 (Print) 1532-0456 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927910> >.

VILSBØLL, T.; HOLST, J. J. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 357-366, Mar 2004. ISSN 0012-186X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968296> >.

WANG, H. et al. A phospholipid complex to improve the oral bioavailability of flavonoids. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 41, n. 10, p. 1693-703, 2015. ISSN 1520-5762 (Electronic) 0363-9045 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25496311> >.

WANG, X. et al. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4904-7, Oct 1999. ISSN 0013-7227. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499550> >.

WANG, Y. et al. Anti-diabetic effects of pentamethylquercetin in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 347-53, Oct 2011. ISSN 1879-0712. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726549> >.

**WHO. World Health Organization: Global report on diabetes: 1-88 p. 2016.**

WOOTTEN, D. et al. Modulation of the glucagon-like peptide-1 receptor signaling by naturally occurring and synthetic flavonoids. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 336, n. 2, p. 540-50, Feb 2011. ISSN 1521-0103 (Electronic) 0022-3565 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21075839> >.

YABE, D.; SEINO, Y. Incretin actions beyond the pancreas: lessons from knockout mice. **Curr Opin Pharmacol**, v. 13, n. 6, p. 946-53, Dec 2013. ISSN 1471-4973. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095602> >.

YAN, S. X. et al. [Hypoglycemic and hypolipidemic effects of quercetin and its glycosides]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 40, n. 23, p. 4560-7, Dec 2015. ISSN 1001-5302. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141664> >.

YOUL, E. et al. Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic beta-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. **Br J Pharmacol**, v. 161, n. 4, p. 799-814, Oct 2010. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20860660> >.

YU, J. et al. Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 27, p. 8260-5, Jul 2015. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100900> >.

ZHANG, L. et al. Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **J Control Release**, v. 85, n. 1-3, p. 73-81, Dec 13 2002. ISSN 0168-3659 (Print) 0168-3659 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480313> >.

ZHENG, D. et al. Exogenous Hydrogen Sulfide Attenuates Cardiac Fibrosis Through Reactive Oxygen Species Signal Pathways in Experimental Diabetes Mellitus Models. **Cell Physiol Biochem**, v. 36, n. 3, p. 917-29, 2015. ISSN 1421-9778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26088607> >.

# CAPÍTULO 11 – ANEXOS

## Anexo I: Comprovante Depósito de Patente

	BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais
--	--------	---------------------	-----------	----------	------------	--------

Instituto Nacional da Propriedade Industrial  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

Consulta à Base de Dados do INPI

[ Início | Ajuda? ]

» Consultar por: Base Patentes | Finalizar Sessão 1/1

---

**Depósito de pedido nacional de Patente**

(21) Nº do Pedido: **BR 10 2016 005548 2 A2**

(22) Data do Depósito: 14/03/2016

(43) Data da Publicação: 19/09/2017

(47) Data da Concessão: -

(51) Classificação IPC: A61K 31/353 ; A61K 31/401 ; A61K 9/10 ; C07D 207/08 ; C07D 311/62 ; A61P 3/10

(54) Título: FORMULAÇÃO MICELAR TERMORREVERSÍVEL CONTENDO QUERCETINA E VILDAGLIPTINA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL EM DIABETES TIPO 1

FORMULAÇÃO MICELAR TERMORREVERSÍVEL CONTENDO QUERCETINA E VILDAGLIPTINA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL EM DIABETES TIPO 1. Uma melhor compreensão do Diabetes mellitus (DM) levou ao desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que tiveram como alvo melhorar a função do pâncreas, como os Inibidores da DPP-IV (Vildagliptina). Somado a isto, sabe-se que a Quercetina é capaz de melhorar estado hiperglicêmico. Entretanto, um passo limitante no uso da quercetina como um agente antidiabético coadjuvante é sua baixa absorção intestinal. Para contornar esta limitação desenvolvemos uma formulação oral contendo Quercetina em associação com Vildagliptina formando um sistema micelar termorreversível baseado no copolímero tribloco poloxâmico 407 (P-407). A administração da Quercetina com a Vildagliptina produzirá contribuições excelentes considerando que não há relatos de trabalhos sobre a exploração de uma estrutura micelar contendo ambos os constituintes no desenvolvimento de uma formulação oral para o tratamento do diabetes tipo 1. Utilizamos 40 ratos distribuídos em 4 grupos: Grupos Controle e Diabético, receberam volume correspondente a 1,0mL de formulação contendo o veículo; Grupo Diabético Tratado, recebeu o volume correspondente a 1,0mL da formulação contendo a Quercetina (50mg/Kg) em associação à Vildagliptina (10mg/Kg); Controle Positivo, recebeu uma injeção intraperitoneal de insulina. Os resultados mostraram a eficácia da formulação na redução da glicemia, aumento da insulinemia e melhora do perfil lipídico.

(57) Resumo:

(71) Nome do Depositante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO (BR/MG)

(72) Nome do Inventor: DANIELA CALDEIRA COSTA / PEDRO HENRIQUE DE AMORIM MIRANDA / JOSÉ MÁRIO BARICHELLO / WANDERSON GERALDO DE LIMA

Anuidades ?

Petições ?

Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery	Data
203	✓	800170320509	28/09/2017	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO		-
207	✓	870160043180	15/08/2016	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO		-
207	✓	870160025493	03/06/2016	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO		-
200	✓	870160008972	14/03/2016	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO		-

## Anexo II: Comprovante Submissão de Artigo

### Detailed Status Information

Manuscript #	<a href="#">SREP-18-06297</a>
Current Revision #	0
Submission Date	21st February 18
Current Stage	Waiting for Revision
Title	Oral formulation of DPP-4 inhibitor plus Quercetin improves metabolic homeostasis in type 1 diabetic rats
Manuscript Type	Original Research
Manuscript Comment	I confirm that Mr. Miranda (author of manuscript) was responsible by drawing the figure 7
Corresponding Author	Dr. Daniela Costa (dani.caldeiracosta@gmail.com) (Universidade Federal de Ouro Preto)
Contributing Authors	Mr. Pedro Henrique Miranda , Miss Kissyla Lacerda , Mrs. Carolina Araújo , Dr. José Barichello , Dr. Wanderson Lima
Authorship	Yes
Abstract	This study aimed to investigate the potential of an oral formulation (QV formulation) containing Quercetin and a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor (DPP-4 inhibitor), Vildagliptin, in improving metabolic homeostasis in type 1 diabetes model. Female albino Fischer rats were divided into four groups: untreated control animals (C), untreated diabetic animals (D), diabetic animals treated with QV formulation (DQV), and diabetic animals treated with insulin (DI). Diabetes was induced by injection of alloxan (135mg kg body mass) <sup>-1</sup> and confirmed by glycemic test. After the 30-day treatment period, biochemical parameters were analyzed in the pancreas, liver, and serum. Histopathological changes in pancreatic tissue were examined by Hematoxyline & Eosin staining and the insulin content in the islet measured by immunohistochemistry with anti-insulin antibody. The glycogen content in the hepatocytes was quantified by Periodic Schiff Acid staining. The QV formulation reduced the glycemia, preserved the pancreatic architecture, increased insulin levels, furthermore ameliorated lipid profile and to promote higher survival rate of animals. Together, our data suggest that the QV formulation treatment was able to normalize metabolic homeostasis in type 1 diabetic rats.
Techniques	Life sciences techniques [Experimental organisms]; Life sciences techniques, Experimental organisms [Rats];
Subject Terms	Biological sciences/Biochemistry Health sciences/Diseases/Endocrine system and metabolic diseases/Diabetes/Type 1 diabetes
Competing Interests Policy	There is <b>NO</b> Competing Interest.
Applicable Funding Source	Ministry of Science, Technology and Innovation   Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) - 454472/2014-5 [Costa] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant Number: APQ 01453-15) [Costa] Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant Number: PPM 00282-11) [Barichello]

Stage	Start Date	End Date	Approximate Duration
Waiting for Revision	20th March 18		
Decision Sent to Author	20th March 18		
Decision Made	16th March 18		
Decision Started	14th March 18		
Manuscript assigned to peer-reviewer/s	14th March 18		
Manuscript Assigned to Peer-Reviewer/s	5th March 18		
Manuscript Assigned to Editor	5th March 18		
Manuscript Assigned to Peer-Reviewer/s	4th March 18		
Manuscript Assigned to Editor	3rd March 18		
Manuscript Submitted	21st February 18		
Quality Check Started	20th February 18		
Submission Not Complete	20th February 18		
Quality Check Started	18th February 18		
Submission Not Complete	15th February 18		



## Anexo III: Comprovante Submissão do Comitê de Ética Animal



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-III, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@propp.ufop.br](mailto:ceua@propp.ufop.br)



### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/17, intitulado "Efeito da vildagliptina (inibidor de DPP-IV) e da quercetina nos mecanismos de preservação de células beta pancreáticas em ratos diabéticos tipo 1", que tem como responsável o/a Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 01/05/2018.

Ouro Preto, 10 de junho de 2014.

*Wanderson Geraldo de Lima*

**Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima**  
Coordenador da CEUA/UFOP