

**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**

**Potencial Neogênico da Vildagliptina em  
células beta pancreáticas e efeito  
potencializador da Quercetina na  
modulação de parâmetros bioquímicos e  
histológicos em um modelo experimental  
de Diabetes *mellitus* tipo 1**

**Ouro Preto  
2014**

PEDRO HENRIQUE DE AMORIM MIRANDA

Potencial Neogênico da Vildagliptina em  
células beta pancreáticas e efeito  
potencializador da Quercetina na  
modulação de parâmetros bioquímicos e  
histológicos em um modelo experimental  
de Diabetes *mellitus* tipo 1

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Ouro Preto como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural  
e Fisiológica

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

Ouro Preto  
2014

M672p

Miranda, Pedro Henrique de Amorim.

Potencial Neogênico da Vildagliptina em células beta pancreáticas e efeito potencializador da Quercetina na modulação de parâmetros bioquímicos e histológicos em um modelo experimental de Diabetes *mellitus* tipo 1 [manuscrito] / Pedro Henrique de Amorim Miranda. - 2014.

91f.: il.; color.; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Diabetes - Teses. 2. Células beta pancreáticas - Teses. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Lima, Wanderson Geraldo de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.379-008.64

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)




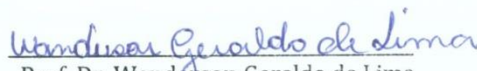
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**


**“Potencial neogênico da vildagliptina em células beta pancreáticas e efeito potencializador da quercetina na modulação de parâmetros bioquímicos e histológicos em um modelo experimental de *diabetes mellitus* tipo 1”**

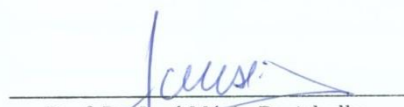
Aos quatorze dias do mês de fevereiro de 2014, às 09:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Pedro Henrique de Amorim Miranda**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... **APROUAR**..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Caldeira Costa  
Presidente (UFOP)

  
Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima  
Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. Frank Silva Bezerra  
Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. José Mário Barichello  
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 13/02/2014



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

*“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

Obrigado Deus por ser o porto seguro e por toda proteção a mim concedida.

A professora Daniela Caldeira Costa, obrigado por abrir as portas do LBM e por todas as oportunidades, desde a graduação como aluno voluntário, seguido como aluno de iniciação científica e agora como aluno de pós-graduação. Sua dedicação com os alunos, sua paciência, sua confiança e todo o convívio criado contribuíram para o fim de mais uma etapa na minha vida profissional. Muito Obrigado!

Obrigado também, em especial, ao Joamir Victor Rossoni Jr, por todo o esforço, apoio e dedicação que você deu para o desenvolvimento do projeto. Se hoje eu consegui gerar bons resultados para o trabalho, é porque eu tive alguém para me proporcionar o melhor suporte possível. Sinceramente, sou muito grato a você! Com certeza essa vitória também é sua.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos que fiz no LBM: **Glaucy Rodrigues de Araújo, Aline Mayrink de Miranda, Lorena Souza e Silva, Carolina Moraes, Bruno da Cruz Pádua, Ana Karla Baltar, Otávio Montovanelli Monteiro** e aos demais integrantes do laboratório. Obrigado pela ajuda incondicional nos dias de eutanásia, nas análises bioquímicas, demais experimentos e por todo o aprendizado e companheirismo. Foi muito bom e gratificante trabalhar com uma equipe como vocês. A vocês meu obrigado eterno;

Ao professor **Wanderson Geraldo de Lima** que muito me ajudou com as análises histológicas e estatísticas. Obrigado pela disponibilidade e dedicação ao meu projeto.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Experimental, **Jair Pastor Mota e Clodoaldo**. Aos alunos de mestrado e iniciação científica do LBM e demais laboratórios do ICEB/NUPEB. Obrigado pela amizade, companheirismo e disposição em me ajudar quando precisei.

Aos meus pais, Aninha e Maneco, muito obrigado por vocês existirem na minha vida. Obrigado por acreditarem sempre que eu posso ir além. A minha querida irmã Marília, você me deu o maior e melhor presente que eu poderia ganhar. Ser tio e padrinho da Isabella tem me ensinado muito mais que poderia imaginar. A minha pequena Isabella, é incrível como a gente aprender a amar tanto um ser tão pequeno. 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 todos vocês existirem 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!

A minha eterna casa, **República Pensão dos Porcos**. Mais uma vez eu venho agradecer pela experiência de vida. É muito bom saber que eu sempre terei um lugar me esperando com as portas abertas e cheio de pessoas diferentes que eu posso chamar de irmãos. O convívio, as diferenças e as histórias fizeram eu admirar cada um de vocês. Muito obrigado por vocês serem a minha família Ouro Pretana.



## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica e Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto com o auxílio financeiro da FAPEMIG, CAPES E UFOP.

# SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	I
LISTA DE SIGLAS .....	III
LISTA DE SIGLAS .....	IV
LISTA DE TABELAS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE ANEXOS .....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 – Diabetes e prevalência .....	3
2.2 – Classificação .....	5
2.3 – Incretinas e Inibidores da DPP-IV .....	6
2.4 Potencial Terapêutico dos Inibidores de DPP-IV no DM1 .....	14
2.5 Potencial Terapêutico da Quercetina no DM1 .....	18
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS .....	20
3.1 – Objetivo Geral .....	20
3.2 – Objetivos Específicos .....	20
3.2.1 – Avaliar o potencial neogênico da Vildagliptina em uma fase tardia do DM1 .....	20
3.2.2 – Avaliar a associação da Quercetina e Vildagliptina na modulação de parâmetros bioquímicos e preservação da histologia pancreática no DM1 .....	21
CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1 – Animais .....	22
4.1.1 – Delineamento Experimental do Protocolo 1 (Avaliação do Potencial Neogênico) .....	22
4.1.2 – Delineamento Experimental do Protocolo 2 (associação Vildagliptina e Quercetina) .....	23
4.2 – Indução do Diabetes .....	24
4.3 – Preparo dos Tratamentos .....	24
4.3.1 – Dispersão da Vildagliptina .....	24
4.3.2 – Dispersão da Quercetina .....	25
4.4 – Eutanásia e Coleta de Material Biológico .....	25
4.5 – Parâmetros Bioquímicos .....	26
4.5.1 – Glicemia .....	26

4.5.2 – Insulina .....	27
4.5.3 – Perfil Lipídico .....	27
4.6 – Parâmetros Histopatológicos.....	31
4.6.1 – Número de Ilhotas e Células Beta Pancreáticas .....	31
4.6.2 – Índice Homa%Beta .....	31
4.7 – Análise Estatística .....	32
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS .....	33
5.1 – Avaliar o potencial neogênico da Vildagliptina em uma fase tardia do DM1 (Protocolo 1).....	33
➤ Massa Corporal, Glicemia, Insulinemia e Perfil Lipídico .....	33
➤ Número de Ilhotas Pancreáticas .....	35
➤ Número de Células Beta Pancreáticas.....	37
➤ Índice Homa%Beta .....	39
➤ Correlações.....	40
5.2 – Associação Vildagliptina e Quercetina em uma fase inicial do DM1 (Protocolo 2).....	41
➤ Massa Corporal, Glicemia, Insulinemia e Perfil Lipídico.....	41
➤ Número de Ilhotas Pancreáticas .....	42
➤ Número de Células Beta Pancreáticas.....	45
➤ Índice Homa%Beta .....	47
➤ Correlações.....	48
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	49
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES .....	61
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	64
ANEXOS.....	75

## LISTA DE SIGLAS

ADA – American Association Diabetes

ALX – Aloxana

C – grupo de animais controle

CQ – grupo de animais controle tratados com Quercetina

CQV – grupo de animais controle tratados com Quercetina e Vildagliptina

CV – grupo de animais controle tratados com Vildagliptina

D – grupo de animais diabéticos

DIO – Dieta indutora de obesidade

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DPP-IV – Dipeptidil Peptidase-IV

DQ – grupo de animais diabéticos tratados com Quercetina

DQV – grupo de animais diabéticos tratados com Quercetina e Vildagliptina

DV – grupo de animais diabéticos tratados com Vildagliptina

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

GLP-1 - Glucagon like peptide-1

GLUT-2 – Receptor de Glicose 2

GLUT4 – Receptor de Glicose 4

GOD – Glicose-oxidase

g – gramas

HbA1c – Hemoglobina Glicada A1c

HDL – High density lipoprotein

H&E – Hematoxilina e Eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

LDL – Low density lipoprotein

LADA – *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*

mg – miligramas

mL – mililitro

μL – microlitro

## LISTA DE SIGLAS

mmol/L – milimol por litro

NOD – Non-obese diabetic

OMS – Organização Mundial de Saúde

pmol/L – picomol por litro ( $10^{-9}$  mol/L)

PMQ – Pentametilquercetina

POD – Peroxidase

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SOD – Superoxido dismutase

STZ – Streptozotocina

TMB – Tetrametilbenzidina

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VLDL – Very low density lipoprotein

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Avaliação do peso, níveis de glicose sanguínea, insulina sérica, colesterol total, HDL-C, fração não-HDL e triglicérides.....	<b>34</b>
<b>TABELA 2.</b> Avaliação do peso, níveis de glicose sanguínea, insulina sérica, colesterol total, HDL-C, fração não-HDL e triglicérides.....	<b>42</b>
<b>TABELA 3.</b> Resultados do tratamento com 5mg/kg de Vildagliptina nos animais com DM1 (Protocolo 1).....	<b>62</b>
<b>TABELA 4.</b> Resultados do tratamento associado com 5mg/kg de Vildagliptina + 5mg/kg de Quercetina nos animais com DM1 (Protocolo 2).....	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Local de secreção e Ações Biológicas do GLP-1.....	7
<b>Figura 2.</b> Ações do GLP-1 nos tecidos periféricos.....	8
<b>Figura 3.</b> Regeneração de células beta. A taxa de geração destas células é dependente de pelo menos 4 fatores: as taxas de proliferação e hipertrofia, bem como as de apoptose e neogênese de células beta.....	8
<b>Figura 4.</b> Ações fisiológicas dos Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-IV.....	10
<b>Figura 5.</b> Inibidores de DPP-IV: (1) Saxagliptina; (2) Sitagliptina;(3) Vildagliptina.....	12
<b>Figura 6.</b> Ação fisiológica dos inibidores de DPP-IV: 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-IV. Os inibidores dessa enzima estendem à meia-vida das incretinas, prolongando assim seus efeitos fisiológicos nas células alfa e beta pancreáticas.....	13
<b>Figura 7.</b> Mecanismos potenciais pelos quais terapias à base de incretinas podem complementar a insulina no tratamento da DM1 em indivíduos com e sem a função das células beta detectável.....	15
<b>Figura 8.</b> Fórmula estrutural da Quercetina (3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavone).....	18
<b>Figura 9.</b> Linha temporal para o protocolo 1.....	22
<b>Figura 10.</b> Linha temporal para o protocolo 2.....	23
<b>Figura 11.</b> Número de ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina.....	35
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina, corados com H&E.....	36
<b>Figura 13.</b> Número de células beta pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina.....	37
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina, corado com Tricômico de Gomori.....	38
<b>Figura 15.</b> Índice Homa%Beta dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina.....	39
<b>Figura 16.</b> Gráficos de dispersão ilustrando a correlação.....	40
<b>Figura 17.</b> Número de ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação.....	43
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação, corados com H&E.....	44
<b>Figura 19.</b> Número de células beta pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação.....	45
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação, coradas com Tricômico de Gomori.....	46
<b>Figura 21.</b> Índice Homa%Beta dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação.....	47
<b>Figura 22.</b> Gráficos de dispersão ilustrando a correlação.....	48

# **LISTA DE ANEXOS**

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



## RESUMO

**Escopo:** Recentemente, hormônios incretinas, incluindo Inibidores da Dipeptidil Peptidase-IV (DPP-IV), tem sido relatados como benéficos no tratamento do Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1). Além destes, uma dieta rica em alimentos que contém fitoquímicos ativos, como flavonóides, também tem chamado à atenção de pesquisadores quanto ao controle do DM1. Através de dois protocolos, nós estudamos a eficiência da Vildagliptina, um inibidor da DPP-IV, isolada ou em associação com Quercetina, um flavonóide, nos parâmetros bioquímicos e histológicos em ratas numa fase inicial e tardia de DM1.

**Materiais e Métodos:** Diabetes foi induzido em ratas Fischer com Aloxana, via injeção intraperitoneal. Protocolo 1: Vildagliptina (5mg/kg/dia via gavagem) foi administrada aos animais 30 dias após a indução do estado de diabetes. O tratamento perdurou por mais 30 dias consecutivos. Passados 60 dias, os animais foram eutaniciados. Protocolo 2: Vildagliptina e Quercetina (ambos 5mg/kg/dia via gavagem), isoladas ou em combinação, foram administradas aos animais logo após a indução do estado de diabetes. O tratamento perdurou por 30 dias consecutivos. Após o tratamento, os animais foram eutaniciados. Em ambos os protocolos, glicemia final de jejum, níveis séricos de insulina, perfil lipídico e histologia pancreática foram avaliados.

**Resultados:** Em ambos os protocolos, os tratamentos não alcançaram a normoglicemia nos animais diabéticos. Apenas o tratamento tardio com Vildagliptina aumentou os níveis séricos de insulina, enquanto em ambos os protocolos, com tratamentos agudo e tardio, houve melhora no perfil lipídico e na população de células beta pancreáticas nos animais com DM1.

**Conclusão:** Nossos resultados demonstram que o tratamento tardio com Vildagliptina, assim como o tratamento agudo com a combinação entre Vildagliptina e Quercetina, podem oferecer uma nova estratégia terapêutica capaz de restabelecer a população e função das células beta pancreáticas em modelo *in vivo* de DM1.

**Palavras-chave:** Diabetes *mellitus* tipo 1, Vildagliptina, Quercetina

## ABSTRACT

**Background and Aims:** Recently, incretin hormones, including dipeptidyl peptidase- IV (DPP-IV), has been reported as beneficial in the treatment type 1 diabetes *mellitus* (DM1). In addition, a diet rich in foods containing active phytochemicals such as flavonoids, has also drawn the attention of researchers regarding the control of DM1. Through two protocols, we study the efficiency of Vildagliptin, a DPP-IV inhibitor, alone or in combination with Quercetin, a flavonoid, biochemical and histological parameters in an advanced-stage and initial DM1 rats model.

**Materials and Methods:** Diabetes in Fischer rats was induced by Alloxan, intraperitoneal injection. Protocol 1: Vildagliptin (5mg/kg/day gavage) were administered to the animals 30 days after the induction of diabetes state . The treatment continued for 30 consecutive days. After 60 days, the animals were euthanized. Protocol 2: Quercetin and Vildagliptin (both 5mg/kg/day gavage) alone or in combination, were administered to the animals after induction of diabetes state. The treatment lasted for 30 consecutive days. After treatment, the animals were euthanized. In both protocols, fasting blood glucose, serum insulin, lipid profile and pancreatic histology were evaluated.

**Results:** In both protocols, the treatments did not achieve normoglycemia in diabetic animals. Only late treatment with Vildagliptin increased serum levels of insulin, while in both protocols, with acute and late treatments, there was an improvement in the lipid profile and the population of pancreatic beta cells in type 1 diabetic animals.

**Conclusion:** Our results demonstrate that late treatment with Vildagliptin, as well as acute treatment with the combination of Vildagliptin and Quercetin, may offer a novel therapeutic strategy able to restore the population and function of pancreatic beta cells *in vivo* model of DM1.

**Keywords:** Type 1 Diabetes, Vildagliptin, Quercetin

# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) constitui atualmente um problema de saúde pública em vários países do mundo. Ele atinge 246 milhões de pessoas no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), e tem status de epidemia agravado devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como a maior sobrevida do paciente com DM (GOLDENBERG *et al.*, 2003). O DM é um problema de saúde considerado Condição Sensível à Atenção Primária, ou seja, evidências demonstram que o bom manejo deste problema ainda na Atenção Básica evita hospitalizações e mortes por complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (ALFRADIQUE *et al.*, 2009).

O diabetes vem sendo estudado desde o início do século passado e muito já se avançou na compreensão das alterações bioquímicas provocadas pela hiperglicemia, de forma que diversas são as estratégias terapêuticas já disponíveis no mercado para o controle desta síndrome.

Nos anos 70 vários hormônios intestinais, denominados de incretinas, foram identificados, como o GLP-1 (Glucagon like peptide-1), que foi reconhecido como um importante contribuinte para o controle do diabetes (TAMBASCIA, 2007). Assim, foi entendido que o processo glicorregulatório no diabetes é, também, o resultado da interação dos hormônios pancreáticos (insulina e glucagon) com hormônios incretinas, fazendo o diabetes ser visto como uma doença multi-hormonal. Baseado nesta informação, ao longo da última década, uma melhor compreensão do DM levou ao desenvolvimento de novas estratégias de tratamento baseadas nas incretinas que tiveram como alvo melhorar a função do pâncreas, como os medicamentos Inibidores da Dipeptidil Peptidase-IV (DPP-IV). Estes inibidores foram lançados no mercado com o intuito de promover um melhor controle sobre o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), de forma que, ao inibirem a enzima DPP-IV e aumentar os níveis endógenos das incretinas, estimulam a secreção de insulina de maneira dose-dependente e inibem a produção de glucagon, promovendo um benéfico controle sobre a glicemia dos pacientes (ELIASCHEWITZ *et al.*, 2007). Uma vez que o mecanismo de ação dos inibidores da DPP-IV é essencialmente estabilizar o GLP-1 endógeno, essa classe de fármacos pode ter melhores resultados se utilizada nas fases iniciais do diabetes tipo 2, quando o paciente ainda preserva uma população de células beta capaz de responder ao estímulo

do GLP-1. Uma vez que são poucos os estudos que avaliaram as influências destes inibidores no modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), neste presente estudo objetivou-se avaliar o efeito do inibidor da DPP-IV, Vildagliptina, em uma fase tardia de DM1, quando as células pancreáticas produtoras de insulina já estão praticamente exauridas e, por isto, a presença destas células após o tratamento com Vildagliptina poderia está associado ao processo de neogênese de células beta.

Pesquisas recentes já demonstram que os inibidores da DPP-IV possibilitam uma melhora no tecido pancreático de animais DM1, tanto no estado de pré-diabetes quanto em fases mais avançadas da doença (OMAR *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013).

Considerando ainda que o estado hiperglicêmico é um dos parâmetros mais difíceis de serem controlados no DM1, diversos foram os estudos epidemiológicos que mostraram a menor incidência de doenças crônicas não-transmissíveis associadas a uma maior participação de frutas e vegetais na dieta (PAIVA *et al.*, 1999). O aumento do consumo de alimentos à base de plantas, incluindo frutas e verduras que são boas fontes de fitoquímicos biologicamente ativos, como flavonoides, e que apresentam atividade antioxidante têm recebido considerável interesse por parte de pesquisadores e profissionais da saúde (JACQUES *et al.*, 2013; JENNINGS *et al.*, 2014).

Os flavonóides (do latim flavus, "amarelo") 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 está presente em diversos alimentos, como alho, cebola, alface, brócolis, maçã, azeitona, uva, entre outros, e exerce múltiplas atividades farmacológicas (SKIBOLA, 2000; MOON *et al.*, 2008). O consumo diário da Quercetina pode está associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, desenvolvimento de tumores, derrames cerebrais e doenças neurodegenerativas (PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; RATNAN *et al.*, 2006). Além disso, também foi demonstrada que a Quercetina apresentou atividades benéficas no modelo experimental de Diabetes *mellitus* tipo 1, seja promovendo o controle glicêmico ou até mesmo a melhora da arquitetura pancreática (VESSAL *et al.*, 2003; COSKUN *et al.*, 2005; KOBORI *et al.*, 2009).

Diante dos possíveis efeitos benéficos dos inibidores da DPP-IV e dos flavonóides no modelo experimental DM1, este estudo também avaliou o efeito da Vildagliptina, associada ou não à Quercetina, nos parâmetros bioquímicos e histológicos de ratas DM1 induzidas com aloxano.

## **CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – Diabetes e prevalência**

O Diabetes mellitus (DM) é um importante problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso 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. Medidas de prevenção do DM assim como das complicações são eficazes em reduzir o impacto desfavorável sobre morbimortalidade destes pacientes.

O DM é uma desordem metabólica sistêmica crônica decorrente da deficiência total ou parcial na síntese de insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Caracteriza-se pela alteração no metabolismo de proteínas, lipídeos, sais minerais e principalmente de glicose (ADA, 2004).

A pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) revelou um aumento de 40% no número de pacientes declarados diabéticos entre 2006 e 2012, no Brasil. O percentual de pessoas diagnosticadas passou de 5,3% para 7,4% neste período. Em relação ao sexo, os dados demonstram que o diabetes é mais comum em mulheres (8,1%) do que em homens (6,5%) e quanto à idade houve crescimento em todas as faixas etárias, porém na faixa de 35 a 44 anos o aumento foi mais significativo, sendo 26,6% de 2006 a 2012. Outra faixa etária de destaque foi a partir de 65 anos, que passou de 19,2% para 22,9%, no mesmo período (BRASIL, 2012).

No topo da lista dos países com maior número de diabéticos, nas estimativas realizadas para os anos de 1995 e 2000, estavam Índia, China e Estados Unidos, e estes permanecem nesse topo nas estimativas para 2030. O Brasil apareceu em oitavo lugar nas listas de 1995 e 2000, mas ocupará a sexta posição na estimativa para 2030, com aproximadamente 11,3 milhões de doentes (WILD et al., 2004, KING et al., 1998). Em 2012, o Vigitel coletou dados nas 26 capitais brasileiras, ouvindo aproximadamente 50.000 pessoas. A capital com maior percentual de diabéticos foi São Paulo (9,3%) e o menor índice foi em Palmas (4,3%). Belo Horizonte (6,6%) foi considerada a 12ª capital com maior percentual de diabéticos no Brasil (BRASIL, 2012).

Sua natureza crônica, a gravidade de suas complicações e os meios necessários para controlá-lo torna o DM uma doença muito onerosa, não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde. Os custos dos cuidados de saúde para um indivíduo com DM nos EUA foi estimado em duas a três vezes maiores do que o de um indivíduo sem a doença (SBD, 2007). No Brasil, o custo direto está em torno de 3,9 bilhões de dólares, em comparação com 0,8 bilhão para a Argentina e 2 bilhões para o México (BARCELÓ *et al.*, 2003). Em pesquisa realizada entre os anos de 2008 e 2010 no Brasil, o número de internações por DM aumentou aproximadamente 13%, com uma média de permanência de internação de 6 dias (BRASIL, 2012). 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).

O critério diagnóstico do DM foi modificado, em 1997, pela American Diabetes Association (ADA), posteriormente aceito pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). As modificações foram realizadas com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares do DM. Atualmente são três os critérios aceitos para o diagnóstico de DM com utilização da glicemia (SBD, 2012 – 2013):

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual > 200mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições.
- Glicemia de jejum  $\geq$  126mg/dL (7mmol/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 > 200mg/dL

## 2.2 – Classificação

A classificação atual do DM 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:

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

O Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), forma presente em 5% - 10% dos casos, é uma doença crônica caracterizada pela destruição parcial ou total 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, 2007). 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, 2004). Na maioria dos casos essa destruição das células é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto referida como forma idiopática. 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 DM1 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 a infecções, neuropatia, retinopatia, nefropatia, aterosclerose acelerada associada ao infarto do miocárdio e amputações de membros (ADA, 2004; VERNILLO, 2001). O tratamento convencional do DM1 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. Terapêuticas alternativas à insulinoterapia que se mostrem mais eficientes para a manutenção da glicemia são de extrema importância.

Já o Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é a forma 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 quadro de resistência à insulina característico neste tipo de DM 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. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos em pacientes que apresentam fatores de riscos como obesidade, dieta hipercalórica e hábitos sedentários (BLOOMGARDEN, 2006).

### **2.3 – Incretinas e Inibidores da DPP-IV**

As incretinas são hormônios sintetizados no trato gastrointestinal e secretados mediante a entrada de nutrientes no intestino, desenvolvendo um importante papel na homeostase da glicose sanguínea por estimular a secreção de insulina de maneira glicose-dependente (VILHAUER, 2004; DRUCKER, 2006) além de exibir efeitos trópicos nas células beta pancreáticas (FARILLA *et al.*, 2002; PERFETTI, 2004). O conceito desta ação da incretina baseou-se em estudos que constataram que a resposta de insulina à glicose ingerida excedia a das quantidades equivalentes de glicose administrada por via intravenosa (NAUCK *et al.*, 1986). Tal análise de quantificação da



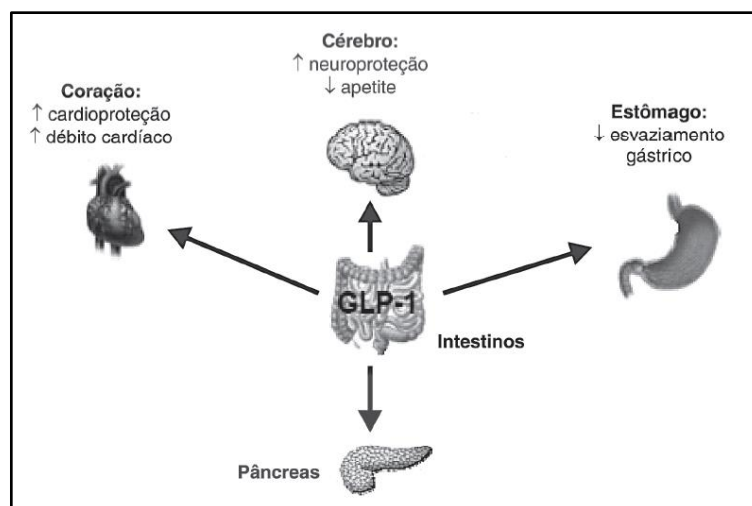
insulina foi feita através da concentração de peptídeo de conexão (peptídeo C), usado como marcador da produção endógena de insulina.

O hormônio incretina predominante é o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1). Foi descoberto durante a clonagem e caracterização do gene do pró-glucagon (BELL *et al.*, 1983) e é um produto da clivagem desse gene pela pró-hormônio convertase PC1/3 (UGLEHOLDT *et al.*, 2004). O GLP-1 é sintetizado principalmente pelas células L enteroendócrinas que estão distribuídas pelos enterócitos de todo o intestino delgado e cólon ascendente, onde são secretados e liberados na corrente sanguínea em resposta à ingestão de nutrientes (DOYLE, 2007; JANG *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que GLP-1 foi capaz de melhorar a homeostase da glicose, incluindo a potencialização da secreção de insulina de maneira glicose-dependente e a inibição da secreção de glucagon (DOYLE, 2007). **(Figura 1)**



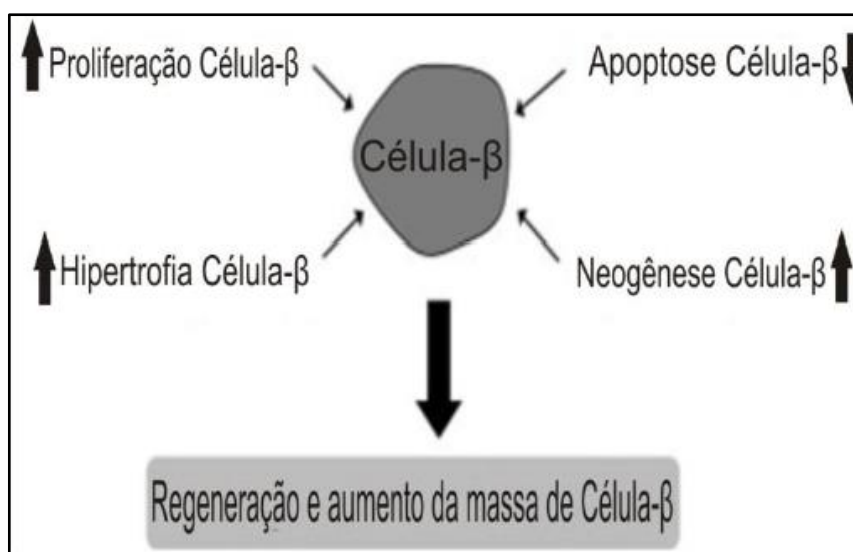
**Figura 1.** Local de secreção e Ações Biológicas do GLP-1 (*Fonte: DRUCKER, 2003*).

O GLP-1 exerce fisiologicamente seus efeitos via ativação de seus respectivos receptores acoplados à proteína G transmembrana (LOTFY *et al.*, 2011) entretanto, no diabetes, a secreção de GLP-1 fica comprometida ou mesmo ausente, contribuindo para a deficiência na secreção de insulina (NAUCK *et al.*, 2004). KIEFFER *et al.*, 1999 demonstraram que o GLP-1 foi responsável por mais de 50% da liberação de insulina imediatamente após a ingestão de uma refeição. YANAY *et al.*, em recentes estudos sobre o papel das incretinas, relataram que GLP-1 exerce atividade glicorregulatória via diminuição do esvaziamento gástrico, inibição da secreção de glucagon de forma glicose-dependente e age no sistema nervoso induzindo o sinal de saciedade (YANAY *et al.*, 2010) **(Figura 2)**.



**Figura 2.** Ações do GLP-1 nos tecidos periféricos (Fonte: TAMBASCIA, 2007).

Além de todos esses efeitos fisiológicos que, em conjunto, levariam a um melhor controle glicêmico, tem sido relatado por muitos autores que GLP-1 foi capaz de melhorar a sobrevivência de células beta contribuindo assim para a regulação da secreção de insulina em longo prazo (YABE *et al.*, 2013). 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 (**Figura 3**), principalmente devido a apoptose (BUTLER *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Regeneração de células beta. A taxa de geração destas células é dependente de pelo menos 4 fatores: as taxas de proliferação e hipertrofia, bem como as de apoptose e neogênese de células beta (Fonte: BHANSALI *et al.*, 2005).

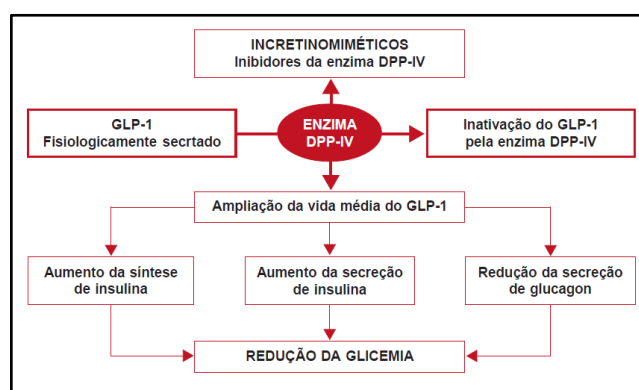
FARILLA *et al.*, 2002 demonstraram que o GLP-1 protegeu as células beta da apoptose, assim como YABE *et al.*, 2013 observaram que GLP-1 foi capaz de ativar a proliferação e diferenciação dessas células e inibir sua apoptose, contribuindo para a regulação da secreção de insulina a longo prazo, devido à manutenção de uma massa de células beta funcionais. Estudos *in vitro* e em modelos animais de diabetes não autoimune tem mostrado que agentes à base de incretinas aumentam a massa de células beta por aumentar a regulação do fator de transcrição duodenal e pancreático, denominado proteína homeobox-1 (STOFFERS *et al.*, 2000), o qual é conhecido por aumentar a transcrição do gene da insulina e regular a glicocinase e o transportador de glicose 2 (GLUT2) (WANG *et al.*, 1999), além disso, observou-se um estímulo à neogênese das ilhotas pancreáticas (DRUCKER, 2006).

Uma vez que as incretinas desempenham ações fisiológicas benéficas, as principais linhas de pesquisa têm se concentrado na incretina GLP-1, tendo em vista seu potencial promissor no tratamento do DM2 (NAUCK *et al.*, 2004), doença em que inicialmente as incretinas foram utilizadas como medida terapêutica. No entanto, o uso terapêutico do GLP-1 como agente antidiabético o torna inviável devido à sua meia-vida curta como resultado de sua rápida inativação pela enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (DEACON *et al.*, 2008; DRUCKER, 2006). O GLP-1 é rapidamente metabolizado pela DPP-IV, com uma meia-vida ativa de apenas 1 a 2 minutos (ANDUKURI *et al.*, 2009), dificultando o seu emprego no tratamento do DM2.

A DPP-IV é representante de uma família de enzimas existentes na circulação e na superfície de múltiplos tecidos, como no fígado, pâncreas, baço, rins, endotélio vascular e na placenta (GREEN *et al.*, 2006). A DPP-IV também está presente na membrana celular de diversos componentes do sistema imunológico, principalmente dos linfócitos T ativados, nos quais funciona como uma molécula coestimuladora com a molécula CD-45 na transdução de sinal (STANKOVIC *et al.*, 2008). A atividade de DPP-IV consiste em clivar cadeias peptídicas nas quais está presente a prolina ou a alanina como o segundo aminoácido a partir da extremidade N-terminal (POSPISILIK *et al.*, 2002). Em relação à decomposição das incretinas pela ação dessa enzima, a DPP-IV pode decompor o peptídeo ativo, clivando a alanina na posição de segundo aminoácido N-terminal da cadeia, resultando assim em um composto inativo (GAUTIER *et al.*, 2008). Estudos anteriores já demonstraram que a DPP-IV é também encontrada no endotélio de capilares que drenam a mucosa intestinal, onde as células secretoras de GLP-1 estão

situadas (GAUTIER *et al.*, 2008; HANSEN *et al.*, 1999), o que indica que a maior parte do GLP-1 é inativado quase imediatamente após sua secreção (LOTFY *et al.*, 2011).

Estes conceitos têm levado os estudiosos a buscar novas estratégias terapêuticas capazes de contornar a degradação pela DPP-IV. Dentre as estratégias, citam-se os medicamentos incretinomiméticos e os inibidores da DPP-IV. Por definição, incretinomiméticos são os análogos do GLP-1 resistentes à inativação enzimática, como o Liraglutida, e os agonistas do receptor do GLP-1, como o Exenatida, os quais apresentam ações farmacológicas que mimetizam as ações das incretinas (LOTFY *et al.*; 2011; KHNUDSEN *et al.*, 2000; GOKE *et al.*, 1993). Já os inibidores da DPP-IV são responsáveis pela inibição da enzima DPP-IV, aumentando a vida média do GLP-1 para algumas horas, estendendo, assim, sua ação fisiológica benéfica (TAMBASCIA, 2007) (**Figura 4**).



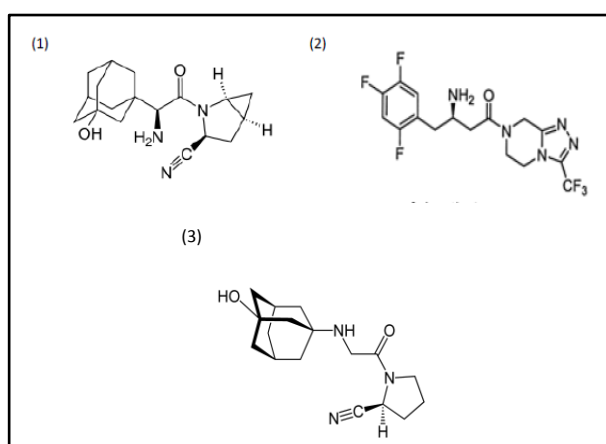
**Figura 4.** Ações fisiológicas dos Incretinomiméticos e Inibidores da DPP-IV (Fonte: Eliaschewitz, 2007).

Os inibidores da enzima DPP-IV exercem seus efeitos hipoglicêmicos indiretamente por melhorar a longevidade, a concentração plasmática e consequentemente a ação das incretinas (ABBOTT *et al.*, 1994). Já foi demonstrado que inibidores de DPP-IV podem inibir mais que 90% da atividade plasmática da enzima-alvo por um período de mais de 24 horas, aumentando os níveis de incretinas ativas pela prevenção da sua rápida degradação (PRATLEY *et al.*, 2008). Assim, inibidores de DPP-IV influenciam na secreção endógena de incretinas, melhorando a hiperglicemia de maneira glicose-dependente devido ao aumento dos níveis séricos de insulina em pacientes com DM2 (DRUCKER *et al.*, 2006; HERMAN *et al.*, 2006), regulando a proliferação da massa de células beta (KANETO *et al.*, 2008; KANETO *et al.*, 2009) e podem, por isso, ser usados nas fases iniciais do diabetes tipo 2, enquanto as células beta secretoras de insulina ainda não se exauriram (PRATLEY *et al.*, 2008).

POSPISILIK *et al* demonstraram que a administração a longo prazo de um inibidor de DPP-IV em modelos de ratos com diabetes tipo 2 resultou em um aumento na tolerância à glicose, na sensibilidade à insulina e na resposta das células- $\beta$  à glicose (POSPISILIK *et al.*, 2002), além disso, o mesmo autor mostrou que o tratamento a longo prazo com o inibidor de DPP-IV em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) melhorou a tolerância à glicose, aumentou o conteúdo de insulina e estimulou a neogênese e sobrevivência das células- $\beta$  pancreáticas (POSPISILIKI *et al.*,2003). Pesquisas utilizando inibidores da DPP-IV na massa de células beta pancreáticas mostraram efeitos positivos, seja por estímulo direto da replicação celular ou pela inibição da apoptose e ativação de vias antiapoptóticas (XU *et al.*, 1999; STOFFERS *et al.*, 2000; DRUCKER, 2003; CHO *et al.*, 2011, DOBRIAN *et al.*, 2011). Sendo assim, além da sua utilização para o tratamento de DM2, os inibidores de DPP-IV também possuem importantes propriedades citoprotetoras e regenerativas. Outro achado fisiológico importante foi feito por MARI *et al.* e AHREN *et al.*, que demonstraram que a inibição de DPP-IV também suprime a liberação de glucagon, o que corresponde a uma redução na produção de glicose hepática, uma vez sabido que o agravamento do diabetes está associado a um aumento nos níveis de glucagon (MARI A. *et al.*, 2005; AHREN *et al.*,2004). E ainda, segundo AHREN *et al.*, após a inibição de DPP-IV houve aumento da sensibilidade à insulina, o que resulta numa redução dos níveis de glicose no plasma (AHREN *et al.*,2002; AHREN *et al.*,2009). Em um estudo realizado na China, LI *et al.* avaliaram a influência do inibidor da DPP-IV, MK0626 (inibidor recentemente sintetizado e fornecido pela Merc. Co), sobre os níveis de glicose sanguínea, morfologia das ilhotas, distribuição de células beta na ilhota e sobre o índice de proliferação e apoptose de células beta. A hipótese foi testada em camundongo kky, um modelo animal de diabetes tipo 2 espontâneo. Dentre os resultados alcançados, o grupo observou que os animais que receberam a dose de MK0626 não desenvolveu diabetes, com níveis de glicose semelhantes aos animais controle. A morfologia das ilhotas mostrou que o grupo tratado manteve a organização celular e integridade da membrana das ilhotas, além de ter apresentado uma maior proporção de células beta em comparação ao grupo controle. Em relação ao índice de proliferação de células beta, o indicador de proliferação celular (Ki67) comprovou que animais que receberam a dose de MK0626 apresentaram maior nível de células beta ki67 positivas (LI *et al.*, 2013).

Existem vários tipos de inibidores da DPP-IV disponíveis no mercado: Exenatida, Liraglutida, Sitagliptina, Saxagliptina, Linagliptina e Vildagliptina, sendo este último

utilizado em nosso estudo. A Vildagliptina, que tem o nome comercial de Galvus, foi o segundo inibidor de DPP-IV aprovado pela União Europeia para o tratamento do diabetes. As estruturas molecular e farmacocinética da Vildagliptina são diferentes das de outros inibidores de DPP-IV. A Sitagliptina, por exemplo, é um antagonista competitivo da DPP-IV, enquanto a Vildagliptina, que tem alta afinidade pela DPP-IV (AHREN *et al.*, 2007; EL-OUAGHLIDI *et al.*, 2007), atua como substrato da enzima, provocando assim a inibição da sua ligação à molécula-alvo (LOTFY *et al.*, 2011) (Figura 5)

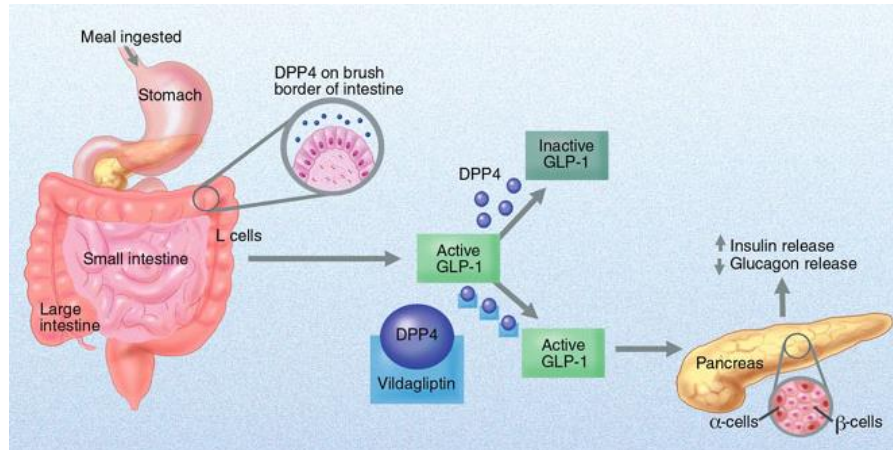


**Figura 5.** Inibidores de DPP-IV: (1) Saxagliptina; (2) Sitagliptina; (3) Vildagliptina (Fonte: LOTFY *et al.*, 2011).

Diversos são os estudos e pesquisas que visam avaliar e comprovar a eficácia dos inibidores da DPP-IV. Dados recentes demonstraram que a Sitagliptina está sendo amplamente testada no cenário clínico para avaliar a sua eficácia, em longo prazo, em melhorar a função das células beta em humanos com DM2 (DRUCKER *et al.*, 2007; KARASIK A. *et al.*, 2008). Além disso, ANSARULLAH *et al.* demonstraram que a Sitagliptina, quando administrada isoladamente ou em associação com um agonista do receptor de GLP-1 (PSN632408), foi capaz de restabelecer a normoglicemia de camundongos diabéticos, aumentar os níveis plasmáticos de GLP-1 ativo e a massa de células beta pancreáticas, bem como estimular a replicação de células beta após 7 semanas de tratamento (ANSARULLAH *et al.*, 2013).

Em relação ao uso da Vildagliptina como alternativa terapêutica no tratamento do DM, triagens clínicas conduzidas mostraram que a Vildagliptina é bem tolerada e eficaz na melhora do controle glicêmico em pacientes com DM2 (AHREN B. *et al.*, 2011). Em

pesquisa realizada no Japão, ISHIBASHI *et al.* investigaram se o tratamento com Vildagliptina em associação com Miglitol, um inibidor de alfa glicosidase, poderia melhorar alguns parâmetros metabólicos em modelo de camundongo db/db dieta-controlada tratados durante 6 semanas. O tratamento associado foi capaz de suprimir a excursão glicêmica pós-prandial, aumentar os níveis de GLP-1 ativos pós-prandial e melhorar a tolerância à glicose. O tratamento combinado não alterou a massa de células beta, mas resultou na preservação da estrutura das mesmas (preservou a expressão do transportador de glicose GLUT2 e ZnT8), além de preservar a expressão de MafA, fator de transcrição essencial para a função das células beta (ISHIBASHI *et al.*, 2013). Estudos em 2008 e 2009 também evidenciaram que a Vildagliptina foi eficaz em diminuir a glicemia em pacientes DM2, especialmente a hiperglicemia pós-prandial e com baixo risco de hipoglicemia e sem ganho de peso (KIM *et al.*, 2008; BANERJEE *et al.*, 2009). Além disso, a Vildagliptina pode aumentar consideravelmente a liberação de insulina e simultaneamente reduzir os níveis de glucagon (**Figura 6**), 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 *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Ação fisiológica dos inibidores de DPP-IV: 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-IV. Os inibidores dessa enzima estendem à meia-vida das incretinas, prolongando assim seus efeitos fisiológicos nas células alfa e beta pancreáticas (*Fonte: MOULINATH, B. et al., 2009*).

O fármaco pode ainda reduzir a lipólise assim como a hipertrigliceridemia pós-prandial, provavelmente devido ao aumento da concentração plasmática de incretinas induzido por ele, processo que tem sido relacionado com a redução da absorção

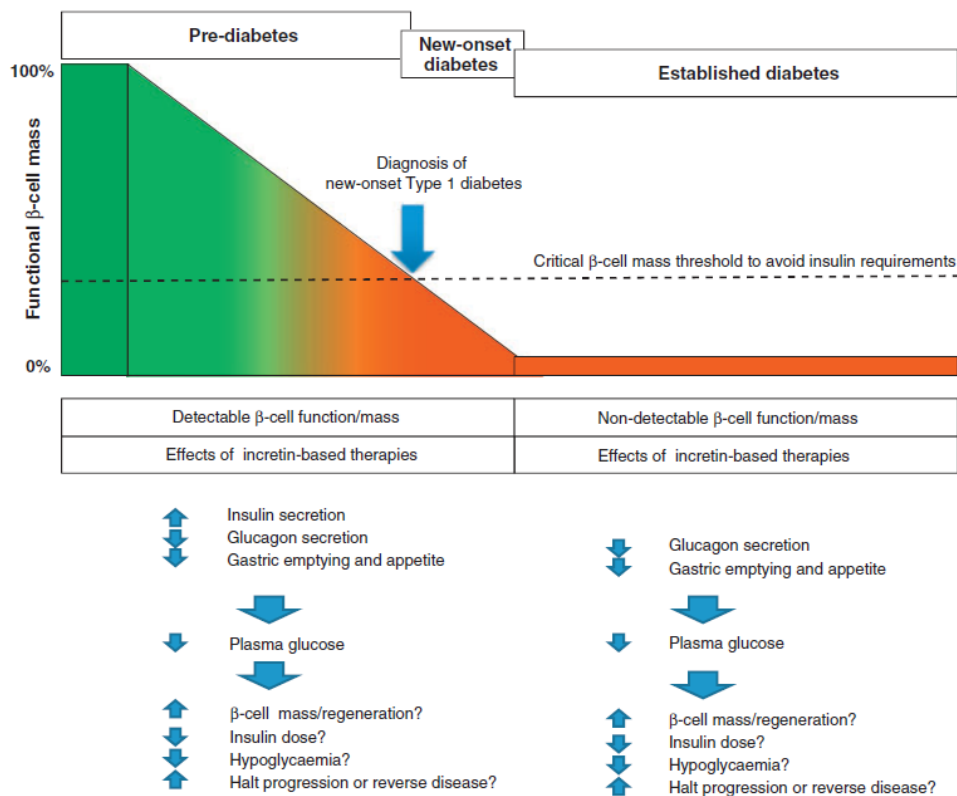
intestinal de triglicérides em estudos animais (D'ALESSIO *et al.*, 2005; AZUMA *et al.*, 2008). Recentemente, um grupo de pesquisadores da Suécia, utilizando um modelo de camundongo diabético idade avançada (10 meses) e com obesidade induzida por dieta (DIO), demonstrou o efeito do tratamento crônico com Vildagliptina. Segundo os autores, este é o modelo mais fidedigno para se estudar o DM2 em humanos, e poucos são os trabalhos que estudam este modelo. Dos resultados encontrados, houve melhora na secreção de insulina e na função da célula beta ao longo de 11 meses de tratamento, além da quase completa melhora no quadro de peri-insulite instalada (OMAR *et al.*, 2013). Ainda avaliando o efeito da Vildagliptina em preservar a massa e função das células beta no modelo de diabetes, HAMAMOTO *et al.* demonstraram que a Vildagliptina foi capaz de regular positivamente a expressão de genes envolvidos na diferenciação/proliferação de células em camundongos *kk-A<sup>y</sup>* diabéticos. A expressão dos genes envolvidos na apoptose diminuiu, enquanto a expressão de genes relatados como antiapoptóticos aumentou, resultando no aumento da massa de células beta pancreáticas (HAMAMOTO *et al.*, 2013). Considerando, então, 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, em longo prazo, no ser humano, então essa classe de medicamentos poderá ser utilizada desde o estágio de pré-diabetes até as fases mais avançadas da doença, seja no DM1 ou DM2.

## **2.4 Potencial Terapêutico dos Inibidores de DPP-IV no DM1**

Alterações e/ou defeitos nos processos fisiológicos que normalmente mantêm a homeostase da glicose contribuem para a dificuldade na obtenção de metas glicêmicas. Tratamentos coadjuvantes oferecem um potencial meio de complementar a terapia insulínica intensiva no DM1 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 pela células alfa pancreática no estado pós-prandial (GEORGE *et al.*, 2013). Existem evidências que a infusão de GLP-1 reduz a concentração de glicose jejum e pós-prandial (DUPRE *et al.*, 2004) em associação com a redução nos níveis de glucagon no DM1, embora isto não seja evidente em todos os estudos (RAMAN *et al.*, 2010).



Poucos são os estudos que verificam o efeito da inibição de DPP-IV em modelos animais de DM1. Apesar destes inibidores terem sido extremamente estudados no tratamento do DM2, pouco se sabe do seu potencial no tratamento do DM1 (DUPRE *et al.*, 2005; DUPRE *et al.*, 1995). Sendo assim, o dano progressivo na função da célula beta e declínio na massa destas células resultam na deficiência relativa ou absoluta de insulina e hiperglicemia, a base primária de todas as manifestações diabéticas (PRENTKI *et al.*, 2006). Portanto, estratégias que possam induzir a regeneração de células beta teria o potencial de curar o diabetes (ANSARULLAH *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Mecanismos potenciais pelos quais terapias à base de incretinas podem complementar a insulina no tratamento da DM1 em indivíduos com e sem a função das células beta detectável (Fonte: GEORGE, 2013).

Recentes estudos têm demonstrado que a estimulação do crescimento, diferenciação e inibição da apoptose de células beta aumentam a lista de efeitos dos inibidores de DPP-IV. Estes achados providenciam uma razão inicial para investigar os efeitos, em longo prazo, dos inibidores de DPP-IV na homeostase da glicose e integridade das ilhotas pancreáticas (efeito citoprotetor) no modelo de DM1. Segundo KIM *et al.*, o inibidor de DPP-IV MK0431 prolongou a sobrevivência de células beta

em ratos DM1 induzidos por STZ (KIM *et al.*, 2009). Já GIAMPIETRO *et al.*, 2013 demonstraram que o tratamento crônico com Sitagliptina em associação com terapia insulínica apresenta resultados diferentes em pacientes com DM1 e DM2. 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 DM2. Já nos pacientes com DM1, 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 (GIAMPIETRO O. *et al.*, 2013). Achados científicos demonstram que infusões de GLP-1 reduzem excursões glicêmicas em pacientes com DM1, e este resultado foi atribuído à redução dos níveis de glucagon e retardamento do esvaziamento gástrico (DUPRE *et al.*, 2005). Vários são os relatos de pesquisadores quanto à dificuldade de se obter um controle glicêmico no modelo DM1. 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, foi observado efeitos benéficos sobre os danos vasculares induzidos pelo diabetes, entretanto não foi observado melhora nos níveis de glicemia jejum.

O DM1 é uma desordem metabólica caracterizada por infiltração de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas (CASTANO *et al.*, 1990, ATKINSON *et al.*, 2001), levando a uma resposta imune e destruição seletiva das células beta produtoras de insulina. Dados da literatura também indicam que inibidores da DPP-IV, além das várias funções já citadas, apresentam atividade anti-inflamatória em modelo animal DM1 (JELSING *et al.*, 2012). JELSING e colaboradores avaliaram o efeito do inibidor de DPP-IV 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.*, 2009, 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).

ÁVILA *et al.*, avaliaram o possível efeito protetor do tratamento com Vildagliptina na preservação de células beta pancreáticas em um modelo experimental de DM1 induzido por estreptozotocina (STZ). No referido estudo, foram utilizadas duas concentrações de Vildagliptina (5 ou 10mg/kg de peso corpóreo/dia) administrada oralmente durante 4 semanas em ratos. Foram avaliados glicemia, níveis de insulina plasmática, 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 plasmática, 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, conseqüentemente, 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, sendo que a concentração de 5mg/kg de Vildagliptina foi mais efetiva na redução do estresse pancreático, possibilitando uma melhor preservação celular (ÁVILA *et al.*, 2013).

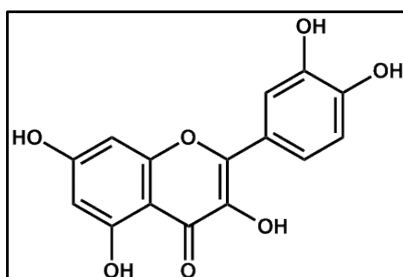
Apesar dos resultados histológicos positivos encontrados por ÁVILA *et al.*, quanto a capacidade da Vildagliptina em reduzir a destruição de ilhotas e células beta pancreáticas, os eventos moleculares e mecanísticos da sobrevivência celular não foram elucidados. Vários são os estudos que demonstraram a capacidade dos inibidores da DPP-IV em aumentar a massa de células beta, que pode ser explicado por redução do estresse oxidativo (ÁVILA *et al.*, 2013), pela diminuição da apoptose das células (HAMAMOTO *et al.*, 2013), ou ainda pelo aumento da regeneração das células beta ou efeito neogênico (ANSARULLAH *et al.*, 2013; CHO *et al.*, 2011). Baseado neste fato houve a necessidade em esclarecer por qual mecanismo a Vildagliptina possibilitou tal aumento na massa das células beta: preservação celular ou neogênese?

Outro parâmetro que necessita de novos estudos refere-se ao perfil glicêmico. Diversos autores relataram a ineficiência dos inibidores da DPP-IV na redução da glicose sanguínea no modelo de DM1 (MAEDA *et al.*, 2012; GIAMPIETRO *et al.*, 2013). ÁVILA *et al.* (2013), avaliando o efeito de inibidores da DPP-IV sobre a modulação do estresse oxidativo em modelo experimental de DM1, demonstraram que o dano oxidativo nos animais diabéticos foi superior em relação aos animais do grupo controle. Há evidências experimentais de que a geração de espécies reativas de oxigênio

(EROS) é elevada em ambos os tipos de diabetes, e que o aparecimento dessa doença está intimamente associado ao estresse oxidativo (ROSEN *et al.*, 2001; JOHANSEN *et al.*, 2005). Sabe-se que o estado hiperglicêmico é o maior responsável pelo aumento da produção de EROS no diabetes (HAMDEN *et al.*, 2008), e que esta superprodução de EROS gera um desequilíbrio no ambiente redox (ÁVILA *et al.*, 2013). Embora tenha sido demonstrado que a Vildagliptina foi capaz de modular o estresse oxidativo, o mesmo não ocorreu em relação à hiperglicemia induzida pelo diabetes (ÁVILA *et al.*, 2013). Sendo assim, existe ainda a necessidade em buscar terapias adicionais que pudessem promover um melhor controle glicêmico. Com o objetivo, então, de potencializar os efeitos do inibidor da DPP-IV, neste estudo foi associado ao tratamento farmacológico com Vildagliptina o composto flavonólico Quercetina.

## 2.5 Potencial Terapêutico da Quercetina no DM1

A Quercetina é o principal representante da subclasse flavonol da família dos flavonoides, e é amplamente estudado por seus vários efeitos biológicos. Este composto é encontrado em frutos, folhas de vegetais, chás, vinho tinto, dentre outros (**Figura 8**).



**Figura 8.** Fórmula estrutural da Quercetina (3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavone) (Fonte: BHELING *et al.*, 2004).

Entre os diferentes tipos de flavonóides presentes nas plantas, o flavonol quercetina é o mais abundante (CERMAK *et al.*, 1998). 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; PÁDUA *et al.* 2010). LOPEZ-REVUELTA *et al.* (2006), demonstraram que flavonoides possuem uma atividade antioxidante e uma função protetora no tratamento de doenças degenerativas mediadas pelo estresse oxidativo. Pesquisas mostraram que 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). 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). Resultado semelhante foi encontrado por JEONG *et al.*, 2012 que demonstraram a capacidade da Quercetina em melhorar a hiperglicemia em camundongos db/db diabéticos tipo 2.

Em pesquisa sobre a translocação do transportador 4 de glicose (GLUT4), XU M. *et al.*, comprovaram que a Quercetina é capaz de regular a translocação do GLUT4 mediados por insulina em cultura de células 3T3-L1 de adipócitos. Foi demonstrado que em condições basais a Quercetina inibiu a translocação do GLUT4, enquanto em condição inflamatória ela foi capaz de estimular tal translocação mediada por insulina (XU *et al.*, 2013). Em relação a apoptose e viabilidade celular, vários estudos já demonstraram 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 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 secretoras de insulina quanto em ilhotas pancreáticas de ratos, além de aumentar a viabilidade celular mesmo na presença da injúria oxidativa gerada pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Sendo assim, os inibidores da DPP-IV, como a Vildagliptina, além dos Flavonóides, como a Quercetina, podem trazer novas perspectivas para o tratamento do DM1.

## **CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS**

### **3.1 – Objetivo Geral**

Investigar o potencial neogênico da Vildagliptina (inibidor da DPP-IV) e o efeito da associação com a Quercetina (flavonóide) na modulação de parâmetros bioquímicos e preservação da histologia pancreática em ratas diabéticas tipo 1 induzidas por aloxano.

### **3.2 – Objetivos Específicos**

#### **3.2.1 – Avaliar o potencial neogênico da Vildagliptina em uma fase tardia do DM1**

Em ratas controle e diabéticas tratadas com Vildagliptina avaliar:

1. Parâmetro Biométrico:
  - Massa corporal
2. Parâmetros Bioquímicos:
  - Glicemia;
  - Insulinemia;
  - Perfil lipídico.
3. Parâmetros Histopatológicos:
  - Número de ilhotas pancreáticas;
  - Número de células beta pancreáticas;
  - Índice Homa% Beta.
4. Correlações entre:
  - Glicemia x Insulina;
  - Número de Células Beta x Homa% Beta;
  - Número de Células Beta x Insulina.

### **3.2.2 – Avaliar a associação da Quercetina e Vildagliptina na modulação de parâmetros bioquímicos e preservação da histologia pancreática no DM1**

Em ratas controle e diabéticas tratadas com Vildagliptina em associação com Quercetina avaliar:

1. Parâmetro Biométrico:
  - Massa Corporal
2. Parâmetros Bioquímicos:
  - Glicemia;
  - Insulinemia;
  - Perfil lipídico.
3. Parâmetros Histológicos:
  - Número de ilhotas pancreáticas;
  - Número de células beta pancreáticas;
  - Índice Homa% Beta.
4. Correlações entre:
  - Glicemia x Insulina;
  - Número de Células Beta x Homa% Beta;
  - Número de Células Beta x Insulina.

## CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – Animais

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem *Fischer*, com idade aproximada de 90 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 ração comercial para rato “*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), com número de protocolo 027/2011.

#### 4.1.1 – Delineamento Experimental do Protocolo 1 (Avaliação do Potencial Neogênico)

Foram utilizadas 32 ratas albinas da linhagem *Fischer*. Após a indução e confirmação do estado de diabetes, as ratas ficaram durante 30 dias recebendo apenas ração comercial e água “*ad libitum*”. Ao final dos 30 dias (fase tardia do diabetes tipo 1 experimental), as ratas foram submetidas ao tratamento farmacológico, via gavagem, por 30 dias consecutivos. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, a saber: Controle (C) (ração comercial para rato + 1mL de veículo via gavagem); Controle + suspensão de Vildagliptina (CV) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Vildagliptina via gavagem); Diabético (D) (ração comercial para rato + 1mL de veículo a gavagem); Diabético + suspensão de Vildagliptina (DV) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Vildagliptina via gavagem). Foram utilizados 8 animais por grupo experimental.

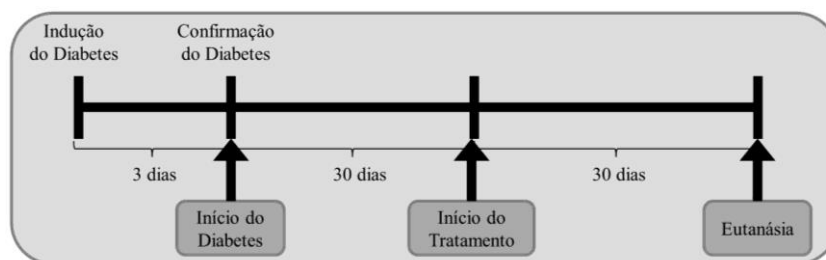


Figura 9. Linha temporal para o protocolo 1



#### 4.1.2 – Delineamento Experimental do Protocolo 2 (associação Vildagliptina e Quercetina)

Foram utilizadas 64 ratas albinas da linha *Fischer*. Após a indução e confirmação do estado de diabetes, as ratas foram submetidas ao tratamento medicamentoso, via gavagem, por 30 dias consecutivos. Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais: Controle (C) (ração comercial para rato + 1mL de veículo via gavagem); Controle + suspensão de Vildagliptina (CV) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Vildagliptina via gavagem); Controle + suspensão de Quercetina (CQ) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Quercetina via gavagem); Controle + suspensão de Quercetina + suspensão de Vildagliptina (CQV) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Quercetina + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Vildagliptina via gavagem); Diabético (D) (ração comercial para rato + 1mL de veículo via gavagem); Diabético + suspensão de Vildagliptina (DV) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Vildagliptina via gavagem); Diabético + suspensão de Quercetina (DQ) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Quercetina via gavagem); Diabético + suspensão de Quercetina + suspensão de Vildagliptina (DQV) (ração comercial para rato + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Vildagliptina + 1mL de suspensão de 5mg/Kg de Quercetina via gavagem). Foram utilizados 8 animais por grupo experimental.



**Figura 10.** Linha temporal para o protocolo 2

## 4.2 – Indução do Diabetes

Para indução do diabetes as ratas pertencentes aos grupos diabéticos receberam, após 8 horas de jejum, dose única de injeção intraperitoneal a 135mg/Kg de peso de Alozano (ALX) (Alloxan Monohydrate Sigma<sup>®</sup>), também conhecido como 2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina monoidratada dissolvida em 0,2mL 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 estado de diabetes, três dias após a indução os animais foram submetidos a uma avaliação dos níveis de glicose plasmática em jejum de 8 horas, empregando-se amostra de sangue coletada na 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 250 mg/dL (~13mmol/L) foram considerados diabéticos e selecionados para o experimento. Semanalmente foram coletadas gotas de sangue da cauda dos animais para análise da glicemia para fins de controle.

## 4.3 – Preparo dos Tratamentos

### 4.3.1 – Dispersão da Vildagliptina

A dispersão da Vildagliptina em ambos os delineamentos experimentais (protocolos 1 e 2) foi realizada a cada quatro dias na concentração de 5mg/Kg ( $v = 1\text{mL}$ ) (ÁVILA *et al.*, 2013) de peso corpóreo. O volume total da suspensão era calculado multiplicando o número de animais pelo número de dias de tratamento (4 dias). Os animais dos grupos tratados eram pesados no dia anterior à dissolução de forma a obterem médias de peso para o preparo da medicação (5mg/Kg de peso corpóreo). Inicialmente, duas suspensões eram preparadas separadamente. A primeira suspensão continha a quantidade, em gramas, de Vildagliptina referente à 5mg/Kg de peso corpóreo. O comprimido GALVUS de Vildagliptina era triturado com auxílio de um grau de porcelana e pistilo. O valor pesado de Vildagliptina era colocado em um erlenmeyer ao qual era adicionado o mesmo volume, em mL, de Tween 80. A segunda suspensão era composta por metilcelulose (76mg de metilcelulose para cada 400mg de

Vildagliptina), mesmo volume, em  $\mu\text{L}$ , de Tween 80 e quantidade suficiente de água destilada para completar o volume total da solução. As duas suspensões eram sonicadas, separadamente, em um aparelho de ultrassom durante 15 minutos. Após serem sonicadas, a segunda solução era mantida em um agitador magnético durante 15 minutos e posteriormente as duas suspensões eram misturadas e novamente sonicadas por 15 minutos. Para finalizar, a mistura final era agitada por 30 minutos, visando garantir a total dissolução do medicamento. O volume de 1mL dessa suspensão (aproximadamente 1mg de Vildagliptina) era administrada diariamente por via orogástrica (gavagem) para os animais pertencentes aos grupos tratados. Para os animais não tratados foi preparada uma suspensão contendo as mesmas substâncias, exceto Vildagliptina, seguindo o mesmo protocolo. Da mesma forma, o volume de 1ml dessa suspensão era administrada diariamente via gavagem aos animais não tratados.

#### **4.3.2 – Dispersão da Quercetina**

A dispersão da Quercetina utilizada no Protocolo 2 foi feita diariamente na concentração 5mg/Kg de peso corpóreo (WANG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2013). A quantidade de Quercetina pesada diariamente era calculada baseada na média de peso dos animais tratados multiplicado pelo número de animais. A dispersão da Quercetina era feita em solução de PBS(1:1), sendo que o volume de 1ml dessa suspensão era administrada via gavagem aos animais tratados.

#### **4.4 – Eutanásia e Coleta de Material Biológico**

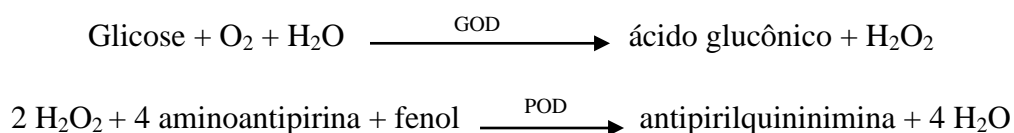
Ao fim de cada experimento, os animais foram deixados em jejum de oito horas, anestesiados por inalação com isoflurano, e a eutanásia procedeu-se por exsanguinação, sendo que o sangue foi coletado através de secção de vasos sanguíneos na região axilar. O sangue foi colhido em tubos de polipropileno com ou sem 15 $\mu\text{L}$  de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 10000g por 15 minutos e o plasma ou soro guardados sob refrigeração (-4°C) para as dosagens bioquímicas posteriores. Pâncreas, coração, rins e fígado foram extraídos e posteriormente pesados. Uma fração do pâncreas foi armazenada em formol para posterior confecção de lâminas para análise histológica. Os demais órgãos foram imediatamente armazenados a -80°C.

## 4.5 – Parâmetros Bioquímicos

### 4.5.1 – 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 absorbância 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  $\geq$  11.000 U/L; peroxidase  $\geq$  700 U/L; 4-aminoantipirina  $\geq$  290 µmol/L; fenol  $\geq$  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 foi utilizado como branco. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 505nm.

	<b>BRANCO</b>	<b>TESTE</b>	<b>PADRÃO</b>
<b>AMOSTRA</b>	-----	10 µL	-----
<b>PADRÃO (Nº2)</b>	-----	-----	10 µL
<b>REAGENTE 1</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL

A concentração de glicose nas amostras foi obtida dividindo a absorbância do teste pela absorbância 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:

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

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

#### **4.5.2 – Insulina**

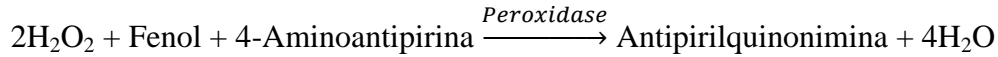
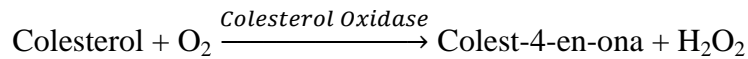
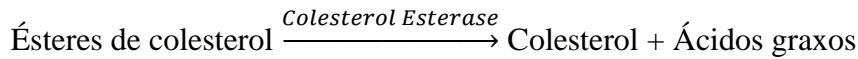
Para determinação da concentração de insulina sérica foi utilizado o kit comercial “*Rat/Mouse Insulin ELISA kit*” (Merck Millipore, USA). Este kit é sensível para determinação de insulina em ratos, utilizando-se o método de “ELISA sanduiche” (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*). Resumidamente, nesta técnica, o anticorpo (anti-insulina) foi imobilizado na microplaca. A amostra (10 µL) contendo a insulina foi adicionada, reagindo com o anticorpo anti-insulina imobilizado. Após a lavagem de poços, um segundo antianticorpo 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.

#### **4.5.3 – Perfil Lipídico**

##### **4.5.3.1 – Colesterol Total**

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

Ésteres de colesterol são hidrolisados enzimaticamente pela colesterol esterase a colesterol e ácidos graxos. O colesterol é oxidado pela colesterol oxidase liberando uma cetona e peróxido de hidrogênio. Este, através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, reage com 4-aminoantipirina e fenol formando uma antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja absorbância medida em 500nm é proporcional à concentração de colesterol na amostra. O kit fornece um padrão de colesterol com concentração de 200 mg/dL.



Resumidamente, em 3 tubos de polipropileno foram adicionados 10 µL de soro (teste) ou solução padrão de colesterol e 1000 µL de reagente 1 (tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥ 250 U/L, colesterol oxidase ≥ 250 U/L e peroxidase ≥ 1000 U/L). Os tubos foram misturados vigorosamente e incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Reagente 1 foi utilizado como branco. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 500nm.

	<b>BRANCO</b>	<b>TESTE</b>	<b>PADRÃO</b>
<b>AMOSTRA</b>	-----	10 µL	-----
<b>PADRÃO (Nº2)</b>	-----	-----	10 µL
<b>REAGENTE 1</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL

A concentração de colesterol nas amostras foi obtida dividindo a absorbância do teste pela absorbância do padrão e multiplicada por 200. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,026 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

Cálculos:

$$\text{Coolesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

#### 4.5.3.2 – Fração Colesterol HDL

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

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Inicialmente devem ser precipitadas VLDL e LDL. Em tubo de polipropileno foram adicionados 125 µL de soro e 125 µL de precipitante (ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L). Os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos, centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos para obter um sobrenadante límpido que foi pipetado imediatamente após a centrifugação. Em seguida, partindo do sobrenadante pipetado, fez-se a dosagem do colesterol HDL utilizando o reagente 1 do kit para dosagem de colesterol total e o padrão HDL (20 mg/dL), seguindo o protocolo de dosagem de colesterol total já descrito anteriormente.

A concentração de colesterol HDL nas amostras foi obtida dividindo a absorvância do teste pela absorvância do padrão e multiplicada por 40. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,026 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

#### Cálculos:

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 40$$

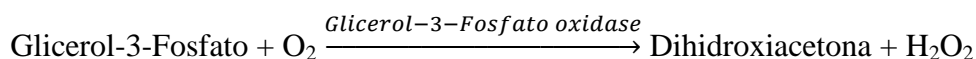
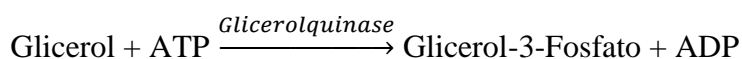
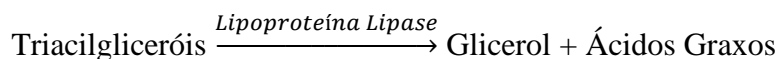
Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

#### 4.5.3.3 – Triglicerídeos

Os níveis séricos de triglicerídeos foram determinados por método colorimétrico utilizando Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxicetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. O

peróxido, através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, reage com 4-aminoantipirina e 4-clorofenol formando uma quinoneimina de cor vermelha, cuja absorbância medida em 505nm é proporcional à concentração de triglicérides na amostra.



Em 3 tubos de polipropileno foram adicionados 10 µL de soro (teste) ou solução padrão de triglicérides e 1000 µL de reagente 1 (tampão 50 mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,7 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipase da lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinase ≥ 1000 U/L; glicerolfosfato oxidase ≥ 1500 U/L; peroxidase ≥ 900 U/L e azida sódica 0,095%). Os tubos foram misturados vigorosamente e incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Reagente 1 foi utilizado como branco. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 505nm.

	<b>BRANCO</b>	<b>TESTE</b>	<b>PADRÃO</b>
<b>AMOSTRA</b>	-----	10 µL	-----
<b>PADRÃO (Nº2)</b>	-----	-----	10 µL
<b>REAGENTE 1</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL

A concentração de triglicérides nas amostras foi obtida dividindo a absorbância do teste pela absorbância do padrão e multiplicada por 200. Os valores obtidos em unidades convencionais (mg/dL) foram multiplicados por 0,0113 para transformá-los em unidades internacionais (mmol/L).

#### Cálculos:

$$\text{Triglicerídeos (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0113



## 4.6 – Parâmetros Histopatológicos

### 4.6.1 – Número de Ilhotas e Células Beta Pancreáticas

O pâncreas das ratas foi removido ao final de cada experimento e fixado em formol tamponado a 4%. 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, e com Tricômico de Gomori para diferenciar fenótipos de células  $\alpha$  e  $\beta$  pancreáticas. As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital DM5000, 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).

### 4.6.2 – Índice 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:

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

## 4.7 – Análise Estatística

Para os parâmetros bioquímicos e histológicos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Em todos os dados foi analisada a normalidade pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Dados que seguiram a distribuição normal foram analisados pelo teste-t de *Student*, enquanto aqueles que não seguiram a distribuição normal foram analisados pelo teste Mann-Whitney. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

Para a análise de correlação das variáveis a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados que seguiram a distribuição normal foram analisados pelo teste de Pearson, enquanto aqueles que não seguiram a distribuição normal foram analisados pelo teste de Spearman. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (San Diego, Califórnia, USA).

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

### 5.1 – Avaliar o potencial neogênico da Vildagliptina em uma fase tardia do DM1 (Protocolo 1)

#### ➤ Massa Corporal, Glicemia, Insulinemia e Perfil Lipídico

Para caracterizar o modelo de DM1 analisamos a massa corporal inicial e final, as glicemias inicial e final e o conteúdo de insulina. Além disso, foram analisados também o perfil lipídico com as dosagens de colesterol total, fração HDL-C, fração não-HDL e triglicérides (**Tabela 1**). Pela análise da tabela observamos que a massa corporal inicial dos animais foi semelhante, não havendo diferença estatística entre os grupos experimentais. Contudo, ao final do tratamento, os animais diabéticos não tratados e tratados apresentaram uma significativa redução da massa em comparação ao respectivo controle. A Vildagliptina não alterou significativamente a massa dos animais controles e diabéticos. Em relação à glicemia, os animais diabéticos apresentaram glicemias iniciais e finais estatisticamente maiores se comparadas ao grupo controle. Observou-se também que o tratamento com Vildagliptina não foi eficiente em reduzir a glicemia dos animais nos grupos diabéticos tratados. Animais com DM1 mostraram uma diminuição significativa nos níveis séricos de insulina em comparação com os animais do grupo controle. O tratamento com Vildagliptina aumentou significativamente os níveis de insulina nos animais diabéticos, mas esses valores ainda encontram-se abaixo dos níveis basais dos animais do grupo controle, sendo assim, o aumento da concentração de insulina em ratos diabéticos tratados com Vildagliptina não foi suficiente para induzir alterações na glicemia de jejum. Mensuradas as dosagens de perfil lipídico, os animais do grupo diabético apresentaram maior concentração de colesterol total, frações aterogênicas (LDL + VLDL) e triglicérides em relação ao grupo controle. O tratamento com Vildagliptina nos animais diabéticos diminuiu os níveis de colesterol total, sendo esta redução devido à diminuição da concentração de frações aterogênicas, já que não houve alteração na lipoproteína de alta densidade (HDL). O tratamento com Vildagliptina também reduziu significativamente os valores de triglicérides, tanto no grupo diabético quanto no grupo controle. Estes resultados sugerem que o tratamento com a Vildagliptina melhora o perfil lipídico em animais diabéticos.

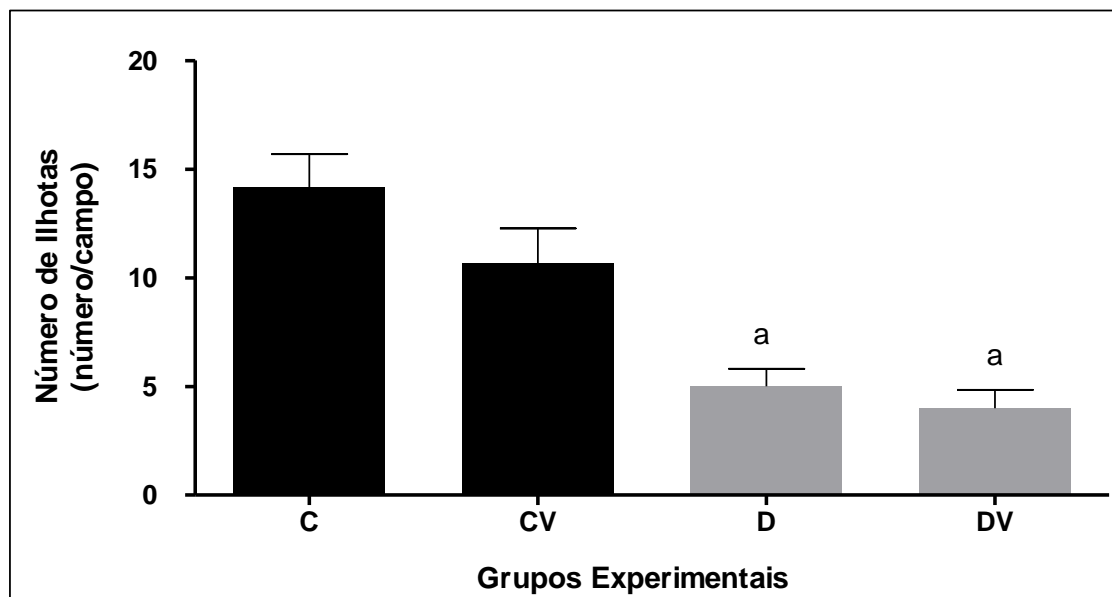
**TABELA 1. Avaliação da massa corporal, níveis de glicose sanguínea, insulina sérica, colesterol total, HDL-C, fração não-HDL e triglicérides**

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>C</b>	<b>CV</b>	<b>D</b>	<b>DV</b>
<b>Massa Inicial (g)</b>	201,0 ± 0,65	201,1 ± 0,91	199,5 ± 0,48	198,2 ± 1,12
<b>Massa Final (g)</b>	224,6 ± 2,99	223,9 ± 3,14	162,4 ± 6,60 <sup>a</sup>	165,7 ± 8,76 <sup>a</sup>
<b>Glicemia Inicial (mmol/L)</b>	5,5 ± 0,14	5,7 ± 0,28	23,5 ± 1,52 <sup>a</sup>	21,3 ± 2,34 <sup>a</sup>
<b>Glicemia Final (mmol/L)</b>	10,2 ± 0,58	10,6 ± 0,85	27,3 ± 0,52 <sup>a</sup>	26,9 ± 0,42 <sup>a</sup>
<b>Insulina (pmol/L)</b>	12,4 ± 1,23	14,4 ± 1,19	2,0 ± 0,47 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,48 <sup>a,b</sup>
<b>Colesterol Total (mmol/L)</b>	2,5 ± 0,07	2,2 ± 0,17	3,1 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,07 <sup>a,b</sup>
<b>HDL-C (mmol/L)</b>	1,9 ± 0,05	1,7 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,7 ± 0,12	1,6 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>Fração não-HDL (mmol/L)</b>	0,5 ± 0,05	0,3 ± 0,08	1,5 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>Triglicerídeos (mmol/L)</b>	0,9 ± 0,06	0,6 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,4 ± 0,69 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,53 <sup>a,b</sup>

C, controle (sem tratamento); CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D e C x DV (p < 0,05), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DV (p < 0,05), <sup>(c)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x CV (p < 0,05).

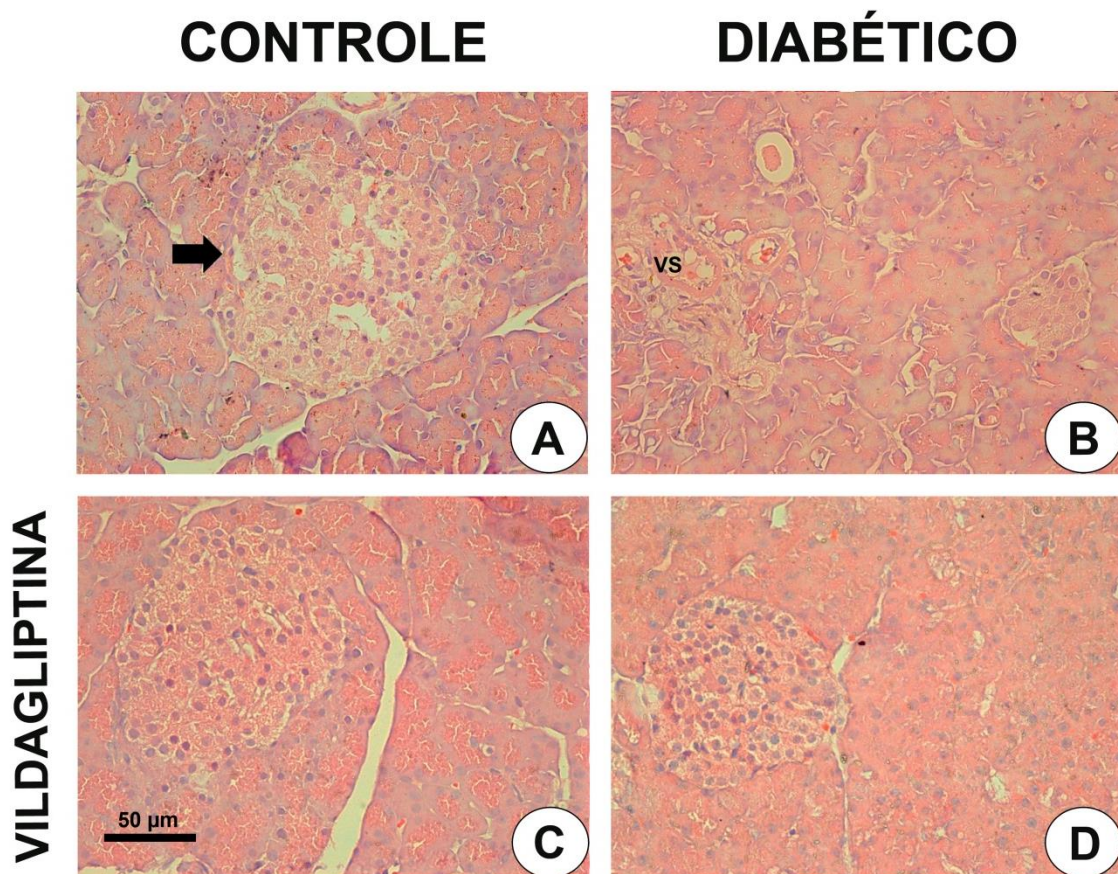
### ➤ Número de Ilhotas Pancreáticas

Os resultados da **Figura 11** mostram que os animais dos grupos diabéticos (D e DV) apresentaram uma redução significativa no número de ilhotas pancreáticas quando comparado aos animais do grupo controle (C). Nota-se também que o tratamento com Vildagliptina no grupo diabético (DV) não promoveu alteração no número de ilhotas quando comparado ao respectivo diabético não tratado (D).



**Figura 11.** Número de ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D e C x DV ( $p < 0,05$ ). C, controle (sem tratamento); CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina.

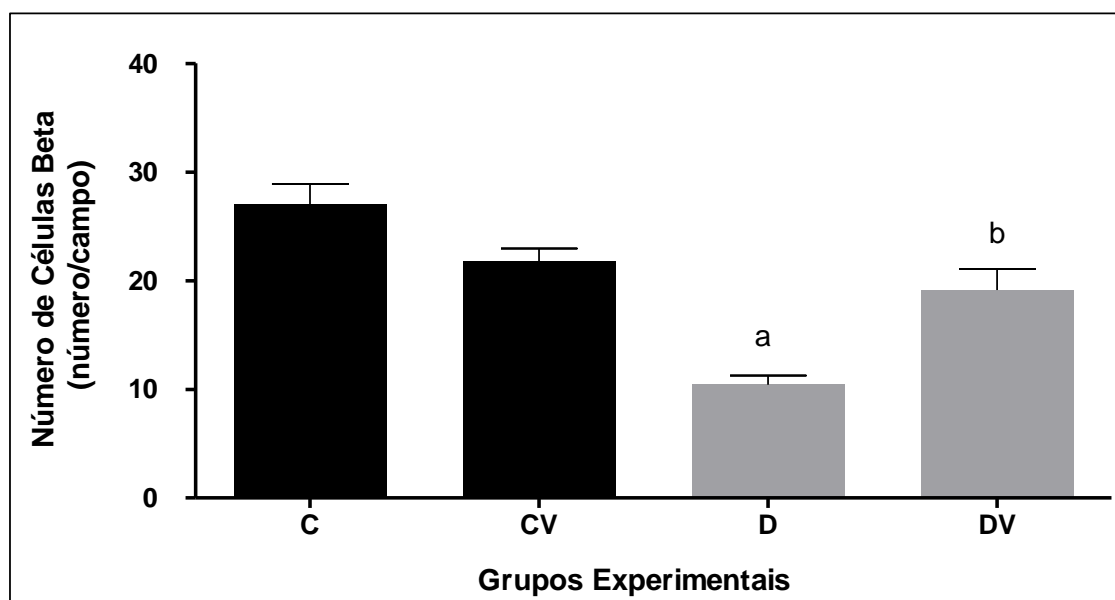
Histologicamente, na avaliação em microscopia óptica dos tecidos corados em H&E não foram reveladas alterações significativas na estrutura tecidual pancreática. O quadro histológico geral encontrado foi sempre compatível com a normalidade. Não foram encontradas áreas de morte celular (necrose ou células em apoptose), sinais inflamatórios, áreas degenerativas ou fibróticas em nenhum dos animais dos grupos experimentais, tanto nos componentes acinares quanto nas ilhotas pancreáticas (**Figura 12**).



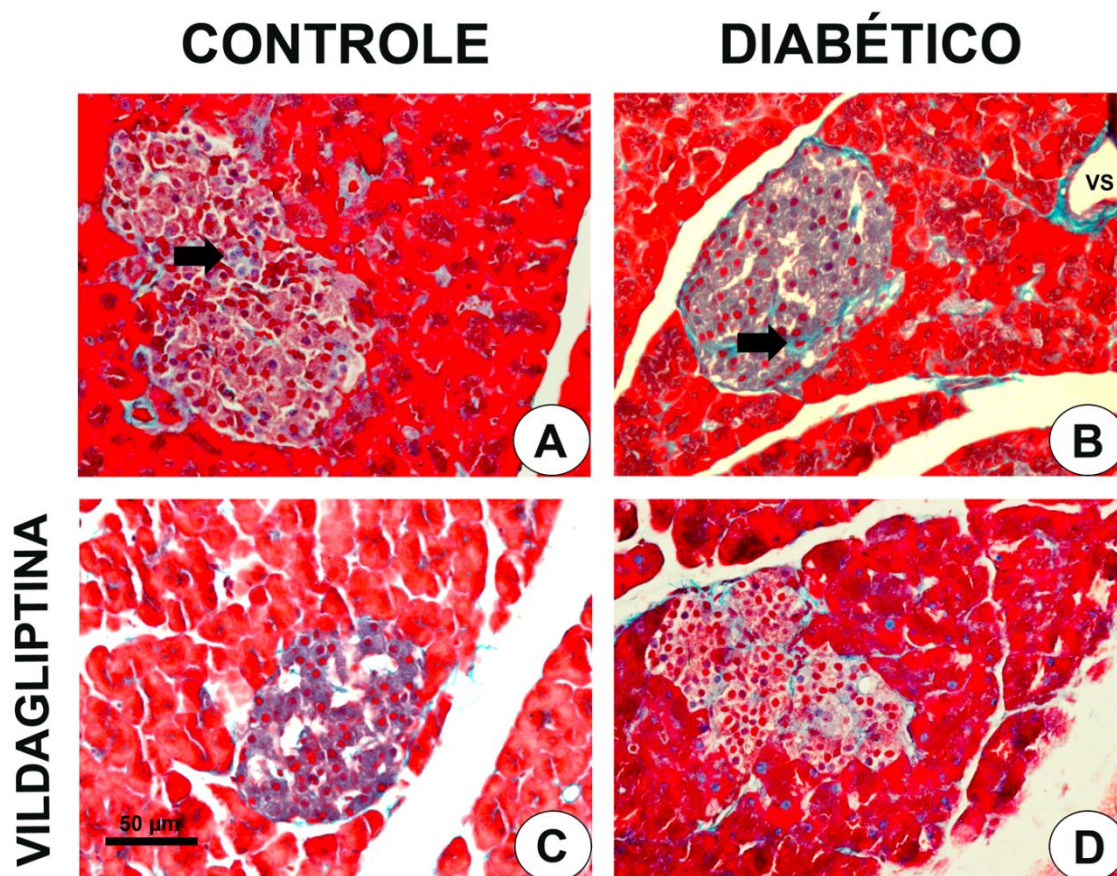
**Figura 12.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina, corados com Hematoxilina & Esosina (H&E). (A) Grupo controle não tratado. (B) Diabético não tratado. (C) Controle + 5mg/kg de Vildagliptina. (D) Diabético + 5mg/kg de Vildagliptina. Notar nos grupos aspecto histológico compatível com a normalidade. Barra = 50 micrômetros. VS = vaso sanguíneo. Seta indicando Ilhota Pancreática.

### ➤ Número de Células Beta Pancreáticas

A **Figura 13** representa uma análise quantitativa do número de células beta em ratos controles e diabéticos submetidos ou não ao tratamento com Vildagliptina. Nossos resultados mostram que os animais do grupo diabético (D) apresentaram uma redução significativa no número de células beta pancreáticas 60 dias após o início da doença em relação aos animais do grupo controle (C). O tratamento com Vildagliptina no grupo diabético (DV) foi eficiente em aumentar o número dessas células em comparação aos animais diabéticos não tratados (D). A representação histológica qualitativa destes resultados pode ser visto pela análise das fotomicrografias de pâncreas coradas com Tricômico de Gomori (**Figura 14**).



**Figura 13. Número de células beta pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina.** Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D ( $p < 0,05$ ), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DV ( $p < 0,05$ ). C, controle (sem tratamento); CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina.

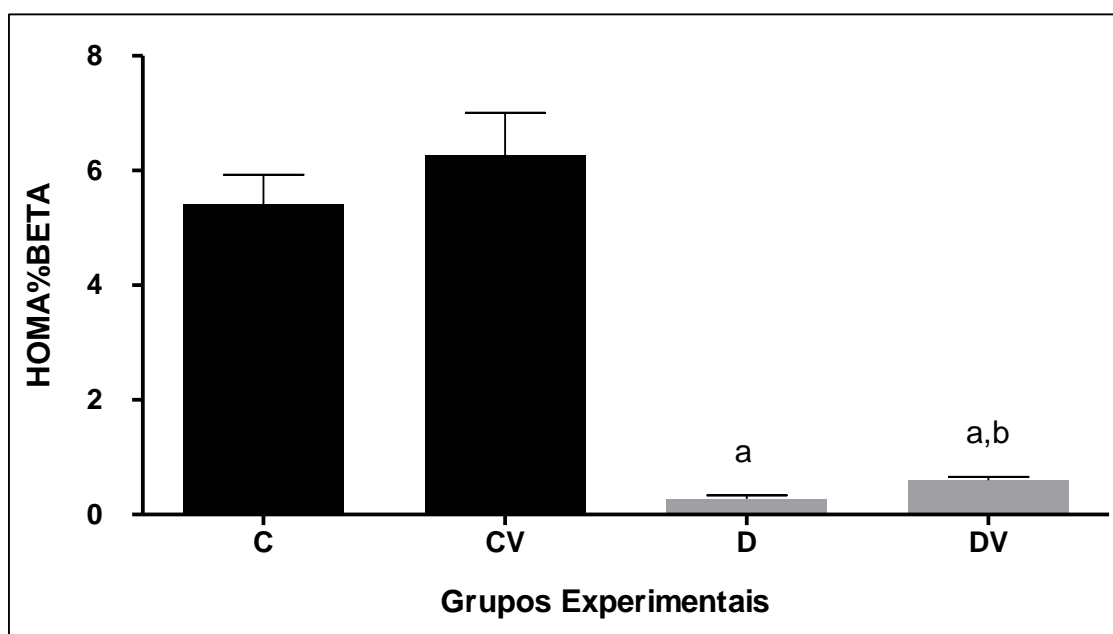


**Figura 14. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina, corados com Tricômico de Gomori. (A) Grupo controle não tratado. (B) Diabético não tratado. (C) Controle + 5mg/kg de Vildagliptina. (D) Diabético + 5mg/kg de Vildagliptina. Barra = 50 micrometros. VS = vaso sanguíneo. Seta indicando Célula Beta Pancreática.**



### ➤ Índice Homa%Beta

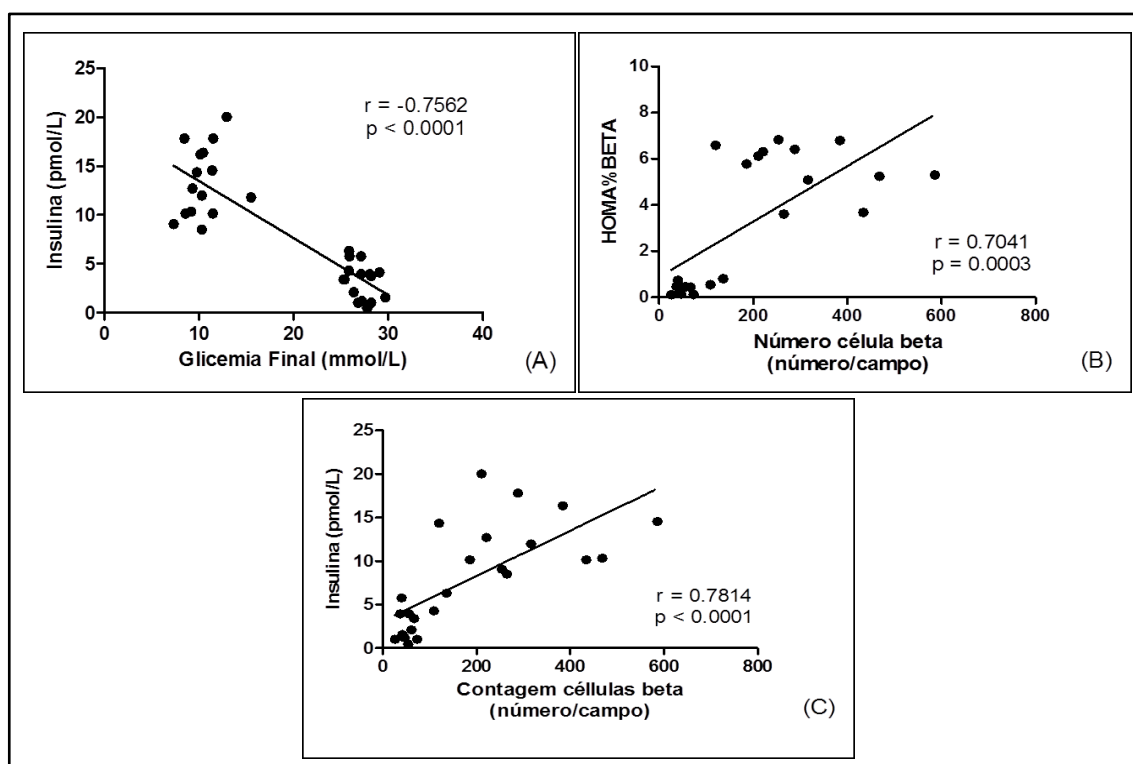
Com o objeto de avaliar a funcionalidade da célula beta, foi calculado o índice Homa%Beta (Homeostasis Model Assessment), que fornece uma medida indireta da capacidade funcional das células beta pancreáticas em secretar insulina. Os resultados da **Figura 15** mostram que o índice Homa%Beta dos animais dos grupos diabéticos (D e DV) foi menor quando comparado aos animais do grupo controle (C). A Vildagliptina foi capaz de melhorar o índice Homa%Beta nos animais diabéticos tratados (DV) em comparação com o grupo de diabéticos não tratados (D), sugerindo que o tratamento foi capaz de melhorar a função das células beta pancreáticas mesmo após o agravamento da doença.



**Figura 15. Índice Homa%Beta dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina.** Resultados expressos como média ± erro padrão (n=8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D e C x DV ( $p < 0,05$ ), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DV ( $p < 0,05$ ). C, controle (sem tratamento); CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina.

## ➤ Correlações

Foi avaliada a correlação entre duas variáveis através de gráficos de dispersão (**Figura 16**). A **Figura 16A** mostra que existe uma forte correlação negativa ( $r = -0,7562$ ), além de diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) entre glicemia final e insulina. Houve também uma correlação forte e positiva entre o número de células beta e Homa%Beta ( $r = 0,7041$ ) (**Figura 16B**) e entre o número de células beta e insulina ( $r = 0,7814$ ) (**Figura 16C**), além de diferenças estatísticas significativas em ambas as correlações, sugerindo que o aumento do número de células beta está relacionado tanto à melhora na função destas células quanto ao aumento na secreção de insulina.



**Figura 16. Gráficos de dispersão ilustrando a correlação.** (A) Glicemia Final (mmol/L) e Insulina (pmol/L), (B) Número de Células Beta (número/campo) e Homa% Beta e (C) Número de Células Beta (número/campo) e Insulina (pmol/L).

## 5.2 – Associação Vildagliptina e Quercetina em uma fase inicial do DM1 (Protocolo 2)

### ➤ Massa Corporal, Glicemia, Insulinemia e Perfil Lipídico

Assim como no Protocolo 1, para caracterizar o modelo de DM1 analisamos a massa corporal inicial e final, as glicemias inicial e final e o conteúdo de insulina. Além disso, foram analisados também o perfil lipídico com dosagens de colesterol total, fração HDL-C, fração não-HDL e triglicerídeos (**Tabela 2**). A análise da tabela permite inferir que a massa corporal inicial dos grupos experimentais foi semelhante, enquanto que ao final do tratamento a massa dos animais diabéticos foi menor à dos animais controles. Os tratamentos não alteraram significativamente a massa corporal dos animais controles e diabéticos. Em relação à glicemia, os animais diabéticos apresentaram glicemias inicial e final maiores quando comparados aos seus controles. Nenhum dos tratamentos foi eficaz em reduzir a glicemia nos grupos experimentais. Os níveis séricos de insulina mostraram que os animais diabéticos não tratados apresentaram menor insulinemia quando comparado aos animais do grupo controle. Foi observado, também, que o tratamento isolado com a Vildagliptina aumentou os níveis séricos de insulina nos animais diabéticos, enquanto os demais tratamentos não foram eficientes em aumentar a insulina sérica. A análise do perfil lipídico indica que os animais diabéticos não tratados apresentaram maiores níveis de frações aterogênicas (LDL + VLDL) e triglicérides em relação aos controles. Nos animais dos grupos controles pode-se perceber que o tratamento com as três formulações reduziu os níveis de frações não-HDL e ao mesmo tempo foi capaz de aumentar os níveis de HDL-C. Nos animais dos grupos diabéticos o tratamento com todas as três formulações foram eficazes em reduzir o colesterol total, enquanto que, somente os tratamentos com a Quercetina isolada ou em associação com Vildagliptina foram capazes de reduzir os níveis de frações aterogênicas e aumentar os níveis de HDL-C. Os resultados indicam que o tratamento associado de Quercetina e Vildagliptina melhorou o perfil lipídico em animais com DM1.

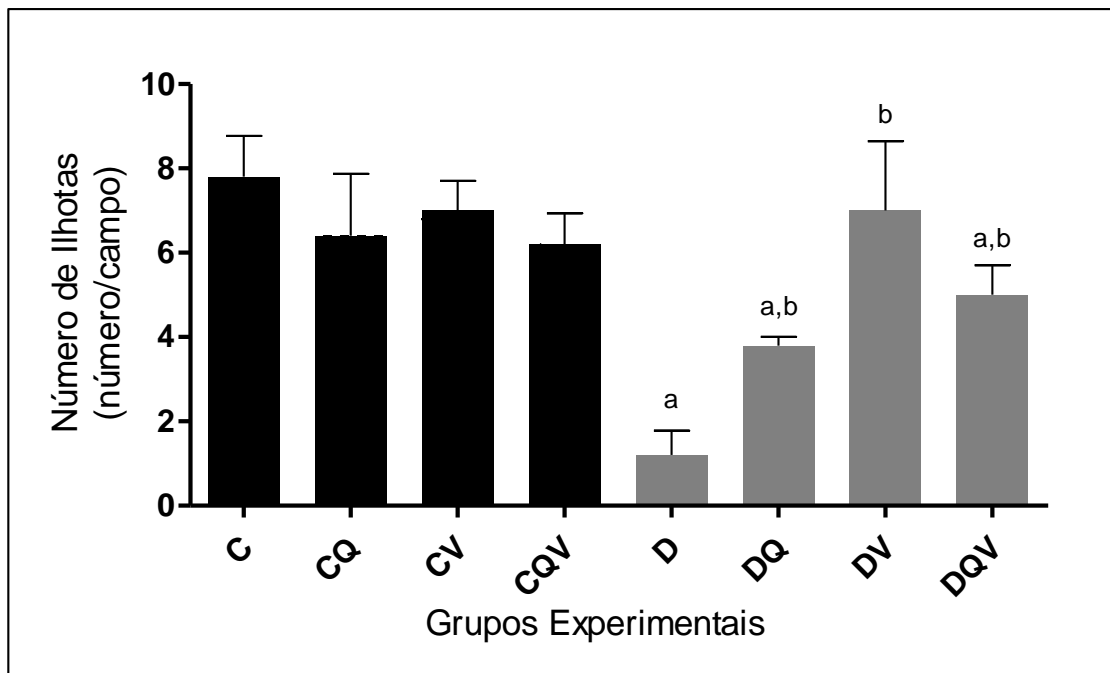
**TABELA 2. Avaliação da massa corporal, níveis de glicose sanguínea, insulina sérica, colesterol total, HDL-C, fração não-HDL e triglicérides.**

Grupos	C	CQ	CV	CQV	D	DQ	DV	DQV
<b>Experimentais</b>								
Massa Inicial (g)	198,7±1,15	200,7±1,60	200,1±0,85	199,9±2,31	202,7±0,64	199,8±1,07	201,3±0,96	199,2±1,14
Massa Final (g)	213,2 ±1,11	211,8 ±0,95	213,5 ±1,42	214,3 ±1,30	166,7±3,04 <sup>a</sup>	166,3±2,49 <sup>a</sup>	164,8±2,98 <sup>a</sup>	163,3±2,06 <sup>a</sup>
Glicemia Inicial (mmol/L)	5,2 ±0,13	5,6 ±0,15	5,0 ±0,14	5,1 ±0,15	20,1 ±1,79 <sup>a</sup>	21,7 ±1,61 <sup>a</sup>	25,8 ±1,27 <sup>a,b</sup>	29,2 ±0,84 <sup>a,b</sup>
Glicemia Final (mmol/L)	8,1 ±0,61	8,2 ±0,38	8,9 ±0,62	8,5 ±0,50	28,4 ±0,90 <sup>a</sup>	27,7 ±0,57 <sup>a</sup>	26,7 ±1,63 <sup>a</sup>	27,6 ±0,58 <sup>a</sup>
Insulina (pmol/L)	9,1 ±0,70	7,3 ±0,62	5,15 ±0,94 <sup>c</sup>	7,1 ±1,58	1,5 ±0,47 <sup>a</sup>	2,2 ±0,12 <sup>a</sup>	3,6 ±0,70 <sup>a,b</sup>	1,9 ±0,34 <sup>a</sup>
Colesterol Total (mmol/L)	1,8 ±0,10	2,0 ±0,08	1,7 ±0,05	1,7 ±0,06	2,0 ±0,06	1,7 ±0,04 <sup>b</sup>	1,7 ±0,05 <sup>b</sup>	1,7 ±0,05 <sup>b</sup>
HDL-C (mmol/L)	1,4 ±0,08	1,7 ±0,08 <sup>c</sup>	1,6 ±0,04 <sup>c</sup>	1,6 ±0,07 <sup>c</sup>	0,9 ±0,06 <sup>a</sup>	1,3 ±0,05 <sup>b</sup>	1,0 ±0,08	1,2 ±0,05 <sup>b</sup>
Fração não-HDL (mmol/L)	0,6 ±0,10	0,2 ±0,04 <sup>c</sup>	0,1 ±0,01 <sup>c</sup>	0,1 ±0,02 <sup>c</sup>	1,0 ±0,10 <sup>a</sup>	0,4 ±0,07 <sup>b</sup>	0,7 ±0,10	0,5 ±0,05 <sup>b</sup>
Triglicérides (mmol/L)	0,7 ±0,07	0,7 ±0,05	0,8 ±0,09	0,6 ±0,06	1,4 ±0,21 <sup>a</sup>	2,6 ±0,56 <sup>a</sup>	2,2 ±0,58 <sup>a</sup>	3,3 ±0,35 <sup>a,b</sup>

C, controle (sem tratamento); CQ, controle + 5mg/kg de Quercetina; CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; CQV, controle + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DQ, diabético + 5mg/kg de Quercetina; DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina; DQV, diabético + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D, C x DQ, C x DV, C x DQV (p < 0,05), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DQ, D x DV, D x DQV (p < 0,05), <sup>(c)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x CQ, C x CV, C x CQV (p < 0,05) <sup>(d)</sup>.

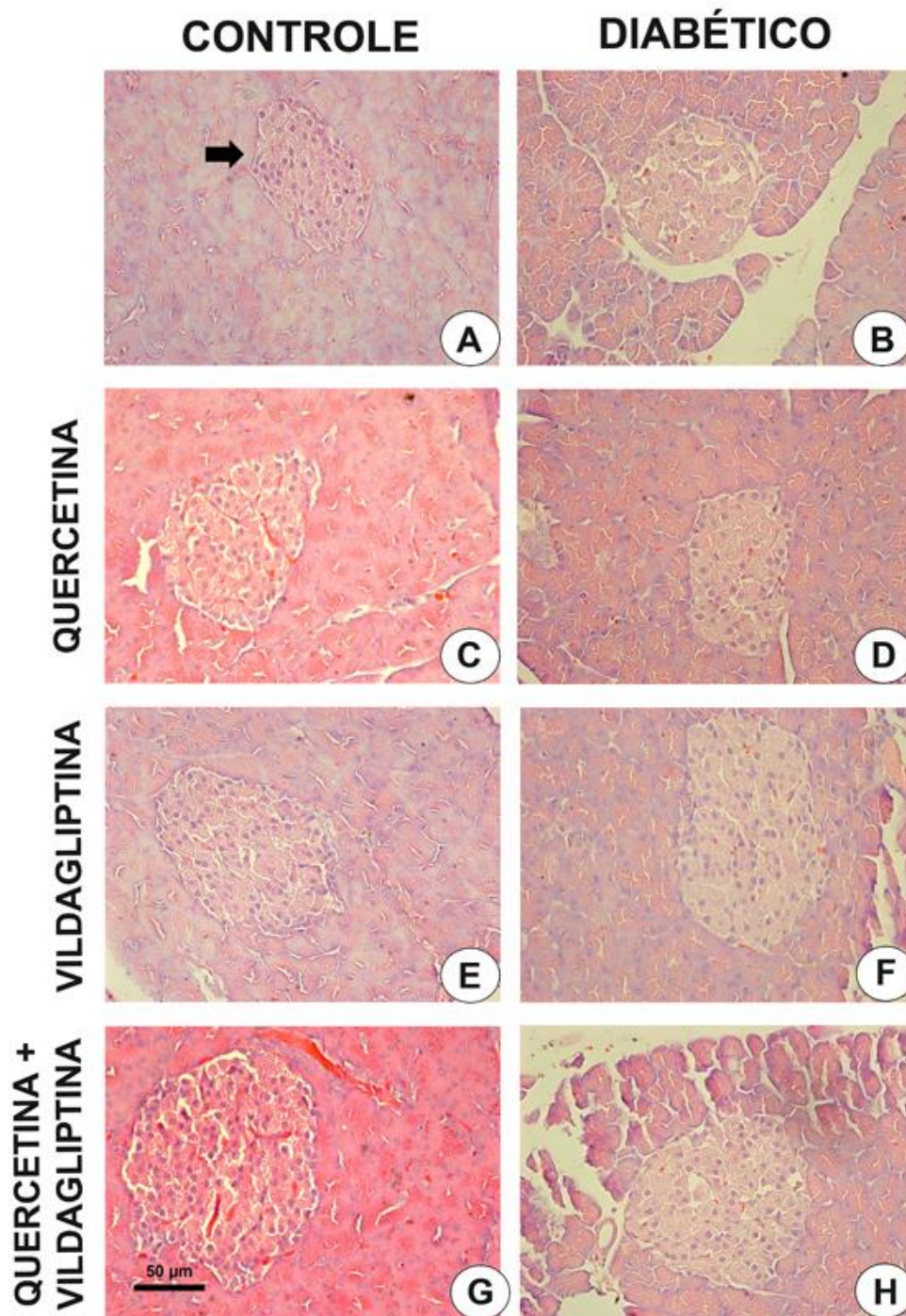
### ➤ Número de Ilhotas Pancreáticas

Os resultados da **Figura 17** mostram que os animais do grupo diabético não tratado (D) apresentaram uma redução significativa no número de ilhotas pancreáticas quando comparado ao do grupo controle (C). Nota-se também que os tratamentos isolados, com Quercetina e Vildagliptina, e a associação entre Quercetina e Vildagliptina promoveram um aumento no número de ilhotas nos animais com DM1.



**Figura 17. Número de ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação.** Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D, C x DQ, C x DV, C x DQV ( $p < 0,05$ ), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DQ, D x DV, D x DQV ( $p < 0,05$ ). C, controle (sem tratamento); CQ, controle + 5mg/kg de Quercetina; CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; CQV, controle + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DQ, diabético + 5mg/kg de Quercetina; DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina; DQV, diabético + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina.

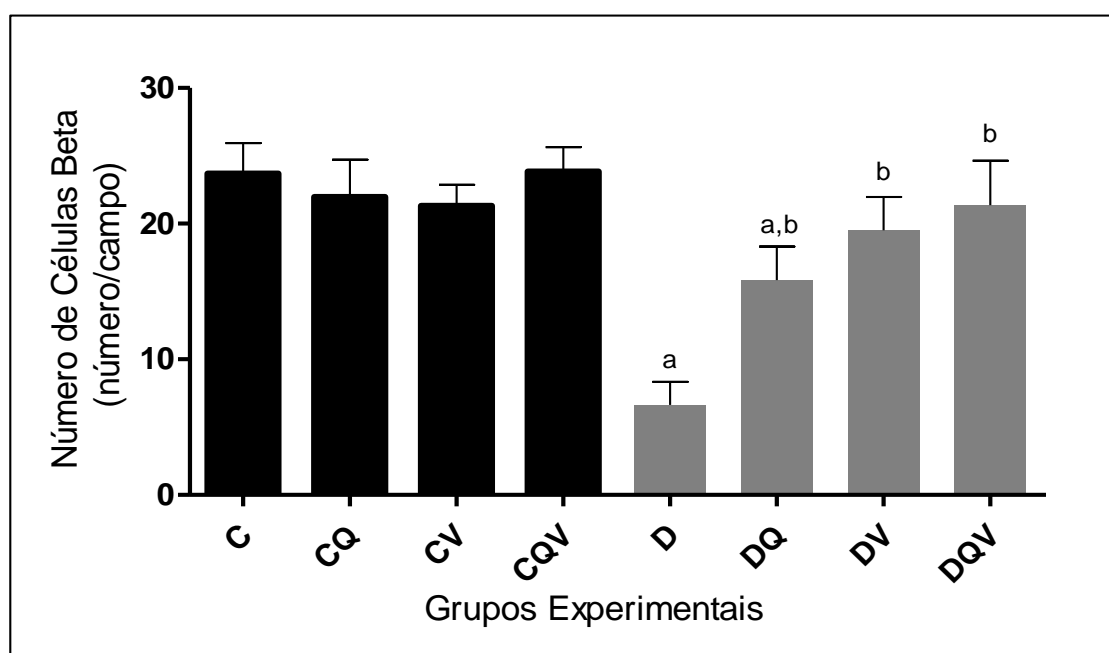
Histologicamente, na avaliação em microscopia óptica dos tecidos corados em H&E não foram reveladas alterações significativas na estrutura tecidual pancreática. O quadro histológico geral encontrado foi sempre compatível com a normalidade. Não foram encontradas áreas de morte celular (necrose ou apoptose), sinais inflamatórios, áreas degenerativas ou fibróticas em nenhum dos animais dos grupos experimentais, tanto nos componentes acinares quanto nas ilhotas pancreáticas (**Figura 18**).



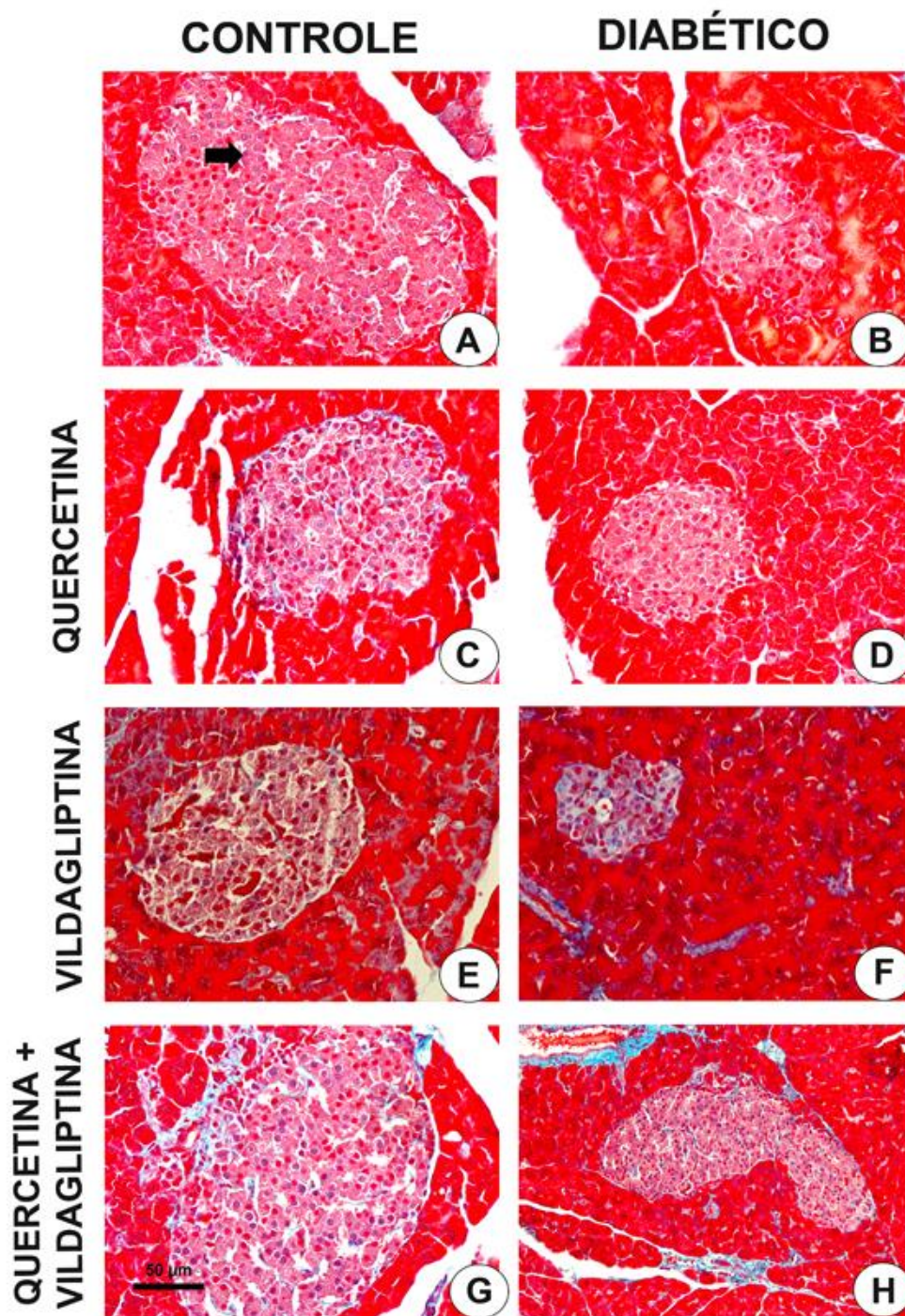
**Figura 18.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação, corados com H&E. (A) Grupo controle não tratado. (B) Diabético não tratado. (C) Controle + 5mg/kg de Quercetina. (D) Diabético + 5mg/kg de Quercetina. (E) Controle + 5mg/kg de Quercetina. (F) Diabético + 5mg/kg de Vildagliptina. (G) Controle + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina. (H) Diabético + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina. Notar em ambos os grupos aspecto histológico compatível com a normalidade. Barra = 50 micrômetros. VS = vaso sanguíneo. Seta indicando Ilhota Pancreática.

### ➤ Número de Células Beta Pancreáticas

A visualização da **Figura 19** permite inferir que os animais do grupo diabético (D) mostraram uma redução significativa no número de células beta pancreáticas após o início da doença em relação aos animais do grupo controle (C). Os tratamentos isolados com Vildagliptina e Quercetina, assim como a associação entre elas, foram eficientes em aumentar o número de células beta nos animais com DM1 em comparação aos animais diabéticos não tratados (D). A representação qualitativa da contagem de células beta pancreáticas pode ser comprovada através das fotomicrografias representativas da marcação celular com Tricômico de Gomori (**Figura 20**).



**Figura 19. Número de células beta pancreáticas dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação.** Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D, C x DQ, C x DV, C x DQV ( $p < 0,05$ ), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DQ, D x DV, D x DQV ( $p < 0,05$ ). C, controle (sem tratamento); CQ, controle + 5mg/kg de Quercetina; CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; CQV, controle + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DQ, diabético + 5mg/kg de Quercetina; DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina; DQV, diabético + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina.

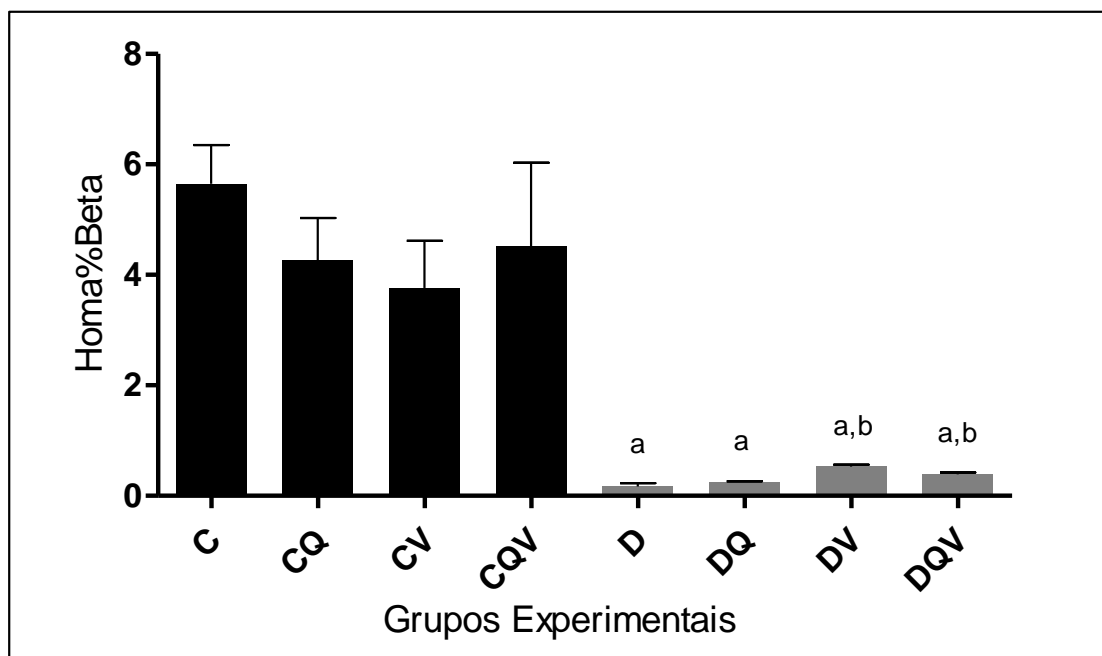


**Figura 20.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do pâncreas de animais diabéticos e não diabéticos tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação, coradas com Tricômico de Gomori. (A) Grupo controle não tratado. (B) Diabético não tratado. (C) Controle + 5mg/kg de Quercetina. (D) Diabético + 5mg/kg de Quercetina. (E) Controle + 5mg/kg de Quercetina. (F) Diabético + 5mg/kg de Vildagliptina. (G) Controle + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina. (H) Diabético + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina. Barra = 50 micrometros. VS = vaso sanguíneo. Seta indicando Célula Beta Pancreática.



### ➤ Índice Homa%Beta

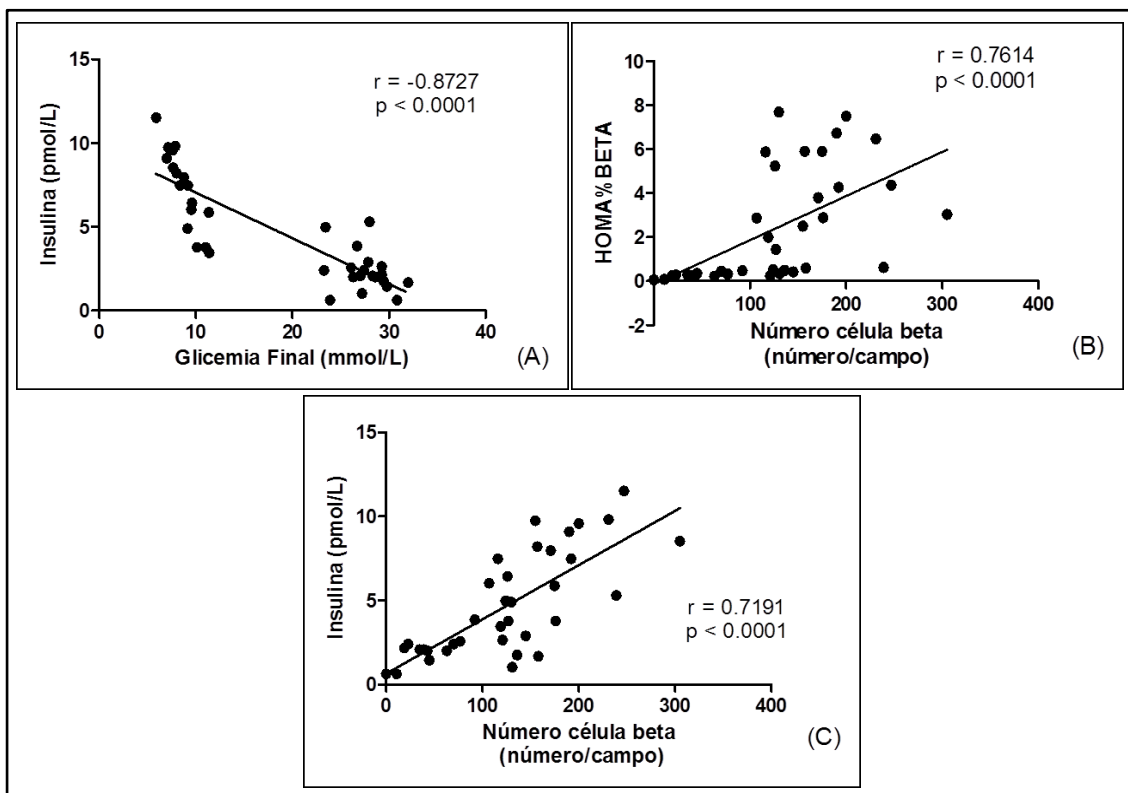
A avaliação da funcionalidade da célula beta (Homa%Beta) demonstrada na **Figura 21** mostra que o índice Homa%Beta dos animais dos grupos diabéticos foi menor quando comparado aos animais do grupo controle (C). O tratamento isolado com Vildagliptina, assim como a associação entre Quercetina e Vildagliptina foram capazes de melhorar o índice Homa%Beta nos animais diabéticos em comparação com o grupo de diabéticos não tratados (D). Tais resultados sugerem que a associação de ambos os tratamentos foi capaz de melhorar a função das células beta pancreáticas em animais com DM1.



**Figura 21. Índice Homa%Beta dos grupos experimentais tratados ou não com Vildagliptina e Quercetina, isoladas ou em associação.** Resultados expressos como média ± erro padrão (n=8). <sup>(a)</sup> indica diferença estatística significativa entre C x D, C x DQ, C x DV, C x DQV ( $p < 0,05$ ), <sup>(b)</sup> indica diferença estatística significativa entre D x DQ, D x DV, D x DQV ( $p < 0,05$ ). C, controle (sem tratamento); CQ, controle + 5mg/kg de Quercetina; CV, controle + 5mg/kg de Vildagliptina; CQV, controle + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina; D, diabético (sem tratamento); DQ, diabético + 5mg/kg de Quercetina; DV, diabético + 5mg/kg de Vildagliptina; DQV, diabético + 5mg/kg de Quercetina + 5mg/kg de Vildagliptina.

## ➤ Correlações

Foi avaliada também a correlação entre duas variáveis através do gráfico de dispersão, como mostrado na **Figura 22**. A análise da **Figura 22A** mostra que existe uma forte correlação negativa ( $r = -0,8727$ ) entre glicemia final e insulina. Houve também uma correlação forte e positiva entre o número de células beta e Homa%Beta ( $r = 0,7614$ ) (**Figura 22B**) e entre o número de células beta e insulina ( $r = 0,7191$ ) (**Figura 22C**). Todas as correlações apresentaram diferenças estatísticas significativas. Tais resultados sugerem que o aumento do número de células beta está relacionado tanto à melhora na função destas células quanto ao aumento na secreção de insulina.



**Figura 22. Gráficos de dispersão ilustrando a correlação.** (A) Glicemia Final (mmol/L) e Insulina (pmol/L), (B) Número de Células Beta (número/campo) e Homa%Beta e (C) Número de Células Beta (número/campo) e Insulina (pmol/L).

## CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O Diabetes *mellitus* é uma doença que apresenta origem multifatorial. Mecanismos bioquímicos e patológicos estão associados à hiperglicemia crônica e a redução da massa de células beta pancreáticas apresenta um papel central nesta desordem. As células beta regulam a captação de glicose do sangue pelos tecidos periféricos, tais como fígado, músculos e tecido adiposo. Sendo assim, essas células desempenham um papel importante no controle da glicemia e do balanço energético. Esses fatos levam a crer que distúrbios na função destas células podem prejudicar a homeostase da glicose e levar ao agravamento das complicações crônicas características do DM1 (JASTROCH *et al.*, 2010).

Recentemente, a relação entre diabetes e o uso de medicamentos inibidores da DPP-IV tem sido o foco de muitos estudos, uma vez que vários dos danos ocasionados pelo quadro de diabetes têm sido melhorados pelo uso desta classe medicamentosa (HAMAMOTO *et al.*, 2013).

Nesse contexto, diversos estudos utilizando diferentes tipos de inibidores da DPP-IV tem demonstrado sua atividade moduladora sobre parâmetros bioquímicos (HAMAMOTO *et al.*, 2013), além da capacidade protetora da massa de células beta pancreáticas (JELSING J. *et al.*, 2012) no modelo de DM.

Como primeiro passo, baseado em estudos anteriores realizados por ÁVILA *et al.*, 2013 onde foi demonstrado que o inibidor da DPP-IV, Vildagliptina, foi eficiente em preservar ilhotas e células beta pancreáticas em animais com DM1, um dos objetivos deste estudo foi avaliar se o mecanismo responsável pela preservação das células pancreáticas era baseado na proliferação celular, denominado neste estudo de efeito neogênico.

Para avaliar o potencial neogênico da Vildagliptina em uma fase tardia do DM1 (**Protocolo 1**), inicialmente foram mensurados a massa corporal, glicemia, insulinemia e perfil lipídico em ratas controle e diabéticas.

Para conseguirmos animais diabéticos utilizamos aloxano como agente diabetogênico. O aloxano é uma substância que possui, comprovadamente, ação seletiva e destrutiva sobre as células beta pancreáticas e que induz ao DM em animais experimentais (BOWMAN *et al.*, 1984). Alguns estudos demonstraram que a formação

de radicais superóxido e hidroxila, induzidos por aloxano, é responsável pela citotoxicidade desse composto (AHRÉN *et al.*, 1995).

Como esperado, as ratas diabéticas apresentaram uma elevada perda de massa corporal ao final do tratamento. Essa perda de massa é uma característica associada ao diabetes devido a um aumento do catabolismo muscular (RAVI *et al.*, 2004). Os animais diabéticos tratados com 5mg/kg de Vildagliptina (DV) tiveram uma redução de peso que foi similar à do grupo diabético não tratado (D), ou seja, o tratamento com Vildagliptina não alterou a perda de peso ocorrida no diabetes (**Tabela 1**). Esses resultados também foram encontrados por outros autores que utilizaram em seus estudos experimentais vários tipos de inibidores de DPP-IV. ANDUKURI *et al.*, em um estudo em que fizeram uso da Alogliptina, revelaram que este fármaco não foi eficiente em alterar o peso dos animais tratados. Esses mesmos autores relataram que só observaram ganho de peso no grupo tratado quando essa medicação foi utilizada em combinação com metformina (ANDUKURI *et al.*, 2009).

O diabetes induzido por aloxano também promoveu uma redução significativa nos níveis de insulina, que foi acompanhada pelo aumento significativo nos níveis de glicose sérica, perfil característico de um estado diabético. Vários pesquisadores utilizaram inibidores da DPP-IV na tentativa de verificar sua atividade na secreção de insulina e conseqüente efeito na glicemia no modelo experimental de DM1. ANSARULLAH *et al.*, 2013 demonstraram que o tratamento com Sitagliptina foi capaz de alcançar a normoglicemia em animais diabéticos. Entretanto, ÁVILA *et al.*, 2013 verificaram que o tratamento durante 30 dias com Vildagliptina não foi eficiente em reduzir o quadro de hiperglicemia, embora o conteúdo de insulina tenha aumentado significativamente. Sendo assim, a utilização de inibidores da DPP-IV como agente hipoglicemiante no DM1 é divergente e em nosso modelo experimental, embora o tratamento com Vildagliptina tenha aumentado a insulinemia mesmo quando o diabetes se apresentava em uma fase crônica (60 dias), este aumento não foi suficiente para promover um retorno à normoglicemia nos animais diabéticos tratados (DV) (**Tabela 1**).

Em relação ao perfil lipídico, os animais pertencentes ao grupo diabético apresentaram maior concentração de colesterol total, assim como das frações aterogênicas (LDL + VLDL) e de triglicérides quando comparadas aos animais do grupo controle. O tratamento com a Vildagliptina foi eficiente em reduzir os níveis de colesterol total nos animais diabéticos, sendo esta redução devido à diminuição na

concentração das frações aterogênicas, já que não houve alteração na fração HDL-C. O tratamento também reduziu significativamente os níveis séricos de triglicerídeos nos animais com DM1. Estes resultados sugerem que o tratamento com Vildagliptina durante 30 dias melhora o perfil lipídico em animais diabéticos crônicos (**Tabela 1**). MAEDA *et al.*, 2012 também encontraram um aumento nos níveis de colesterol total em ratos com DM1, porém após 2 semanas de tratamento com Vildagliptina não foi relatada redução significativa deste parâmetro. Também não foram encontradas alterações significativas nos níveis de triglicerídeos e na fração HDL-C, seja nos animais diabéticos ou nos animais diabéticos tratados com Vildagliptina. Diferenças metodológicas no tempo de tratamento (15 dias versus 30 dias) podem justificar a controversa dos resultados.

Outro parâmetro que se objetivou avaliar foi quanto à capacidade da Vildagliptina em aumentar a massa de células pancreáticas em animais diabéticos crônicos. É sabido que o aumento dos níveis endógenos pós-prandiais de GLP-1 via inibição da DPP-IV expande a massa de células pancreáticas através de alguns mecanismos (BAGGIO *et al.*, 2006), porém, embora o GLP-1 exerça efeitos positivos na preservação de células pancreáticas, sua curta meia-vida na circulação limita o potencial do mesmo como agente terapêutico. Sendo assim, os inibidores de DPP-IV foram introduzidos como medida terapêutica para o tratamento do DM2 por possuírem a capacidade de aumentar os níveis circulantes desses hormônios ativos, podendo potencializar e prolongar seus efeitos positivos na secreção de insulina, homeostase de glicose e preservação de células pancreáticas (KIM *et al.*, 2008). São restritos os estudos que avaliaram o potencial dos inibidores da DPP-IV no modelo de DM1, e considerando a gama de funções já estabelecidas do GLP-1 é relevante verificar o potencial terapêutico dos inibidores da DPP-IV no DM1.

Através da análise histológica do tecido pancreático avaliamos, inicialmente, se a Vildagliptina promoveria alguma alteração numérica nas ilhotas pancreáticas (**Figura 11**). A análise dos resultados revelou que os animais do grupo diabético (D) apresentaram uma redução significativa no número de ilhotas pancreáticas em comparação aos animais do grupo controle (C). Uma vez que foi implantado o tratamento com Vildagliptina, esperava-se haver um aumento na massa de ilhotas pancreáticas, como visto por ÁVILA *et al.*, 2013 onde o tratamento com este inibidor restaurou o número de ilhotas pancreáticas nos animais diabéticos para níveis próximos aos dos animais do grupo controle. No entanto, neste estudo, o tratamento com a

Vildagliptina não alterou este parâmetro nos animais com DM1. Entretanto, vale ressaltar que no estudo de ÁVILA *et al.*, 2013 o tratamento com Vildagliptina foi realizado logo após a confirmação do diabetes, ou seja, em uma fase inicial da doença, ao contrário do nosso estudo, em que o tratamento iniciou-se após a cronificação da doença. Resultado semelhante ao de ÁVILA *et al* foi encontrado por KIM *et al.* quando foi testado o inibidor de DPP-IV Sitagliptina em animais diabéticos. O objetivo foi verificar a sua capacidade em preservar e/ou estimular a sobrevivência de ilhotas pancreáticas que seriam transplantadas para animais com DM1, e o resultado relatado foi de que o tratamento com este fármaco resultou no prolongamento da sobrevivência do enxerto de ilhotas, antes e após o transplante, o que sugeriu que a inibição da DPP-IV poderia preservar ilhotas *in vivo* e potencialmente prolongar a sua sobrevivência pós-transplante (KIM *et al.*, 2009).

A análise qualitativa da histologia pancreática corada com H&E nos revela que, macroscopicamente, não houve nenhuma alteração morfológica das ilhotas. Microscopicamente, também não se notaram modificações na parte exócrina, ou seja, não há sinais de inflamação, necrose ou demais alterações degenerativas (**Figura 12**).

Nossos resultados quanto à preservação do número de ilhotas pancreáticas nos animais diabéticos não foram compatíveis aos dados da literatura, e isto se deve provavelmente ao fato de que este é o primeiro estudo que avalia o efeito da Vildagliptina em um modelo de diabetes tipo 1 crônico, onde provavelmente já houve a exaustão das células beta. Nosso próximo passo foi avaliar as populações celulares dentro das ilhotas, já que há um interesse ativo em determinar se o tratamento com inibidores de DPP-IV poderia aumentar a massa de células beta (BAGGIO *et al.*, 2006). A análise histológica proporcionada pela coloração com Tricômico de Gomori permitiu quantificar o número de células beta pancreáticas presente nos grupos experimentais. Os resultados indicaram que os animais do grupo diabético (D) apresentaram menor população de células beta em relação aos animais do grupo controle (C), assim como ocorrido na massa de ilhotas pancreáticas. Os resultados quantitativos do efeito da Vildagliptina sobre o número de células beta revelaram que, apesar do número de ilhotas após o tratamento não ter aumentado, houve aumento significativo na população de células beta pancreáticas nos animais diabéticos tratados (DV) em relação ao grupo diabético não tratado (D) (**Figura 13**). As fotomicrografias representativas de cortes histológicos de pâncreas, coradas com Tricômico de Gomori, permite visualizar a população de células beta pancreáticas nos grupos experimentais (**Figura 14**).

LOTFY *et al.* também verificaram que a administração de Sitagliptina conduziu a aumentos significativos no número de células beta nas ilhotas de Langerhans, resultando numa melhora tanto na massa de células beta como na taxa de células beta/células alfa (LOTFY *et al.*, 2011). TAKEDA *et al.* mostraram ainda que o tratamento com Sitagliptina reduziu o número de células beta apoptóticas em ratos STZ-induzidos (TAKEDA *et al.*, 2012). ISHIBASHI *et al.* (2013), estudou o efeito do tratamento, em longo prazo (6 semanas), com Vildagliptina associado a um inibidor de alfa glicosidase (Miglitol) sobre a função das células beta pancreáticas em camundongos. Foi revelado que a combinação medicamentosa não alterou a massa de células beta, porém foi capaz de preservar estruturas membranares importantes destas células. LI *et al.* (2013), também avaliaram a atividade de um inibidor da DPP-IV, porém em associação com o exercício físico em camundongos pré-diabéticos, durante 8 semanas. Foi observado que o tratamento medicamentoso associado ao exercício manteve a morfologia, funcionalidade e aumentou o número de células beta, além de atrasar o início do diabetes.

Ainda visando estudar mais profundamente a influência dos inibidores da DPP-IV na funcionalidade/proliferação das células beta, HAMAMOTO *et al.* (2013), demonstraram que a Vildagliptina aumentou a expressão de genes envolvidos na diferenciação/proliferação de células pancreáticas, aumentou também a expressão de genes anti-apoptóticos ao mesmo tempo que reduziu a expressão de genes apoptóticos, em camundongos diabéticos. ANSARULLAH *et al.* trataram camundongos diabéticos, induzidos com STZ, com Sitagliptina e/ou um agonista de GPR119 durante 7 semanas. O grupo demonstrou que o tratamento associativo aumentou significativamente o estímulo para a replicação de células alfa e beta pancreáticas, a massa de células beta, além de ter induzido neogênese de células beta (ANSARULLAH *et al.*, 2013)

ÁVILA *et al.* quando avaliaram o efeito do tratamento com Vildagliptina na histologia pancreática sugeriram que este medicamento tem um efeito positivo sobre a preservação das células beta pancreáticas, quando o tratamento inicia-se em uma fase precoce da doença. No entanto, o grupo de pesquisa não avaliou por qual mecanismo a preservação estava ocorrendo, se era pela diminuição da morte celular (apoptose) ou pela proliferação de células (neogênese). Diferentemente de ÁVILA *et al.*, neste presente estudo, um dos objetivos foi avaliar o efeito, em longo prazo, da Vildagliptina, ou seja, 30 dias após a indução do estado de diabetes que deu-se início ao tratamento medicamentoso. Sendo assim, mesmo após 60 dias em estado crônico de diabetes o

tratamento com Vildagliptina foi eficiente em preservar as células beta pancreáticas, sugerindo neste estudo que um dos mecanismos de preservação seria através da neogênese das células beta.

Além das avaliações bioquímicas e histológicas, foi mensurado também o grau de funcionalidade das células beta pancreáticas, expresso pelo índice Homa%Beta. Este índice fornece uma medida indireta da capacidade funcional das células beta em secretar insulina. Os resultados obtidos demonstraram que, apesar do estado de diabetes ter reduzido a funcionalidade das células em relação ao grupo controle (C), o tratamento com Vildagliptina nos animais diabéticos (DV) aumentou não somente o número de células beta, mas também restabeleceu a função mesmo após o agravamento da doença, embora não à nível dos animais controles. Este resultado pode ser comprovado pela análise dos níveis de insulina, onde os níveis séricos deste hormônio diminuíram após a indução do diabetes, voltaram a aumentar após o tratamento, porém foram quase 3 vezes menores nos animais diabéticos tratados em relação aos animais controle (**Tabela 1**). Vários são os relatos de pesquisadores que demonstram que o tratamento com inibidores da DPP-IV em animais diabéticos é eficaz na melhora da funcionalidade da célula beta, com consequente aumento na secreção e sensibilidade à insulina (OMAR *et al.*, 2013).

A fim de demonstrar se havia relação direta entre o número de células e a sua funcionalidade, foram feitas análises de correlação entre alguns parâmetros (**Figura 16**).

Inicialmente, para comprovar que o estado de diabetes é caracterizado por baixa insulinemia com consequente quadro hiperglicêmico, fez-se a correlação entre os níveis séricos de insulina e a glicemia final de jejum (**Figura 16A**). Os resultados apresentados no gráfico de dispersão demonstraram que existe uma correlação forte e negativa ( $r = -0,7562$ ) entre estes dois parâmetros. Sendo assim, é correto afirmar que, neste estudo, todo e qualquer animal que apresente glicemia final de jejum elevada, apresentará como consequência uma baixa concentração de insulina, sendo a recíproca verdadeira.

Em seguida foi avaliada a correlação entre a funcionalidade da célula beta (Homa%Beta) e o número de células beta pancreáticas (**Figura 16B**). Os resultados apresentados no gráfico de dispersão demonstraram que houve uma correlação forte e positiva ( $r = 0,7041$ ) entre os parâmetros. Além disso, foi verificado se havia correlação entre a concentração de insulina e o número de células beta (**Figura 16C**). Os resultados mostraram que também houve uma correlação forte e positiva ( $r = 0,7814$ ).



Embora tenha sido comprovado que o tratamento com 5mg/kg de Vildagliptina seja capaz de melhorar alguns parâmetros bioquímicos, além de induzir neogênese e melhorar a funcionalidade das células beta pancreáticas em animais mesmo em estado crônico (60 dias) de DM1, o quadro hiperglicêmico ainda ficou estabelecido. Vários foram os autores que relataram a ineficiência dos inibidores da DPP-IV na redução da glicose sanguínea no modelo de DM1 (MAEDA *et al.*, 2012; GIAMPIETRO *et al.*, 2013; ÁVILA *et al.*, 2013). Sendo assim, existiu ainda a necessidade em buscar terapias adicionais que pudessem promover um melhor controle glicêmico. Dados da literatura demonstraram 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, melhorando a hiperglicemia, ambos em modelo animal diabético induzido com STZ (COSKUN *et al.*, 2005; ADEWOLE *et al.*, 2006). Sendo assim, baseado nos achados literários, o próximo objetivo foi acrescentar a Quercetina ao tratamento farmacológico a fim de potencializar os efeitos já comprovados da Vildagliptina, segundo Protocolo 1.

Para avaliar a associação da Quercetina e Vildagliptina na modulação de parâmetros bioquímicos e preservação da histologia pancreática no DM1 (**Protocolo 2**), inicialmente foram mensurados a massa corporal, glicemia, insulinemia e perfil lipídico em ratos controle e diabéticos. O estado de diabetes dos animais também foi obtido pela injeção com aloxano.

Quando analisadas as massas dos animais, percebeu-se que os animais diabéticos tiveram uma perda de massa corporal significativa em relação aos animais do grupo controle, e que nenhum dos tratamentos ministrados aos animais diabéticos, seja com Vildagliptina e Quercetina isoladas ou em associação, evitou tal redução de massa. Diferentemente dos nossos resultados, ADEWOLE *et al.*; 2007, estudando o efeito do tratamento com Quercetina em ratos Wistar induzidos ao estado de diabetes com STZ, relataram que a Quercetina evitou que os animais diabéticos perdessem massa corporal quando comparados aos animais diabéticos que não receberam o tratamento. Tal diferença pode ser explicada uma vez que no atual estudo, a dose de Quercetina utilizada foi de 5mg/kg de peso via gavagem durante 30 dias, enquanto que no estudo de ADEWOLE *et al.*, 2007 a dose de Quercetina administrada foi de 25mg/kg de peso por via injeção intraperitoneal, também durante 30 dias.

Em relação à glicemia, como visto nos resultados do Protocolo 1, o tratamento com Vildagliptina não foi efetivo no controle glicêmico. Para tentar promover uma

redução significativa na glicose sanguínea em animais com DM1, foi adicionado ao tratamento o flavonóide Quercetina. Os resultados do Protocolo 2 demonstraram que os animais pertencentes aos grupos diabéticos tiveram uma elevação significativa dos níveis glicêmicos quando comparados ao grupo controle, e os tratamentos isolados e em associação não foram capazes de promover o retorno à normoglicemia nos animais diabéticos. Embora os tratamentos não tenham melhorado o quadro hiperglicêmico, apenas a administração isolada de Vildagliptina foi capaz de aumentar os níveis séricos de insulina no grupo de animais diabéticos tratados (DV) quando comparado aos níveis circulantes deste hormônio nos animais diabéticos não tratados (D). O tratamento com Quercetina isolada ou em associação não foi capaz de aumentar a insulinemia, e conseqüentemente não promoveu melhora no controle glicêmico. Resultados distintos foram encontrados por pesquisadores que demonstraram que a Quercetina melhorou a hiperglicemia jejum e pós-prandial mesmo sem promover alteração significativa nos níveis de insulina em modelo de ratos com DM (KIM *et al.*, 2011), e que a administração intraperitoneal de 50mg/kg de Quercetina reduziu a hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por STZ (MAHESH *et al.*, 2004). ADEWOLE *et al* também relataram que a Quercetina, na dose de 25mg/kg, impediu a elevação da glicemia e aumentou a concentração de insulina em ratos diabéticos induzidos com STZ (ADEWOLE *et al.*, 2007). Diferenças metodológicas podem explicar a controversa de resultados relatados na literatura aos encontrados neste estudo, uma vez que nas referências citadas a via de administração foi por injeção intraperitoneal e utilizou Quercetina em altas concentrações. Além disso, poucos foram os estudos que avaliaram possíveis efeitos secundários da Quercetina sobre a histologia pancreática, hepática e renal. Neste estudo, a escolha da dose de 5mg/kg de Quercetina administrada por via oral aos animais foi baseada em dados retirados da literatura (WANG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2013).

Outro parâmetro analisado foi o perfil lipídico. A análise dos resultados permite inferir que, em relação ao colesterol total não houve diferença significativa quando comparados o grupo diabético e controle não tratados. Tal diferença pode não ter sido encontrada baseado na proporção entre as frações de colesterol, uma vez que enquanto os níveis de frações aterogênicas (LDL + VLDL) aumentaram nos animais diabéticos, os níveis de fração HDL diminuíram o que possibilitou a manutenção do equilíbrio. Após o tratamento, a mensuração dos resultados permitiu concluir que os animais diabéticos que receberam as três diferentes formulações tiveram uma redução

significativa do colesterol total, enquanto a Quercetina isolada (DQ) ou associada com a Vildagliptina (DQV) possibilitou a redução das frações aterogênicas acompanhada do aumento de HDL-C. Os mesmos resultados também foram encontrados nos grupos controles tratados, sugerindo que a Quercetina é capaz de controlar o nível de colesterol tanto na presença quanto na ausência do DM. Quanto aos níveis séricos de triglicérides, esses também foram maiores nos animais do grupo diabéticos em relação aos controles, porém nenhum dos tratamentos foi eficaz em reduzi-los.

Já é sabido que o DM também gera um quadro de desordem lipídica sanguínea, incluindo hipertrigliceridemia e níveis baixo de HDL-colesterol (O'KEEFE *et al.*, 1999). As doenças cardiovasculares estão entre as complicações diabéticas mais prevalentes e principais causas de mortalidade prematura entre os pacientes com DM2 (GARG *et al.*, 1990). Sendo assim, o controle da dislipidemia também é essencial para a redução do risco de complicações cardiovasculares, e o uso de agentes hipolipemiantes e com atividade antioxidante pode ser promissor no tratamento do diabetes e das doenças cardiovasculares. Estudos demonstraram a atividade hipolipemiante da Quercetina em ratos diabéticos induzidos com STZ (VESSAL *et al.*, 2003; TORRES *et al.*, 2010) e em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (KOBORI *et al.*, 2011). KOBORI *et al.* também relataram que a Quercetina diminuiu a expressão do receptor alfa ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR-alfa) e da proteína 1c de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP-1c) no fígado de ratos alimentados com uma dieta ocidental, resultando na diminuição da síntese de triglicérides e melhorando a dislipidemia. JEONG *et al.* também relataram efeito benéfico da Quercetina no perfil lipídico de camundongo db/db, onde ela foi capaz de melhorar o quadro de hipertrigliceridemia, além de melhorar o colesterol plasmático e aumentar o HDL-C (JEONG *et al.*, 2012).

Uma vez já demonstrada atividade neogênica da Vildagliptina (Protocolo 1), além de dados da literatura que informam a capacidade das incretinas e inibidores da DPP-IV de citoproteção das células pancreáticas (ÁVILA *et al.*, 2013), inibição da apoptose (LI *et al.*, 2003; WIDENMAIER *et al.*, 2010) assim como estimulação da replicação das células beta pancreáticas (XU *et al.*, 1999; FRIEDRICHSEN *et al.*, 2006), neste estudo também houve o interesse em avaliar se a Quercetina poderia potencializar os efeitos histológicos já demonstrados pela Vildagliptina.

Inicialmente foi verificado o efeito do tratamento com Quercetina sobre o número de ilhotas pancreáticas em ratas com DM1 (**Figura 17**). A contagem de ilhotas revelou que os animais dos grupos diabéticos não tratados (D), tratados isoladamente

com Quercetina (DQ) e o grupo associação (DQV) tiveram significativa perda da massa de ilhotas quando comparadas ao grupo controle (C). Foi verificado também que as três formulações foram capazes de estimular significativamente o crescimento de ilhotas pancreáticas em ratas com DM1. A análise dos tratamentos isolados permite inferir que apenas a Vildagliptina nos animais diabéticos (DV) conseguiu restaurar o número de ilhotas próximo ao nível dos controles (C). Embora ambos os tratamentos isolados tenham aumentado significativamente o número de ilhotas, poderia ser esperado que a associação entre Vildagliptina e Quercetina proporcionasse um aumento ainda maior, porém o mesmo não ocorreu. Em conformidade aos nossos resultados, COSKUN *et al.*, 2005 demonstraram que a Quercetina preservou as ilhotas pancreáticas em modelo experimental de ratos diabéticos induzidos com STZ através da diminuição do estresse oxidativo.

A arquitetura celular pôde ser avaliada pela análise qualitativa da histologia pancreática corada com H&E que revelou que, macroscopicamente, não houve nenhuma alteração morfológica das ilhotas. Microscopicamente também não se notaram modificações na parte exócrina, ou seja, não há sinais de inflamação, necrose ou demais alterações degenerativas (**Figura 18**).

Uma vez demonstrada que os tratamentos foram capazes de aumentar a massa de ilhotas pancreáticas nos animais diabéticos, o próximo passo foi avaliar a população de células betas presente no interior destas ilhotas. A contagem celular revelou que os animais diabéticos não tratados (D) e os tratados com Quercetina (DQ) apresentaram redução significativa no número de células beta em comparação ao grupo controle (C). Os três distintos tratamentos nos animais diabéticos também foram eficazes em aumentar significativamente o número de células beta, sendo que a Vildagliptina isolada (DV) ou em associação com Quercetina (DQV) proporcionou uma melhora celular que se aproximou ao nível dos animais controle. Tal resultado demonstra que a Quercetina não potencializou o efeito da Vildagliptina no efeito histológico em animais com DM1 (**Figura 19**). As fotomicrografias representativas de cortes histológicos de pâncreas, coradas com Tricômico de Gomori, permite visualizar a população de células beta pancreáticas nos grupos experimentais (**Figura 20**).

Assim como visto na análise das ilhotas pancreáticas e na contagem de células beta, os tratamentos isolados (DQ e DV) promoveram significativa melhora na estrutura e integridade celular nos animais diabéticos. Porém a associação de Quercetina e Vildagliptina não proporcionou um efeito sinérgico como poderia ser esperado. A

hipótese de tal resultado pode ser baseada no efeito competitivo ou até mesmo antagônico das formulações, porém ainda não foram publicados estudos que demonstrem tal hipótese no modelo experimental de diabetes.

Várias foram as publicações de autores relatando o efeito protetor da Quercetina e demais flavonoides sobre a histologia pancreática. Até agora, há uma crescente evidência dos potenciais benefícios de compostos fenólicos na regulação celular, tais como controle redox e resposta inflamatória, e, portanto, podem proteger contra o diabetes (DEMBINSKA *et al.*, 2008; CROZIER *et al.*, 2009). Estudo *in vivo* no diabetes sugeriu que o tratamento com Quercetina diminui o estresse oxidativo e preserva a integridade das células beta pancreáticas, possivelmente através da diminuição da peroxidação lipídica e da produção de óxido nítrico (NO), assim como por aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (COSKUN *et al.*, 2005). Uma vez que é sabido que as citocinas pró-inflamatórias que se infiltram no pâncreas podem mediar à disfunção das células beta (DONATH *et al.*, 2008), LIN *et al.* (2012), em estudo testando o efeito preventivo de compostos fenólicos, demonstrou a capacidade inibitória da Quercetina contra a toxicidade de citocinas pró-inflamatórias nas células beta pancreáticas. Além disso, ADEWOLE *et al.*, 2007 relataram que o tratamento com Quercetina, em ratos diabéticos STZ-induzidos, protegeu e preservou a arquitetura e integridade das células beta, inferindo que a Quercetina tem efeito benéfico no tecido pancreático sujeito ao estresse oxidativo induzido por STZ.

A avaliação da funcionalidade da célula beta (Homa%Beta) também foi mensurada neste protocolo (**Figura 21**). Os resultados obtidos demonstram que a capacidade funcional das células beta em secretar insulina dos animais diabéticos foi inferior à capacidade dos animais controle. Ao ser administrado tratamento com Vildagliptina isolada ou em associação com Quercetina nos animais diabéticos (DV e DQV), percebeu-se um aumento significativo no índice Homa%Beta. Já foi comprovado que o tratamento com inibidores da DPP-IV em animais diabéticos é eficaz na melhora da funcionalidade da célula beta (OMAR *et al.*, 2013), além disso, estudos tem demonstrado que a Quercetina também atua neste parâmetro. YOU *et al.*, 2010 avaliando o efeito potencializador da Quercetina na funcionalidade de células beta, demonstrou que na ausência de indução de glicose, a secreção de insulina foi moderada, no entanto, quando a Quercetina foi adicionada à indução por glicose, houve uma potencialização significativamente maior no nível de insulina secretada (cerca de 2 vezes maior). Além de avaliar a função, o mesmo grupo de pesquisadores avaliou o

efeito da Quercetina na injúria de células INS-1 induzidas com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Foi demonstrado que a Quercetina não apenas protegeu a viabilidade das células INS-1 contra o estresse oxidativo, mas também manteve o efeito de potencializar a secreção de insulina induzida por glicose mesmo na presença de  $H_2O_2$ . Este agente estressor tem sido comumente usado para estudar as alterações induzidas por espécies reativas em vários tipos de células, incluindo células beta (XIONG *et al*, 2006; CHEN *et al*, 2009). Estudos anteriores já mostraram que o  $H_2O_2$  reduziu de maneira dose-dependente tanto a viabilidade das células beta quanto a secreção de insulina induzida por glicose (RASILAINEN *et al*, 2002; SAKAI *et al*, 2003).

A fim de demonstrar se havia relação direta entre o número de células e a sua funcionalidade, também foram feitas análises de correlação entre alguns parâmetros (**Figura 22**).

Assim como no Protocolo 1, os níveis séricos de insulina e a glicemia final de jejum (**Figura 22A**) apresentaram no gráfico de dispersão uma correlação forte e negativa ( $r = -0,8727$ ), garantindo, neste estudo, que todo e qualquer animal que apresente glicemia final de jejum elevada, apresentará como consequência uma baixa concentração de insulina, sendo a recíproca verdadeira.

Também foi avaliada a correlação entre a funcionalidade da célula beta (Homa%Beta) e o número de células beta pancreáticas (**Figura 22B**). Os resultados apresentados no gráfico de dispersão demonstraram que houve uma correlação forte e positiva ( $r = 0,7614$ ) entre os parâmetros. A análise da correlação entre o conteúdo de insulina e o número de células beta (**Figura 22C**) também foi feita, e os resultados mostraram que também houve uma correlação forte e positiva ( $r = 0,7191$ ).

## CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

Baseado nos resultados encontrados neste estudo pode-se concluir que potencial neogênico da Vildagliptina em uma fase tardia do DM1 foi demonstrado (Tabela 3-Protocolo 1), e a associação entre Quercetina e Vildagliptina melhorou o colesterol total e suas frações e promoveu a preservação da histologia pancreática no modelo experimental de DM1 (Tabela 4 - Protocolo 2). Além disso, as análises de correlação permitem afirmar que o aumento no número de células beta pancreáticas está diretamente relacionado ao aumento na função e secreção de insulina por estas células. Essas informações são de extrema relevância e nos permite sugerir que a Vildagliptina pode ser uma terapia opcional para o tratamento do DM1 tanto nos estágios iniciais da doença, quando ainda existe uma população de células beta funcionais, assim como nos estágios mais avançados, quando grande parte da massa destas células já se exauriram. Entretanto, uma vez que o estado hiperglicêmico é um parâmetro de difícil controle e está diretamente relacionado aos mecanismos apoptóticos e do estresse oxidativo, estudos mais profundos precisam ser realizados.

**Tabela 3.** Resultados do tratamento com 5mg/kg de Vildagliptina nos animais com DM1 (Protocolo 1)

<b>PROTOCOLO 1</b>	
<b>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS</b>	
Massa Corporal Final (g)	—
Glicemia Final (mmol/L)	—
Insulina (pmol/L)	↑
Colesterol Total (mmol/L)	↓
HDL (mmol/L)	—
Frações aterogênicas (mmol/L)	↓
Triglicerídeos (mmol/L)	↓
<b>PARÂMETROS HISTOLÓGICOS</b>	
Número de Ilhotas Pancreáticas	—
Número de Células Beta Pancreáticas	↑
Homa%Beta	↑
<b>CORRELAÇÕES</b>	
Glicemia Final de Jejum x Insulina	<b>Forte e Negativa</b>
Número de Células Beta x Homa%Beta	<b>Forte e Positiva</b>
Número de Células Beta x Insulina	<b>Forte e Positiva</b>

Efeitos encontrados nos animais do grupo DV em comparação aos animais do grupo D na execução do Protocolo 1.

Legenda: (—) Não alterou; ↑ Aumentou; ↓ Diminuiu.



**Tabela 4.** Resultados do tratamento associado com 5mg/kg de Vildagliptina + 5mg/kg de Quercetina nos animais com DM1 (Protocolo 2)

<b>PROTOCOLO 2</b>	
<b>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS</b>	
Massa Corporal Final (g)	—
Glicemia Final (mmol/L)	—
Insulina (pmol/L)	—
Colesterol Total (mmol/L)	↓
HDL (mmol/L)	↑
Frações aterogênicas (mmol/L)	↓
Triglicerídeos (mmol/L)	↑
<b>PARÂMETROS HISTOLÓGICOS</b>	
Número de Ilhotas Pancreáticas	↑
Número de Células Beta Pancreáticas	↑
Homa%Beta	↑
<b>CORRELAÇÕES</b>	
Glicemia Final de Jejum x Insulina	<b>Forte e Negativa</b>
Número de Células Beta x Homa%Beta	<b>Forte e Positiva</b>
Número de Células Beta x Insulina	<b>Forte e Positiva</b>

Resultados dos parâmetros bioquímicos, histológicos e correlações encontrados no Protocolo 2. Comparação entre os animais do grupo DVQ em relação aos animais do grupo D.  
 Legenda: (—) Não alterou; ↑ Aumentou; ↓ Diminuiu.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBOTT, C. A.; BAKER, E.; SUTHERLAND, G. R. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. **Immunogenetics.**, v. 40, n. 5, p. 331-338, 1994.

ADEWOLE, S. O.; CAXTON, E.; JAO, O. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic  $\beta$ -cells of streptozotocintreated diabetic rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 4, p. 64-74, 2006.

AHREN, B.; SCHWEIZER, A.; DEJAGER, S. *et al.* Mechanisms of action of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in humans. **Diabetes Obes Metab.**, v. 13, n. 9, p. 775-783, 2011.

AHREN, B. Clinical results of treating type 2 diabetic patients with sitagliptin, vildagliptin or saxagliptin – diabetes control and potential adverse events. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 23, n. 4, p. 487-498, 2009.

AHREN, B.; PACINI, G.; TURA, A.; FOLEY, J. E.; SCHWEIZER, A. 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. **Hormone Metab. Res.**, v. 39, n. 11, p. 826-829, 2007.

AHREN, B.; LANDIN-OLSSON, M.; JANSSON, P. A. *et al.* Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 5, p. 2078-2084, 2004.

AHREN, B.; SIMONSSON, E.; LARSSON, H.; LANDIN-OLSSON, M. *et al.* Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4 week study period in type 2 diabetes. **Diabetes Care.**, v. 25, n. 5, p. 869-875, 2002.

AHRÉN, B.; SUNDKVIST, G. Long-term effects of alloxan in mice. **Int J Pancreatol**, v. 7, p. 197-201, 1995.

ALFRADIQUE, M. E.; BONOLO, P. F.; DOURADO, I.; COSTA, M. F. L.; MACINKO, J.; MENDONÇA, C. S.; OLIVEIRA, V. B.; SAMPAIO, L. F. R.; SIMONI, C.; TURCI, M. A. Internações por condições sensíveis à atenção primária: a construção da lista brasileira como ferramenta para medir o desempenho do sistema de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, p. 1337-1349, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 27, n. 1, p. 5-10, 2004.

ANDUKURI, R.; DRINCIC, A.; RENDELL, M. Alogliptin: a new addition to the class of DPP-4 inhibitors. **Diabetes Metab. Syndr. Obes.**, v. 21, n. 2. P. 117-126, 2009.

ANSARULLAH, LU, Y., HOLSTEIN, M.; DERUYTER, B. *et al.* Stimulating  $\beta$ -Cell Regeneration by Combining a GPR119 agonist with a DPP-IV Inhibitor. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e53345, 2013.

AQUINO, R., MORELLI S., TOMAINO, A. *et al.* Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 183-191, 2002

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, M. D. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **The Lancet**, v. 358, p. 221-229, 2001.

AVILA, D. L.; ARAUJO, G. R.; MIRANDA, P. H. A. *et al.* Vildagliptin Ameliorates Oxidative Stress and Pancreatic Beta Cell Destruction in Type 1 Diabetic Rats. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 194-202, 2013.

AZUMA, K.; RÁDIKOVÁ, Z.; MANCINO, J. *et al.* Measurements of islet function and glucose metabolism with the DPP-4 inhibitor vildagliptin in patients with type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, p. 459-464, 2008.

BAGGIO; DRUCKER. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 265-281, 2006.

BANERJEE, M.; YOUNIS, N.; SORAN, H. Vildagliptin in clinical practice: a review of literature. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 16, p. 2745-2757, 2009.

BARCELÓ, A., AEDO, C., RAJPATHAK, S., ROBLES, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 1, p. 19-27, 2003.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. *et al.* FLAVONÓIDE QUERCETINA: ASPECTOS GERAIS E AÇÕES BIOLÓGICAS. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004

BHANSALI, A.; DUTTA, P. Pathophysiology of prediabetes. **J Indian Med Assoc.**, v. 103, n. 11, p. 594-599, 2005.

BLOOMGARDEN, Z. T. Development in diabetes and insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1, p. 161-167, 2006.

BOWMAN, W. C.; RAND, M. J. Sistema endócrino y drogas que afectan su función. In: Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas, 2ª ed. Nueva Editorial Interamericana: México p.19-53, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. 7,4% dos brasileiros têm diabetes.** Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anteriores-agencia-saude/6861->>. Acesso em: 20 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Dados Vigitel sobre diabetes no Brasil são apresentados em coletiva de imprensa.** Brasília, 2012. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2837&Itemid=1](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=2837&Itemid=1). Acesso em: 20 dez. 2013.

BELL, G. I.; SANCHEZ, R.; LAYBOURN, P. J. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. **Nature**, v. 304, p. 368-371, 1983.

BUTLER, A. E.; JANSON, J.; SOELLER, W. C. *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. 2304-2314, 2003.

CASTANO, L.; EISENBARTH, G. S. Type-I Diabetes: A Chronic Autoimmune Disease of Human, Mouse, and Rat. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 647-679, 1990.

CERMAK, R.; FÖLMER, U.; WOLFFRAM, S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**, v. 275, p. 1166-1172, 1998.

CHEN, L.; LIU, L.; YIN, J.; LUO, Y.; HUANG, S. Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, p. 1284–1295, 2009.

CHO, J. M.; JANG, H. W.; CHEON, H. *et al.* A novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor DA-1229 ameliorates streptozotocin-induced diabetes by increasing b-cell replication and neogenesis. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 91, n. 1, p. 72-79, 2011.

COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A. *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, 2005.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep**, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

D’ALESSIO, D. A.; TSO, P. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption and lipoprotein production in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 288, p. 6943-6949.90. 2005.

DEACON, C. F.; CARR, R. D.; HOLST, J. J. DPP-IV inhibitor therapy: new directions in the treatment of type 2 diabetes. **Front. Biosci.** v. 13, p. 1780-1794, 2008.

DEMBINSKA, A.; MYKKANEN, O.; KIEC, B.; MYKKANEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **Br J Nutr**, v. 99, suppl. 1, p. 109–117, 2008.

DOBRIAN, A. D.; MA, Q.; LINDSAY, J. W. *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 300, n. 2, p. 410-421, 2011.

- DONATH, M. Y.; STORLING, J.; BERCHTOLD, L. A. *et al.* Cytokines and beta cell biology: from concept to clinical translation. **Endocr Rev**, v. 29, p. 334–350, 2008.
- DOYLE, M. E.; EGAN, J. M. Mechanisms of action glucagon-like peptide-1 in the pancreas. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, n. 3, p. 546-93, 2007.
- DRUCKER, D.; EASLEY, C.; KIRKPATRICK, P. Sitagliptin. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 6, n. 2, p. 109–110, 2007.
- DRUCKER, D. J.; NAUCK, J. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, p. 1696–705, 2006.
- DRUCKER, D. J. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 10, p. 2929-2940, 2003.
- 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, 2005.
- DUPRE, J.; BEHME, M. T.; MCDONALD, T. J. Exendin-4 normalized postcibal glycemic excursions in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 89, n. 7, p. 3469-73, 2004.
- DUPRE, J.; BEHME, M. T.; HRAMIAK, I. M.; MCFARLANE, P.; WILLIAMSON, M. P.; ZABEL, P.; MCDONALD, T. J. Glucagon-like peptide-1 reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. **Diabetes**, v. 44, n. 6, p. 626-630, 1995.
- ELIASCHEWITZ, F. G. Perfil terapêutico dos inibidores da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV). Novas perspectivas para o tratamento do diabetes tipo 2: incretinomiméticos e inibidores da DPP-IV – Posicionamentos Oficiais SBD. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, n. 3, p. 11-15, 2007.
- EL-OUAGHLIDI, A.; REHRING, E.; HOLST, J. J. *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, 2007.
- FARILLA, L.; HUI, H.; BERTOLOTTI, C. *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, 2002.
- FRIEDRICHSEN, B. N.; NEUBAUER, N.; LEE, Y. C. *et al.* Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. **J Endocrinol**, v. 188, p. 481–492, 2006.
- 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. 65-72, 2008.

GARG, A.; GRUNDY, S. M. Management of dyslipidemia in NIDDM. **Diabetes Care**, v. 13, p. 153-169, 1990.

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, 2013.

GIAMPIETRO, O.; GIAMPIETRO, C.; BARTOLA, L. D. *et al.* Sitagliptin as add-on therapy in insulin deficiency: biomarkers of therapeutic efficacy respond differently in type 1 and type 2 diabetes. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 99–104, 2013.

GILMER, T. P.; O'CONNOR, P. J.; RUSH, W. A.; CRAIN, A. L.; WHITEBIRD, R. R.; HANSON, A. M.; SOLBERG, L. I. Predictors of health care costs in adults with diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 59-64, 2005.

GÖKE, R.; FEHMANN, H. C.; LINN, T. *et al.* Exendin-4 is high potency agonist and truncated exendin-4-(9-39)-amide an antagonist ucagon-like peptide-1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 26, p. 19650-19655, 1993.

GOLDENBERG, P.; SCHENKMAN, S.; FRANCO, J. F. Prevalência de diabetes *mellitus*: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos. **Rev. Bras. Epidemiol**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 18-28, 2003.

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. 159-165, 2006.

HÁMAMOTO, S.; KANDA, Y.; SHIMODA, M. *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, Obesity and Metabolism**, v. 15; p. 153–163, 2013.

HAMDEN, K.; CARREAU, S.; BOUJBIHA, M. A.; LAJMI, S.; ALOULOU, D.; KCHAOU, D.; ELFEKI, A. Hiperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17-beta estradiol. **Steroids**, v. 75, p. 495-501, 2008.

HANSEN, L.; DEACON, C. F.; ORSKOV, C.; HOLST, J.J. 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. 5356-5363, 1999.

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, 2006.

HERMAN, G. A.; BERGMAN, A.; STEVENS, C. *et al.* Effect of singleoral 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. 4612–4619, 2006.

ISHIBASHI, K.; HARA, A.; FUJITANI, Y. *et al.* Beneficial effects of vildagliptin combined with miglitol on glucose tolerance and islet morphology in diet-controlled db/db mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 4, p. 570–575, 2013.

JACQUES, P. F.; CASSIDY, A.; ROGERS, G. *et al.* Higher Dietary Flavonol Intake Is Associated with Lower Incidence of Type 2 Diabetes. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 9, p. 1474–1480, 2013.

JANG, H. J.; KOKRASHVILI, Z.; THEODORAKIS, M. J. *et al.* GUT-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of Glucagon-like peptide-1. **Proc. Natl. Acad Sci USA**, v. 104, n. 38, p. 15069-74. 2007.

JASTROCH, M. Unravelling the molecular machinery that promotes pancreatic  $\beta$ -cells dysfunction during oxidative stress: focus on phagocyte NADPH oxidase promotes cytokine-induced mitochondrial dysfunction in pancreatic  $\beta$ -cells: evidence for regulation by Rac1. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 90, n. 1, p. 54-9, 2010.

JELSING, J.; VRANG, N. *et al.* The DPP4 inhibitor linagliptin delays the onset of diabetes and preserves *b*-cell mass in non-obese diabetic mice. **Journal of Endocrinology**, v. 214, p. 381–387, 2012.

JENNINGS, A.; WELCH, A. A.; SPECTOR, T. *et al.* Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 2, p. 202-8, 2014.

JEONG, S.; KANG, M.; CHOI, H. *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. 201-207. 2012.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovas. Diabetol.**, v. 29, n. 4, p. 1-5, 2005.

KANETO, H.; MATSUOKA, T. A.; KAWASHIMA, S. *et al.* Role of MafA in pancreatic beta-cells. **Adv Drug Deliv Ver.**, v. 61, n. 7-8, p. 489–496, 2009.

KANETO, H.; MIYATSUKA, T.; KAWAMORI, D. *et al.* PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. **Endocr J.**, v. 55, n. 2, p. 235–252, 2008.

KARASIK, A.; ASCHNER, P.; KATZEFF, H.; DAVIES, M. J.; STEIN, P. P. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials. **Curr Med Res Opin**, v. 24, n. 2, p. 489–496, 2008.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG L. Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.55, n.1, p.131-142, 2003.

KIEFFER, T. J.; HABENER, J. F. The glucagon-like peptides. **Endocr. Rev**, v. 20, n. 6, p. 876-913, 1999.

KIM, J.; KANG, M.; CHOI, H. *et al.* Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. **Nutr Res Pract**, v. 5, n. 2, p. 107-111, 2011.

KIM, S.; NIAN, C.; DOUDET, D. *et al.* Dipeptidyl Peptidase IV Inhibition With MK0431 Improves Islet Graft Survival in Diabetic NOD Mice Partially via T-Cell Modulation. **Diabetes**, v. 58, p. 641-651, 2009.

KIM, W.; EGAN, J. M. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. **Pharmacol Rev.**, v. 60, n. 4, p. 470–512, 2008.

KING, H., AUBERT, R. E., HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025. **Diabetes Care**, v. 21, p. 1414-1431, 1998.

KNUDSEN, L. B.; NIELSEN, P. F.; HUUSFELDT, P.O. *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. 1664-1669, 2000.

KOBORI, M.; MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; OIKE, H. 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.; MASUMOTO S.; AKIMOTO, Y. *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. 859-868, 2009.

LI, Y; XIAO, J.; TIAN, H. *et al.* The DPP-4 inhibitor MK0626 and exercise protect islet function in early pre-diabetic kky mice. **Peptides**, v. 49, p. 91-99, 2013.

LI, Y.; HANSOTIA, T.; YUSTA, B. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, p. 471–478, 2003.

LIANG, W.; ZHONGHUA, L.; GE, S. *et al.* Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 317–324, 2011.

LIN, C.; CHIN, C.; CHIN, M. *et al.* Flavonoids protect pancreatic beta-cells from cytokines mediated apoptosis through the activation of PI3-kinase pathway. **Cytokine**, v. 59, p. 65–71, 2012.

LOPEZ-REVUELTA, A.; SANCHES-GALLEGO, J.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, 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, 2006.



LOTIFY, M.; SINGH, J.; KALÁSZ, H. *et al.* Medicinal chemistry and applications of incretins and DPP-IV inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, suppl. 2, p. 82-92, 2011.

MACIEL, R. M.; COSTA, M. M.; MARTINS, D. B. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Research in Veterinary Science**, v. 95, p. 389–397, 2013.

MAEDA, S.; MATSUI, T.; YAMAGISHI, S. Vildagliptin inhibits oxidative stress and vascular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Cardiology**, v. 158, n. 1, p. 171-173, 2012.

MAHESH, T.; MENON, V. P. Quercetin alleviates oxidative stress in STZ-induced diabetic rats. **Phytother Res**, v. 18, p. 123-127, 2004.

MARI, A.; SALLAS, W. M.; HE, Y. L. *et al.* Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model assessed beta-cell function in patients with type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 8, p. 4888-4894, 2005.

MOON, J. Y.; WANG, L.; DICENZO, R.; MORRIS, M. E. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 29, n.4, p. 205-217, 2008.

MOULINATH, B.; YOUNIS, N.; SORAN, H. Vildagliptin in clinical practice: a review of literature. **American Society of Health System Pharmacists**, v. 10, n. 16, p. 2745-2757, 2009.

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. 190-196, 2004.

NAUCK, M.; STOCKMANN, F.; EBERT, R.; CREUTZFELDT, W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia**, v. 29, n. 1, p. 46-52, 1986.

O'KEEFE, J. H. Jr; MILES, J. M.; HARRIS, W. H. *et al.* Improving the adverse cardiovascular prognosis of type 2 diabetes. **Mayo Clin Proc**, v. 74, p. 171-180, 1999.

OMAR, B. A.; VIKMAN, J.; WINZELL, M. S. *et al.* Enhanced beta cell function and anti-inflammatory effect after chronic treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in an advanced-aged diet-induced obesity mouse model. **Diabetologia**, v. 56, n. 8, p. 1752-1760, 2013.

PÁDUA, B. C; SILVA, L. D; ROSSONI JR, J. V. *et al.* Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 381-386, 2010.

PAIVA, A. R. S.; RUSSEL, R. M.  $\beta$ -carotene and other carotenoids as antioxidants. **The Journal of Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 420-433, 1999.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 13, p. 4557-4567, 2006.

PERFETTI, R.; HUI, H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. **Horm. Metab. Res.**, v. 36, n. 11-12, p. 804-10, 2004.

POSPISILIK, J.; MARTIN, J.; DOTY, T. *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibitor stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes.**, v. 52, n. 3, p. 741-750, 2003.

POSPISILIK, J.; STAFFORD, S.; DEMUTH, H. *et al.* Long-term treatment with DPP-IV inhibitory 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. 943-950, 2002.

PRATLEY, R. E.; GILBERT, M. Targeting incretins in type 2 diabetes: role GLP-1 receptor agonists and DPP-IV inhibitors. **Rev. Diabet. Stud.**, v. 5, n. 2, p. 73-94, 2008.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 7, p. 1802-1812, 2006.

RAMAN, V. S.; MASON, K. J. *et al.* The role of adjunctive exenatide therapy in pediatric type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, n. 6, p. 1294-1296, 2010.

RASILAINEN, S.; NIEMINEN, J. M.; LEVONEN, A. L. *et al.* Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochem Pharmacol**, v. 63, p. 1297-1304, 2002.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V. *et al.* Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

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.

ROSEN, P., NAWROTH, P. P., KING, G., MOLLER, W., TRITSCHLER, H. J., PACKER, L. 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, p. 189-212, 2001.

SAKAI, K.; MATSUMOTO, K.; NISHIKAWA, T. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 300, p. 216-222, 2003.

SILVA, M.; BONOMO, L. F.; OLIVEIRA, R. P. *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. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition** *JCB*, v. 49, p. 1-7, 2011.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, N. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biol. Med.**, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, 2000.

SHAW, J. E., ZIMMET, P. Z., MCCARTY, D., COURTEN, M. Type 2 diabetes worldwide according to the new classification and criteria. **Diabetes Care**, supl. 2, p. B5-10, 2000.

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES.** Métodos e critérios para o diagnóstico do *Diabete mellitus*. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, p. 10-12, 2012-2013.

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES.** Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, p. 1-329, 2009.

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES.** Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, p. 1-168, 2007.

STANKOVIC, M.; VLAHOVIC, P.; AVRAMOVIC, V.; TODOROVIC, M. Distribution of Dipeptidyl peptidase IV in patients with chronic tonsillitis. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 5, p. 794-798, 2008.

STOFFERS, D. A.; KIEFFER, T. J.; HUSSAIN, M. A. *et al.* Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 741-748, 2000.

TAKEDA, Y.; FUJITA, Y.; HONJO, J. *et al.* Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 2, p. 404-412, 2012.

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-IV – Posicionamentos Oficiais SBD. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, n. 3, p. 4-7, 2007.

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

UGLEHOLDT, R.; ZHU, X.; DEACON, C.F. *et al.* Impaired intestinal pro glucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1349-55, 2004.

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, 2001.

VESSAL, M.; HEMMATI, M; VASEI M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 135, n. 3, p. 357-64, 2003.

VILHAUER, E. B.; BRINKMAN, J. A.; NADERI, G. B. *et al.* Incretin secretion and type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 357-66, 2004.

WANG, X.; CAHILL, C.M.; PIÑEYRO, M.A. *et al.* Glucagon-like peptide-1 regulates beta-cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. **Endocrinology**. v. 140, n. 10, p. 4904-4907, 1999.

WANG, Y.; XIN, X.; ZHENDONG, J.; HU, Y. *et al.* Anti-diabetic effects of pentamethylquercetin in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 347–353, 2011.

WIDENMAIER, S. B.; KIM, S. J.; YANG, G. K. *et al.* A GIP receptor agonist exhibits betacell anti-apoptotic actions in rat models of diabetes resulting in improved beta-cell function and glycemic control. **PLoS One**, v. 5, e9590, 2010.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for theyear 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, 2004.

XIONG, F. L.; SUN, X. H.; GAN, L. *et al.* Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide. **Eur J Pharmacol**, v. 529, ps 1–7, 2006.

XU, G.; STOFFERS, D. A.; HABENER, J. F.; BONNER-WEIR, S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. **Diabetes**, v. 48, p. 2270–2276, 1999.

XU, M.; HU, J.; ZHAO, W. *et al.* Quercetin differently regulates insulin-mediated glucose transporter 4 translocation under basal and inflammatory conditions in adipocytes. **Mol. Nutr. Food Res.**, p. 1–11, 2013.

YABE, D.; SEINO, Y. Incretin actions beyond the pancreas: lessons from knockout mice. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 13, n. 6, p. 946-953, 2013.

YANAY, O.; MORALEJO, D.; KERNAN, K. *et al.* Prolonged survival and improved glycemia in BioBreeding diabetic rats after early sustained exposure toglucagon-like peptide 1. **J Gene Med.**, v. 12, n. 6, p. 538-44, 2010.

YOUL, E.; BARDY, G.; MAGOUS, R. *et al.* Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic b-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, p. 799–814, 2010.

ZHOU, J.; ZHOU, S.; GAO, Y.; ZENG, S. Modulatory effects of quercetin on hypobaric hypoxic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, p. 450–454, 2012.

# ANEXOS

## ANEXO I. Comprovante do Comitê de Ética Animal

	<p><b>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO</b> <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29 35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370 Email: ceua@propp.ufop.br</p>	
---	--	---

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 2011/27, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Efeito do tratamento com Vildagliptina sobre os marcadores de estresse oxidativo, expressão de enzimas antioxidantes e preservação de células beta pancreáticas em modelo experimental de diabetes tipo 1*", que tem como responsável a Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em Julho/2013.

Ouro Preto, 06 de Julho de 2011.

  
**Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa**  
**Coordenadora da CEUA-UFOP**