



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Alessandra Schiappacassa**

**Efeitos da vildagliptina e da metformina sobre as funções endotelial e microvascular, inflamação de baixo-grau e estresse oxidativo em pacientes com obesidade e diabetes mellitus recém-diagnosticadas: estudo de intervenção**

Rio de Janeiro

2018

Alessandra Schiappacassa

**Efeitos da vildagliptina e da metformina sobre as funções endotelial e microvascular, inflamação de baixo-grau e estresse oxidativo em pacientes com obesidade e diabetes mellitus recém-diagnosticadas: estudo de intervenção**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S329 Schiappacassa, Alessandra.

Efeitos da vildagliptina e da metformina sobre as funções endotelial e microvascular, inflamação de baixo-grau e estresse oxidativo em pacientes com obesidade e diabetes mellitus recém-diagnosticadas: estudo de intervenção / Alessandra Schiappacassa. - 2018.

123 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Agentes hipoglicêmicos – Teses. 2. Endotélio vascular - Teses. 3. Obesidade – Teses. 4. Diabetes – Tratamento - Teses. 5. Metformina – Teses. 6. Estresse oxidativo – Teses. I. Aguiar, Luiz Guilherme Kraemer. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDI 616 379-008 64

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Alessandra Schiappacassa

**Efeitos da vildagliptina e da metformina sobre as funções endotelial e microvascular,  
inflamação de baixo-grau e estresse oxidativo em paciente com obesidade e diabetes  
mellitus recém-diagnosticadas: estudo de intervenção**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de janeiro de 2018.

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz D’Agord Schaan  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>o</sup> Dr. Leonardo Vieira Neto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Ribeiro Bahia  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.<sup>a</sup> Dra. Roberta Arnoldi Cobas  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2018

## AGRADECIMENTOS

Ao Pai Maior, Condutor de minha vida.

Aos meus pais, Lecy Schiappacassa (em memória) e Maria da Conceição Schiappacassa, pelos ensinamentos morais que me fizeram quem sou e pelo amor incondicional.

Ao meu esposo, Ricardo Lanes Vasconcellos, pedaço de mim e companheiro de vida, que com sua paciência e sabedoria sempre esteve ao meu lado nessa trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar, que fez jus à sua função de orientar em todos os aspectos e cujos ensinamentos e solicitude jamais serão esquecidos.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliete Bouskela pela oportunidade de fazer parte de um laboratório rico em conhecimento.

À equipe do Laboratório de Lípidos (Lablip/UERJ), especialmente ao Prof. Dr. José Firmino Nogueira Neto pelo auxílio técnico para este trabalho.

Aos grandes amigos, Dr. Diogo Guarnieri Panazzolo, Dra. Karynne Grutter Lisboa Lopes dos Santos, Dra. Lúcia Henriques Alves da Silva, Dra. Maria das Graças Coelho, Dra. Priscila Alves Maranhão e Enfa. Maria Aparecida Faria, mais do que grandes colaboradores, tornaram-se amigos pelas quais tenho muito apreço e consideração e cuja presença em minha vida será permanente.

À toda equipe de colaboradores do Biovasc, em especial à Eliza Cândida Ávila Freitas, pela grande contribuição com este trabalho.

Aos meus amigos e amigas, cujos nomes e palavras de incentivo estão devidamente detalhados e registrados em meu coração.

A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo de busca. E ensinar e aprender, não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.

*Paulo Freire*

## RESUMO

SCHIAPPACASSA, Alessandra. *Efeitos da vildagliptina e da metformina sobre as funções endotelial e microvascular, inflamação de baixo-grau e estresse oxidativo em pacientes com obesidade e diabetes mellitus recém-diagnosticadas*: estudo de intervenção. 2018. 123 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Mesmo em estágios iniciais da doença, o DM2 correlaciona-se com a piora da função endotelial e redução da capacidade incretínica, bem como um aumento da lipemia pós-prandial (LPP). Com isso, espera-se que portadores de obesidade com DM2 virgens de tratamento, já tenham ao diagnóstico, a reatividade endotelial e microvascular alterada. Por essa razão, o emprego de drogas que atuam melhorando o dano vascular provocado pelo DM2, pode trazer benefícios adicionais à terapêutica do indivíduo com diabetes e obesidade. Nesse estudo, 38 mulheres com DM2 recém diagnosticado e virgens de tratamento, com idade entre 19 e 50 anos e  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , foram randomizadas em dois grupos submetidos ao tratamento com metformina (1700 mg/dia) ou vildagliptina (100mg/dia) respectivamente. Ao final de trinta dias, avaliou-se a função endotelial, perfil lipídico, marcadores inflamatórios, peptídeos intestinais e dados antropométricos em estado basal (jejum), bem como os efeitos promovidos por uma refeição rica em lipídeos no período pós-prandial (PP). Durante o recrutamento, ambos os grupos foram estatisticamente semelhantes do ponto de vista clínico e metabólico. Ao final do estudo, o grupo tratado com vildagliptina por trinta dias apresentou uma melhora da vasodilatação endotélio-dependente ( $P=0,03$ ) e independente ( $P=0,02$ ) aferida por pletismografia por oclusão venosa (POV), bem como uma melhor vasomotricidade avaliada por laser-Dopplerfluxometria (LDF) no período PP ( $P<0,05$ ). O grupo tratado com metformina, por sua vez, apresentou melhor reatividade vascular tanto no jejum ( $P<0,05$ ) após trinta dias de terapia, quanto após a sobrecarga lipídica ( $P<0,05$ ). Concluímos que ambas as drogas, vildagliptina e metformina, são capazes de melhorar a função vascular através de mecanismos de ação distintos e complementares na função endotelial; com predileção da vildagliptina para atuar em vasos relacionados à resistência vascular periférica, enquanto a metformina atua sobre o microfluxo nutritivo ao nível capilar. Dessa forma, as duas drogas são capazes de atuar na melhora da função endotelial em pacientes portadoras de DM2 em estágio inicial, prevenindo o insulto vascular que a doença é capaz de gerar a longo prazo. Efeitos que vão além do simples controle glicêmico.

Palavras chaves: Obesidade. Diabetes mellitus tipo 2. Disfunção endotelial. Lipemia pós-prandial. Vildagliptina.

## ABSTRACT

SCHIAPPACASSA, Alessandra. *Effects of vildagliptin and metformin on endothelial and microvascular functions, low-grade inflammation and oxidative stress in patients with obesity and diabetes mellitus recent diagnosed: a short-term intervention study*. 2018. 123 p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Even in the early stages of the disease, type 2 diabetes *mellitus* (T2D) correlates with the worsening of endothelial function and reduction of incretinic capacity, as well as with an increase in postprandial lipemia (PPL). It is expected that patients with T2D and obesity already have altered endothelial and microvascular reactivities. Consequently, the use of drugs that improve glycemic control and possibly other aspects of the pathophysiology of T2D and vascular damage may bring additional benefits to these patients. In this study, 38 women with newly diagnosed T2D and treatment-naïve, aged between 19 and 50 years and BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>; were randomized into two groups receiving metformin (1700 mg/day) or vildagliptin (100 mg/day), respectively. At baseline and at the end of 30 days of treatment, endothelial function, lipid profile, inflammatory markers, intestinal peptides and anthropometric data were assessed at fasting period, as well as after ingestion of a lipid-rich meal. At baseline, both groups were statistically similar regarding clinical, metabolic and vascular aspects. At the end of the study, the group treated with vildagliptin for 30 days presented an improvement in endothelium-dependent (P=0.03) and independent vasodilatation (P=0.02) measured by venous occlusion plethysmography (POV), as well as a better vasomotricity, assessed by laser-Doppler flowmetry (LDF) (P<0.05) during the postprandial period (PP) (P<0.05). The metformin group showed better microvascular reactivity in fasting period after 30 days of treatment (P<0.05) and also during PP (P<0.05). We concluded that both drugs used in treatment-naïve patients during short-term period were capable of improving vascular function through distinct and complementary mechanisms of action on vascular function. While vildagliptin acted preferentially on vessels related to peripheral vascular resistance, metformin improved nutritional microflow at capillary level. Thus, both drugs are able to act in the improvement of endothelial function in patients with early-stage T2D, preventing the vascular insult that the disease is able to develop in the long term period. Effects that go beyond simple glycemic control.

Keywords: Obesity. Type 2 diabetes mellitus. Endothelial dysfunction. Postprandial lipemia.

Vildagliptin.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 -  | Etapas do estudo.....  | 34 |
| Figura 2 -  | Sequência de exames na avaliação da função endotelial e sobrecarga lipídica .....                  | 37 |
| Figura 3 -  | Posicionamento dos artefatos técnicos para a realização da pletismografia por oclusão venosa ..... | 39 |
| Figura 4 -  | Videocapilaroscopia do leito periungueal .....   | 41 |
| Figura 5 -  | Fluxograma das pacientes do estudo .....   | 44 |
| Gráfico 1 - | Comparação de fluxo sanguíneo do antebraço em ambos os grupos após o tratamento .....              | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabela 1 -  | Comparação clínica, laboratorial e microcirculatória entre os grupos vildagliptina e metformina em estado basal.....  | 45 |
| Tabela 2 -  | Comparação entre os efeitos da vildagliptina e metformina na reatividade vascular aos 30 dias de tratamento.....  | 48 |
| Tabela 3 -  | Efeitos da vildagliptina e metformina na reatividade vascular após a ingestão de refeição rica em lipídeos em pacientes com DM2 virgens de tratamento .....                                     | 48 |
| Tabela 4 -  | Comparação da vasomotricidade entre os grupos vildagliptina e metformina ao início do recrutamento e durante o período pós-prandial....   | 49 |
| Tabela 5 -  | Comparação da vasomotricidade entre os grupos vildagliptina e metformina durante o período pós-prandial.....  | 51 |
| Tabela 6 -  | Efeitos da vildagliptina sobre a vasomotricidade durante o período pós-prandial após a ingestão de refeição rica em lipídeos em pacientes DM2 virgens de tratamento.....                        | 53 |
| Tabela 7 -  | Efeitos da metformina sobre a vasomotricidade durante o período pós-prandial após a ingestão de refeição rica em lipídeos em pacientes DM2 virgens de tratamento.....                           | 55 |
| Tabela 8 -  | Efeitos da vildagliptina e metformina sobre o perfil lipídico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais após trinta dias de tratamento medicamentoso (análises inter e intragrupo)..... | 57 |
| Tabela 9 -  | Efeitos da vildagliptina e metformina sobre o perfil lipídico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais após ingestão de refeição rica em lipídeos.....                                 | 59 |
| Tabela 10 - | Efeitos colaterais relatados durante o estudo.....  | 60 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |  |
|---------|--|
| ADA     | <i>American Diabetes Association</i>                                   |
| AG      | Ácidos graxos  |
| AGL     | Ácidos graxos livres   |
| AGS     | Ácidos graxos saturados  |
| AGM     | Ácidos graxos monoinsaturados  |
| AGP     | Ácidos graxos poliinsaturados  |
| ALT     | Alanina aminotransferase   |
| APO     | Apolipoproteínas   |
| APO-B48 | Apolipoproteína B 48   |
| AST     | Aspartatoaminotransferase  |
| BIA     | Bioimpedância  |
| BioVasc | Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular |
| CA      | Circunferência abdominal   |
| CD-26   | Cluster de diferenciação 26  |
| CQ      | Circunferência do quadril  |
| CS      | Coleta de sangue   |
| CT      | Colesterol total   |
| CV      | Coefficiente de variação   |
| DCF     | Densidade capilar funcional  |
| DM2     | Diabetes Mellitus Tipo 2   |
| DPP-4   | Dipeptidilpeptidase4   |
| DPP     | <i>Diabetes Prevention Program</i>                                     |
| EDHF    | <i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>                      |
| eNOS    | <i>Endothelial Nitric oxide synthase</i>                               |
| FC      | Frequência cardíaca  |
| FL      | Fosfolípidos   |
| FMD     | Dilatação mediada pelo fluxo   |
| FSA     | Fluxo sanguíneo do antebraço   |
| GIP     | <i>Glucose-dependent insulintropic peptide</i>                         |
| GLP-1   | <i>Glucagon-like peptide-1</i>   |
| HAS     | Hipertensão Arterial Sistêmica   |

|        |  |
|--------|--|
| HbA1c  | Hemoglobina glicosilada                    |
| HDL    | <i>High densitylipoprotein</i>             |
| HUPE   | Hospital Universitário Pedro Ernesto       |
| HRPO   | Hiperemia reativa pós-oclusão              |
| ICAM-1 | <i>Intercellularadhesion molecule-1</i>    |
| IDL    | <i>Intermediatedensitylipoprotein</i>      |
| IL-1   | Interleucina1                              |
| IL-6   | Interleucina6                              |
| IMC    | Índice de massa corporal                   |
| LabLip | Laboratório de Lípides                     |
| LDF    | Laser Doppler Fluxometria                  |
| LDL    | <i>Low density lipoprotein</i>             |
| LLP    | Lipase lipoproteína                        |
| LP     | Lipoproteínas                              |
| LPL    | Lipoproteína lipase                        |
| LPP    | Lipemia pós-prandial                       |
| NEFA   | Ácidos graxos não esterificados            |
| NFkB   | <i>Nuclear fator kappaB</i>                |
| NO     | <i>Nitric oxide</i>                        |
| NTG    | Nitroglicerina                             |
| OMS    | Organização Mundial de Saúde               |
| PA     | Pressão arterial                           |
| PAI-1  | <i>Plasminogenactivator inhibitor-1</i>    |
| PAS    | Pressão arterial sistólica                 |
| PCR    | Proteína C reativa                         |
| POF    | Pesquisa de orçamentos familiares          |
| POV    | Pletismografia por oclusão venosa          |
| PP     | Pós-prandial                               |
| PPC    | Policlínica Piquet Carneiro                |
| PYY    | Polipeptídeo YY                            |
| QM     | Quilomícron                                |
| RCQ    | Relação cintura/quadril                    |
| TCLE   | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TOTG   | Teste oral de tolerância à glicose         |

|              |   |
|--------------|---|
| TG           | Triglicerídeos                            |
| TNF $\alpha$ | <i>Tumor necrosis factor alpha</i>        |
| UERJ         | Universidade do Estado do Rio de Janeiro  |
| VCAM-1       | <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>  |
| VEGF         | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VLDL         | <i>Very low density lipoprotein.</i>      |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|          |                              |
|----------|------------------------------|
| B        | Beta                         |
| $\alpha$ | Alfa                         |
| %        | Porcentagem                  |
| <        | Menor que                    |
| $\gamma$ | Gama                         |
| $\kappa$ | Kappa                        |
| mg       | Miligrama                    |
| /        | Divisão                      |
| dL       | Decilitro                    |
| g        | Grama                        |
| cm       | Centímetro                   |
| kg       | quilograma                   |
| =        | Igual a                      |
| $\times$ | Multiplicação                |
| -        | Subtração                    |
| Kcal     | Quilocaloria                 |
| $\mu$ M  | Micromolar                   |
| mL       | Mililitro                    |
| min      | Minuto                       |
| pM       | Picomolar                    |
| pg       | Picograma                    |
| ng       | Nanograma                    |
| -        | Menos (ou Subtração)         |
| °C       | Graus Celsius                |
| mm       | Milímetro                    |
| $\mu$ L  | Microlitro                   |
| nm       | Nanômetro                    |
| mM       | Milimolar                    |
| $\mu$ UI | Microunidades internacionais |
| mmol     | Milimol                      |

|               |                       |
|---------------|-----------------------|
| $\mu\text{g}$ | Micrograma            |
| $\pm$         | Mais ou menos         |
| Hz            | Hertz                 |
| mmHg          | Milímetro de mercúrio |
| $\Delta$      | Delta                 |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
|       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| 1     | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | 18 |
| 1.1   | <b>A resistência insulínica na gênese do DM2</b> .....   | 18 |
| 1.1.1 | <u>O tecido muscular esquelético e a RI no estado pós- prandial</u> .....                                  | 19 |
| 1.1.2 | <u>A resistência hepatocelular e os efeitos sobre a glicemia de jejum</u> .....                            | 19 |
| 1.1.3 | <u>O tecido adiposo na patogênese do diabetes</u> .....  | 20 |
| 1.2   | <b>A lipemia pós-prandial e seus efeitos nas desordens metabólicas</b> .....                               | 21 |
| 1.2.1 | <u>O metabolismo lipídico e o estado inflamatório pós-prandial</u> .....                                   | 21 |
| 1.2.2 | <u>A disfunção endotelial na gênese das desordens metabólicas</u> .....                                    | 22 |
| 1.2.3 | <u>O papel das incretinas no controle glicêmico, LPP e vasoreatividade</u> .....                           | 24 |
| 1.2.4 | <u>O papel das incretinas na lipemia pós-prandial e função endotelial</u> .....                            | 25 |
| 1.3   | <b>As terapias farmacológicas no DM2 e seus efeitos sobre as incretinas, LPP e função endotelial</b> ..... | 26 |
| 1.3.1 | <u>Os inibidores da molécula DPP4 como estratégia terapêutica</u> .....                                    | 27 |
| 2     | <b>HIPÓTESE</b> .....  | 28 |
| 3     | <b>OBJETIVOS DO ESTUDO</b> .....   | 29 |
| 3.1   | <b>Objetivos primários</b> .....   | 29 |
| 3.2   | <b>Objetivos secundários</b> .....   | 29 |
| 3.2.1 | <u>Objetivos no estado pré-absortivo</u> .....   | 29 |
| 3.2.2 | <u>Objetivos no estado pós-absortivo</u> .....   | 29 |
| 4     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 30 |
| 4.1   | <b>Desenho do estudo</b> .....   | 30 |
| 4.2   | <b>Local da realização do estudo e aspectos éticos</b> .....   | 30 |
| 4.3   | <b>Participantes</b> .....   | 30 |
| 4.4   | <b>Critérios de inclusão</b> .....   | 31 |
| 4.5   | <b>Critérios de exclusão</b> .....   | 31 |
| 4.6   | <b>Avaliação médica</b> .....  | 32 |
| 4.7   | <b>Seleção das pacientes nos dois grupos</b> .....   | 33 |
| 4.8   | <b>Terapêutica</b> .....   | 33 |
| 4.9   | <b>Seguimento das voluntárias</b> .....  | 33 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.10  | <b>Etapas do estudo</b> .....  | 34 |
| 4.11  | <b>Descrição dos exames realizados</b> .....   | 34 |
| 4.12  | <b>Dados técnicos de processamento das amostras</b> .....  | 35 |
| 4.13  | <b>Caracterização da sobrecarga lipídica</b> .....   | 37 |
| 4.14  | <b>As etapas de avaliação microvascular e endotelial antes e após a sobrecarga lipídica</b> .....  | 37 |
| 4.15  | <b>Pletismografia por oclusão venosa</b> .....   | 38 |
| 4.16  | <b>A avaliação da reatividade microvascular</b> .....  | 40 |
| 4.17  | <b>O estudo da vasomotricidade</b> .....   | 41 |
| 4.18  | <b>Análise estatística</b> .....   | 43 |
| 5     | <b>RESULTADOS</b> .....  | 44 |
| 5.1   | <b>Características basais</b> .....  | 45 |
| 5.2   | <b>Avaliação da função endotelial (pletismografia)</b> .....   | 46 |
| 5.3   | <b>Avaliação da reatividade microvascular</b> .....  | 47 |
| 5.3.1 | <u>Reatividade vascular em estado basal após trinta dias de tratamento (efeitos crônicos)</u> .....  | 47 |
| 5.3.2 | <u>Reatividade vascular após sobrecarga lipídica (efeitos agudos)</u> .....  | 48 |
| 5.4   | <b>Vasomotricidade</b> .....   | 49 |
| 5.5   | <b>Perfil lipídico e glicêmico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais</b> .....   | 56 |
| 5.5.1 | <u>Perfil lipídico e glicêmico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais em estado basal após trinta dias de tratamento (efeitos crônicos)</u> .....                   | 56 |
| 5.5.2 | <u>Perfil lipídico e glicêmico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais após sobrecarga lipídica (efeitos agudos)</u> .....   | 58 |
| 5.6   | <b>Eventos adversos</b> .....  | 60 |
| 6     | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 61 |
| 6.1   | <b>Os efeitos distintos promovidos pela vildagliptina e metformina sobre a função endotelial em estado basal</b> .....   | 62 |
| 6.2   | <b>Os efeitos promovidos pela vildagliptina e metformina no período pós-prandial sobre a função endotelial e perfil lipídico</b> .....   | 64 |
| 6.3   | <b>Os efeitos promovidos pela vildagliptina e metformina sobre os níveis glicêmicos, marcadores inflamatórios, peptídeos intestinais e demais parâmetros metabólicos</b> ..... | 67 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 7   | <b>RESUMO DOS ACHADOS</b> .....  | 70  |
| 7.1 | <b>Efeitos agudos após sobrecarga lipídica</b> .....   | 70  |
| 7.2 | <b>Efeitos em curto-prazo após terapia farmacológica por trinta dias</b> .....   | 70  |
|     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 72  |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 73  |
|     | <b>APÊNDICE A</b> – Effects of vildagliptin and metformin on microvascular function, low-grade inflammation, plasma viscosity, gastrointestinal peptides and oxidative stress during post-prandial state on obese women recently diagnosed with type 2 diabetes: a randomized head-to-head study (1º artigo submetido) ..... | 84  |
|     | <b>APÊNDICE B</b> – Short-term extra-glycemic effects of vildagliptin on vascular function, inflammatory and oxidative stress biomarkers, and intestinal peptides on treatment-naïve obese type 2 diabetes women: a randomized head-to-head metformin-controlled study (2º artigo submetido) .                               | 102 |
|     | <b>ANEXO A</b> - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE.....   | 119 |
|     | <b>ANEXO B</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....   | 120 |
|     | <b>ANEXO C</b> – Divulgação do Projeto .....   | 123 |

## INTRODUÇÃO

As modificações comportamentais ocorridas no mundo globalizado nas últimas décadas provocaram profundas transformações nos hábitos da sociedade, trazendo grande impacto na qualidade de vida e hábitos alimentares da população. Tais alterações podem ser facilmente observadas no nosso cotidiano.

Nos Estados Unidos da América houve um aumento considerável no número de obesos nos últimos 15 anos, acometendo um terço da população geral. A Europa também apresenta níveis crescentes de obesidade, sobretudo no território oriental (1). Em âmbito nacional, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008/2009) revelou que nos últimos 30 anos houve um aumento na prevalência de obesidade de quatro vezes na população feminina e de duas vezes na masculina (2). Dados provenientes da pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel 2016) realizada pelo Ministério da Saúde, mostram que a obesidade cresceu em 60% nos últimos 10 anos analisados. Em 2006, quando os dados começaram a ser coletados o índice era de 11,8% (3). Vários estudos epidemiológicos de acompanhamento em longo prazo têm demonstrado que a obesidade está fortemente associada à uma prevalência maior de desfechos negativos (morbidade e mortalidade) por todas as causas, incluindo doenças crônicas, tais como: hipertensão arterial sistêmica (HAS), apneia obstrutiva do sono, neoplasias, doenças osteoarticulares e sobretudo, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esta última, sendo considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença cardiovascular (4;5).

Contrária à essa observação, a perda de peso está associada com uma redução significativa no risco de desenvolvimento de DM2. Ao acompanhar 3.000 indivíduos obesos e intolerantes à glicose, o estudo multicêntrico Diabetes PreventionProgram (DPP) demonstrou que indivíduos que modificaram seu estilo de vida de forma intensa reduziram o risco de desenvolver diabetes em 58%; ao passo que o grupo que empregou apenas o uso de metformina teve seu risco reduzido em 31% (6).

As modificações comportamentais relatadas, geram consequências deletérias na saúde individual, além de gerar impacto negativo sobre as políticas de saúde pública e a produtividade econômica do país. Faz-se necessário dessa forma, o desenvolvimento de estudos com novas intervenções terapêuticas que sejam capazes de reduzir a sua incidência bem como evitar ou reduzir o risco de comorbidades associadas à obesidade.

## 1 - REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 – A resistência insulínica na gênese do DM2

Tamanha é a interdependência entre a obesidade e o diabetes, que o termo “diabesidade” foi criado. A migração entre o paciente puramente obeso, ao paciente obeso e diabético ocorre através de um defeito progressivo na secreção de insulina pela célula beta-pancreática, aliado ao aumento da resistência insulínica nos tecidos periféricos. Ambas ocorrem de forma precoce e sustentada, havendo piora progressiva a medida em que o diabetes se instala (7).

A homeostasia da glicose é um processo fino e bem ajustado, cujo deflagrador inicial é a liberação de insulina pelas células beta-pancreáticas durante uma refeição. Nesse momento observamos a ação da insulina sobre os diversos órgãos e tecidos promovendo resumidamente: captação de glicose pelo tecido muscular esquelético para consumo próprio, captação e armazenamento de glicose pelo tecido hepático sob a forma de glicogênio, efeito sobre o sistema nervoso central através de mediadores humorais que são capazes de regular o sistema de fome e saciedade, além da ação promovida sobre o tecido adiposo, estimulando a captação de ácidos graxos sob a forma de reserva energética. Ressalta-se ainda, a importância dos efeitos das incretinas, entre elas o polipeptídeo glucagon símile - 1 (GLP1) e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), produzidas no tubo digestivo fundamentais na amplificação da liberação de insulina, bem como proteção das células beta-pancreáticas(8). Este mecanismo de regulação é conhecido como eixo entero-insular.

Quando o mecanismo homeostático de controle glicêmico exposto acima sofre modificações, deflagra-se o início do diabetes. Faz-se necessário dessa forma, entender como esse processo de resistência à insulina ocorre, para que medidas terapêuticas eficazes sejam aplicadas impedindo a progressão da doença.

### 1.1.1 - Tecido muscular esquelético e a resistência insulínica no estado pós-prandial

Apesar da disfunção da célula beta-pancreática ser a condição fundamental para o desenvolvimento do DM2, a resistência insulínica presente no tecido muscular esquelético parece ser o defeito inicial que precederia a falência pancreática (9).

Após a ingestão de uma refeição mista ou de uma sobrecarga glicêmica, a hiperinsulinemia suprime a produção hepática de glicose, bem como estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Logo após sua internalização no tecido muscular, a glicose captada poderá ser oxidada e metabolizada em energia pela via glicolítica primária (controlada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase); ou ainda, ser armazenada sob a forma de glicogênio (regulada pela enzima glicogênio sintase). Aproximadamente 75% da glicose internalizada é metabolizada de forma não oxidativa, sendo que o defeito na síntese de glicogênio no tecido muscular, seria na realidade, um dos primeiros defeitos metabólicos na gênese do diabetes(10).

À medida que a resistência insulínica progride e a captação muscular de glicose diminui, a glicemia pós-prandial eleva-se, exigindo um estado de hiperinsulinemia cada vez maior, porém ineficaz para manter a homeostasia da glicose. Com isso, faz-se necessário um maior tempo para que os níveis glicêmicos retornem ao normal após cada refeição. Com a progressão do quadro, esse mecanismo compensatório entra em exaustão, culminando com o descontrole glicêmico inclusive no estado basal (hiperglicemia em jejum) (9).

### 1.1.2 - A resistência hepatocelular e os efeitos sobre a glicemia de jejum

Aproximadamente 85% da glicose endógena deriva do tecido hepático, sendo que os 15% remanescentes são provenientes do metabolismo renal. A gliconeogênese e glicogenólise contribuem de forma igualitária, na manutenção basal da produção hepática de glicose (10).

No estado pós-absortivo o tecido hepático íntegro produz uma taxa contínua de glicose de aproximadamente 2,0 mg/kg/min, essencial para atender as necessidades do sistema nervoso central (SNC) nos períodos de jejum, uma vez que seu consumo ocorre de forma constante e insulino-independente (10).

Indivíduos portadores de DM2 com hiperglicemia de jejum leve (menor que 140mg/dl) são capazes de suprimir a produção hepática de glicose através da hiperinsulinemia compensatória. Já naqueles indivíduos que apresentam hiperglicemia de jejum moderada a grave (maior que 140mg/dl), a secreção aumentada de insulina no espaço portal não é capaz de suprimir a gliconeogênese hepática; ocorrendo dessa forma, um incremento na sua produção de glicose em aproximadamente 0,5 mg/kg/min. Com isso, duas fontes de produção de glicose se sobrepõem, perpetuando o estado de hiperglicemia (10).

### 1.1.3 - O tecido adiposo na patogênese do diabetes

Em situação fisiológica, os ácidos graxos livres são estocados sob a forma de triglicerídeos no tecido adiposo, servindo de reserva energética nos períodos de jejum. Esse processo de armazenamento é mediado pela ação estimulatória da insulina sobre a enzima lipase-lipoproteica, além da inibição da enzima lipase hormônio sensível, presentes na membrana celular dos adipócitos; ambas envolvidas no processo de captação e liberação celular de ácidos graxos (11).

Nos indivíduos obesos não diabéticos, a resistência insulínica também é consequência indireta do acúmulo excessivo de ácidos graxos no tecido adiposo, provenientes da dieta rica em gorduras. Perpetuando-se esse estado, a captação de ácidos graxos pelo adipócito torna-se sobrecarregada e ineficiente, aumentando a disponibilidade deste produto ao tecido muscular.

Este, por sua vez, passa a utilizar os ácidos graxos livres como fonte de energia, em detrimento à oxidação de glicose proveniente do glicogênio muscular. Esse processo em última análise, leva à redução da captação e armazenamento muscular de glicose, por inibição da enzima glicogênio-sintase, perpetuando o estado de resistência insulínica (7).

Indivíduos obesos e, especialmente diabéticos, apresentam níveis séricos elevados de ácidos graxos livres que não são totalmente suprimidos pela insulina no período pós-prandial (PP) (10). Estudos experimentais são capazes de demonstrar que a administração venosa de lipídeos é capaz de induzir um estado de resistência insulínica em indivíduos normoglicêmicos(12); assim como a sua redução é capaz de melhorar a sensibilidadeinsulínica em indivíduos obesos e diabéticos (13).

Sabemos ainda que as mudanças provocadas no perfil lipídico após a ingestão alimentar, conhecida como lipemia pós-prandial (LPP), é um fator capaz de influenciar de forma direta

os níveis séricos de ácidos graxos. Esse mecanismo, portanto, seria capaz de deflagrar e/ou agravar o processo de resistência insulínica, quando presente de forma sustentada e exagerada (10).

## **1.2– A lipemia pós-prandial e seus efeitos nas desordens metabólicas**

O consumo excessivo de alimentos ricos em gordura presentes na alimentação contemporânea é o maior responsável pelo aumento exagerado dos níveis séricos de triglicerídeos no período pós-prandial (14). Curiosamente, os estudos disponíveis na literatura que associam perfil lipídico e risco cardiovascular foram conduzidos em sua maioria no período de jejum. Entretanto, desde 1979 Zilversmit já sugeria que o processo de aterosclerose ocorria sobretudo no período PP (15). Desde então, alguns estudos observacionais foram conduzidos e fortaleceram relação entre lipemia pós-prandial (LPP) e aumento do risco cardiovascular (16-18).

### 1.2.1 – O Metabolismo lipídico e o estado inflamatório pós-prandial

A lipotoxicidade induzida pela dieta é um termo comumente utilizado para descrever as desordens provocadas aos órgãos alvo durante a exposição a determinados derivados lipídicos. Primeiramente este processo foi identificado no contexto de resistência insulínica, entretanto, vem sendo cada vez mais relacionado a uma gama de doenças crônicas e desordens inflamatórias (19).

Os triglicerídeos (TG) provenientes da dieta são absorvidos pelo intestino delgado, transportados pelo sistema linfático e conduzidos à circulação sanguínea sob a forma de quilomícrons (QM), acoplados à apolipoproteína B48 (Apo-B48). Após uma refeição rica em lipídeos, os níveis de QM elevam-se, gerando um pico sérico de triglicerídeos em aproximadamente quatro horas após a refeição(20). Quando presentes na circulação sanguínea, interagem com a lipoproteína de alta densidade ou HDL (do inglês, high-densitylipoprotein), incorporando à sua composição moléculas de colesterol, além das apolipoproteínas C-II, C-III e E. Ao adquirirem a Apo-CII, os QM sofrem ação da enzima

lipase-lipoproteica presente no endotélio capilar, havendo hidrólise das moléculas de TG e consequente incorporação de ácidos graxos livres nos tecidos periféricos (tecido adiposo e muscular). Os remanescentes desse processo, ricos em colesterol e pobres em TG são removidos pelo fígado. Dessa forma, em condições normais só devemos encontrar a presença de QM no período PP (21).

Em situações fisiológicas, o tecido hepático também é responsável pela liberação de TG na circulação, através da secreção das lipoproteínas de muito baixa densidade ou VLDL (do inglês, *verylowdensitylipoprotein*), para que essas lipoproteínas também sejam aproveitadas pelos tecidos periféricos. Após sua depleção, tais moléculas tornam-se menos densas, formando seus remanescentes de densidade intermediária ou IDL (do inglês, *intermediar densitylipoprotein*), que podem seguir dois caminhos: serem removidas pelo fígado (via receptor específico que interagem com a Apo-E) ou originar a lipoproteína de baixa densidade ou LDL (do inglês, *lowdensitylipoprotein*), que é o principal carreador plasmático de colesterol em jejum, o qual será ofertado ao fígado e aos tecidos periféricos (via Apo B-100) (21).

Embora 80% da elevação nos níveis de TG se deva aos efeitos dos QM provenientes da dieta, parte dessas alterações também deriva das partículas de VLDL oriundas do fígado. Ambas, por sua vez, competem pela lipase-lipoproteica durante o processo de captação pelos tecidos, cuja capacidade enzimática é limitada. Consequentemente, é possível observar uma piora da lipemia pós-prandial quando estas lipoproteínas encontram-se em excesso na circulação sanguínea(20)como, por exemplo, após ingestão de dietas ricas em gorduras.

### 1.2.2 – A disfunção endotelial na gênese das desordens metabólicas

As células endoteliais são fortemente susceptíveis aos efeitos dos metabólitos lipídicos provenientes das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (QM e VLDL). Estudos utilizando a hiperalimentação em animais foram capazes de demonstrar que uma dieta rica em colesterol e ácidos graxos altera o processo de peroxidação lipídica, causando modificações estruturais nos fosfolípidos de membrana e integridade celular, peças chave no processo de regulação da inflamação e da disfunção endotelial (22).

As células endoteliais secretam vários mediadores que regulam a agregação plaquetária, coagulação, fibrinólise e o tônus vascular, secretando uma combinação de agentes



vasoconstrictores como a endotelina-1 e tromboxano A2 que se contrapõem à liberação de substâncias vasodilatadoras, tais como o óxido nítrico (NO; do inglês, *nitric oxide*), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio também conhecido como EDHF (do inglês, *Endothelium-DerivedHyperpolarizingFactor*), este último ainda não caracterizado(23). Quando bem integrados, estas substâncias possuem papel fundamental na regulação do tônus vascular e aporte sanguíneo aos diversos órgãos e tecidos, sendo capazes de manter a homeostasia vascular(24). O termo disfunção endotelial por sua vez, refere-se a um desequilíbrio desses mediadores que, em última análise, irão promover vasoespasmo e trombose, implicados na patogênese da doença aterosclerótica, em especial coronariana(25).

Para a manutenção da integridade do endotélio, o NO é, sem dúvida, o mais importante mediador das funções endoteliais como agente anti-agreganteplaquetário, anti-coagulante e vasodilatador (24) conferindo proteção vascular. Este agente é sintetizado a partir do seu precursor, a L-arginina e seu processo de síntese endotelial é catalisado pela isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (eNOS; do inglês, *nitric oxide synthase*) cujo cofator principal é tetrahidrobiopterina. Ao ser sintetizado e liberado, difunde-se pela camada muscular lisa e liga-se à enzima guanilatociclase solúvel, estimulando a produção do segundo mensageiro chamado guanosinomonofosfato cíclico (GMPc), que induz o relaxamento da camada muscular e subsequente vasodilatação (24).

A atividade da eNOS e aumento da biodisponibilidade/produção de NO pode ser estimulada por diversos fatores: exercício físico (26), fator de crescimento derivado do endotélio, também conhecido comoVEGF(do inglês, *vascular endothelial growthfactor* (27), insulina (28), acetilcolina, bem como através do estímulo pelo estresse de cisalhamento (ou do inglês, *shear stress*) (24). Em contrapartida, sua produção está reduzida em situações como hipóxia tecidual (29), hiperglicemia (30) ou na presença de altos níveis de TNF $\alpha$ (do inglês, *tumor necrosisfactor alpha*)ou partículas de LDL oxidadas(31).

A LPP também é capaz gerar dano endotelial ao induzir a ativação leucocitária com concomitante produção de substâncias pró-inflamatórias (32), bem como induzir a ativação de monócitos em macrófagos ativos por intermédio da via NF $\kappa$ B (do inglês, *nuclear factor Kappa  $\beta$* ), constituindo fatores importantes na gênese precoce da aterosclerose (33). Podemos ainda citar a influência do sistema de complemento na disfunção endotelial secundária à LPP, uma vez que os QM são as partículas mais potentes na produção de complemento C3 pelos adipócitos, ao ativar a via alternativa da cascata de complemento durante o processo de lipólise (19).

Enquanto os efeitos deletérios promovidos pela LPP são muito bem documentados, pouco se sabe a respeito dos benefícios que o seu tratamento poderia trazer. Portanto, nos parece importante o desenvolvimento de estudos que busquem avaliar o emprego de drogas capazes de agir de forma conjugada sobre a LPP e os demais fatores responsáveis pela resistência insulínica, assegurando dessa forma, uma terapia capaz de atuar nos diversos mecanismos implicados no desenvolvimento e progressão do diabetes, além de suas repercussões no endotélio.

### 1.2.3 – O papel das incretinas no controle glicêmico, LPP e vasoreatividade

Inúmeros estudos que buscaram avaliar o processo de digestão alimentar e sua relação com a liberação de insulina observaram que os níveis desse hormônio eram bem maiores durante a administração de glicose por via oral quando comparados à sua infusão por via venosa, atribuindo-se tal amplificação à mediadores intestinais, até então desconhecidos, e que posteriormente, foram denominados de incretinas(34).

Em 1970, conseguiu-se identificar pela primeira vez a presença do mediador intestinal polipeptídeoinsulínico glicose-dependente (GIP; do inglês *gastric inhibitory polypeptide*), composto por 42 aminoácidos produzido pelas células K localizadas na porção proximal do intestino delgado, cujo principal estímulo à sua liberação é a ingestão alimentar(35). Após alguns anos, um segundo peptídeo estruturalmente semelhante ao glucagon e tendo também atividade incretínica foi identificado e classificado como o peptídeo glucagon símile-1 (GLP-1; do inglês *glucagon like peptide 1*) (36). Produzido pelas células L da porção distal do intestino delgado e proximal do cólon, seus níveis também são elevados imediatamente após a ingestão alimentar, sugerindo, dessa forma, que tanto fatores endócrinos quanto neurais participem ativamente da sua liberação, já que muito antes que o alimento entre em contato direto com as células enteroendócrinas L já há produção e liberação do GLP-1 (8).

Tanto o GLP-1 quanto o GIP são capazes de estimular a liberação de insulina, ao agirem em seus receptores localizados nas células beta-pancreáticas. Entretanto, o GLP-1 também é capaz de exercer seus efeitos incretínicos ao inibir a secreção de glucagon e ao estimular a liberação de somatostatina pelas células alfa e delta-pancreáticas, respectivamente (37). Estudos em cobaias também mostram que o agonismo aos receptores incretínicos também são capazes de estimular a proliferação celular, preservar a integridade da célula  $\beta$  ao

inibir vias apoptóticas mediadas pelas caspases(38;39), bem como inibir o esvaziamento gástrico, além de estimular a saciedade ao agir no SNC (8).

Sabemos hoje em dia, que a potência do GLP-1 bem como a sua liberação encontram-se reduzidas nos indivíduos diabéticos. Questiona-se sua relação como causa ou consequência na etiologia da doença. Muitas observações na realidade sugerem que o prejuízo na ação incretínica seria uma consequência da resistência insulínica e, em última análise, do diabetes (40).

#### 1.2.4 –O papel das incretinas na lipemia pós-prandial e função endotelial

Apesar do grande conhecimento adquirido sobre os efeitos das incretinas no metabolismo glicêmico, bem como da relação entre LPP e risco cardiovascular; poucos estudos na literatura trazem informações sobre estes hormônios gastrointestinais e seus efeitos sobre o metabolismo lipídico.

Estudos realizados em cobaias são capazes de demonstrar influência do GLP-1 sobre a absorção intestinal de lipídeos e consequente efeito sobre a LPP. Ao infundir uma solução lipídica por cateterização duodenal em cobaias, XiaofaQin e colaboradores conseguiram demonstrar que a administração de GLP-1 recombinante foi capaz de gerar uma redução no fluxo linfático intestinal, diminuiu a absorção de triglicerídeos, além de reduzir a produção de apolipoproteínas (Apo B e Apo AIV). O fluxo linfático na musculatura esquelética é altamente dependente da contração muscular voluntária. De forma análoga, os autores sugerem que a lentificação do fluxo linfático intestinal, com consequente influência sobre a LPP, tenha sido precipitada pela redução da motilidade intestinal promovido pelo GLP-1 (41).

Ao avaliar os efeitos sobre a LPP promovidos pela infusão de GLP-1 venoso em comparação ao placebo em indivíduos saudáveis e eutróficos, Meier e colaboradores evidenciaram uma supressão completa na elevação dos níveis de TG após a ingestão de uma refeição mista(42). Curiosamente, a infusão de GLP-1 também foi capaz de gerar níveis séricos mais baixos de ácidos graxos livres tanto no período pós-prandial quanto no jejum. Segundo o autor, os resultados acima descritos no período de jejum não são puramente justificados pela lentificação no trânsito gastrointestinal e sugerem que ao amplificar os efeitos insulínicos, o GLP-1 seria capaz de suprimir o processo de lipólise em nível sistêmico(42). Sabe-se ainda, que além de reduzir a motilidade gástrica, o GLP1 também é

capaz de inibir a produção de lipase gástrica pelas células principais do fundo gástrico, havendo um retardo adicional na metabolização de lipídeos proveniente da dieta(43).

Em relação à função endotelial, estudos recentes indicam que o GLP-1 exerceria efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular, de forma independente aos efeitos na glicemia, metabolismo lipídico ou gasto energético(20). Estudos *in vitro* demonstraram que a administração de GLP-1 em cultura de células endoteliais foi capaz de atenuar a ação do TNF $\alpha$  sobre a liberação do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1; do inglês, *plasminogenactivator inhibitor-1*), considerado um potente agente pró-coagulante (44).

De forma abrangente, alguns ensaios clínicos também foram capazes de demonstrar que, além do controle glicêmico, a administração exógena de GLP-1 também foi capaz de reduzir os níveis séricos de peptídeo natriurético atrial, proteína C-reativa e PAI-1 em diabéticos (45), além de atenuar o estresse oxidativo e melhorar a vasodilatação endotélio-dependente (46). Todos esses achados reforçam o conceito de que as incretinas são capazes de promover melhora na função endotelial e nos biomarcadores inflamatórios, conferindo possivelmente proteção vascular independente dos efeitos promovidos no controle glicêmico(47).

### **1.3 – As terapias farmacológicas no diabetes e seus efeitos sobre as incretinas, lpp e função endotelial**

As opções de tratamento no DM2 envolvem o binômio mudança de estilo de vida associado ao emprego de drogas antihiperlipemiciantes que apresentam diferentes mecanismos de ação (antihiperlipemiciantes orais, insulinas e incretinomiméticos) (48).

A metformina é um medicamento oral que faz parte da classe das biguanidas, largamente empregada como terapia farmacológica inicial, cujo mecanismo de ação envolve principalmente a inibição da gliconeogênese hepática, além da melhora da sensibilidade periférica aos efeitos da insulina (48). Curiosamente, alguns estudos também são capazes de demonstrar efeitos adicionais deste medicamento sobre o efeito incretínico. Manucci e colaboradores foram capazes de demonstrar que a administração de metformina a pacientes obesos e normoglicêmicos, por um curto período (14 dias de intervenção), foi capaz de gerar um aumento dos níveis de GLP-1 durante a realização de curva glicêmica(49).

Dados do nosso laboratório também demonstram a ação positiva da metformina sobre a função endotelial. De Aguiar e colaboradores verificaram que a administração de metformina a pacientes com síndrome metabólica euglicêmicos por um período de 90 dias foi capaz de promover uma melhora na reatividade endotelial medida por pletismografia por oclusão venosa (POV) no leito braquial e por videocapilaroscopia do leito periungueal (50;51).

### 1.3.1 – Os inibidores da molécula dipeptidil peptidase 4 (DPP4) como estratégia terapêutica

Também conhecida como Cluster de Diferenciação 26 (CD26), a molécula de DPP4 é uma serinaexopeptidase capaz de inativar inúmeros oligopeptídeos ao remover o segmento N-terminal destas incretinas (52). Normalmente essa enzima encontra-se incorporada à membrana plasmática, com sua porção C-terminal exposta ao meio extracelular. Quando submetida a determinados estímulos, tais como a resistência insulínica e inflamação de baixo grau, a molécula de DPP4 pode ser liberada da membrana plasmática do endotélio, tecido epitelial e leucócitos, tornando-se uma molécula solúvel, mas que conserva sua capacidade enzimática (53).

Por conterem um aminoácido alanina na posição 2, as incretinas são fortemente susceptíveis à degradação promovida pela enzima DPP4, o que ocorre minutos após a sua liberação (8). Diversos estudos são capazes de demonstrar que tanto os níveis séricos (54), quanto a atividade enzimática (55;56) da molécula de DPP4 encontram-se elevados em indivíduos diabéticos, podendo justificar em parte, o estado de deficiência incretínica encontrada nessa doença. A sua inibição por sua vez, é capaz de aumentar a biodisponibilidade incretínica, assegurando uma melhora no controle glicêmico.

## 2 - HIPÓTESE

A atividade enzimática da DPP4 não está envolvida apenas na metabolização das incretinas. Ela também é responsável pela inativação de várias citocinas, quimiocinas e neuropeptídeos envolvidos na inflamação, imunidade e função vascular (57). Essa capacidade reforça a hipótese de que esta enzima pode regular vias envolvidas não apenas na homeostase glicêmica, mas também na resposta inflamatória e função endotelial por mecanismos que sejam independentes à ação das incretinas(53). Em conjunto, estas informações apontam para um possível papel dessa enzima nas doenças cardiovasculares associadas à obesidade e DM2 (58). Dessa forma, é possível que a inibição da enzima DPP4, com consequente elevação dos níveis de GLP1 e GIP, possa melhorar a função endotelial de indivíduos diabéticos, não só por melhorar o controle glicêmico, mas também por promover uma redução na LPP e insulto vascular proveniente deste estado pós-prandial anormal.

### **3 - OBJETIVOS DO ESTUDO**

#### **3.1 Objetivos primários**

Comparar, em estado basal e após sobrecarga lipídica, as ações da vildagliptina e da metformina no recrutamento capilar, na reatividade endotelial e ainda em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes portadoras de obesidade e DM2 virgens de tratamento.

#### **3.2 – Objetivos secundários**

##### **3.2.1 - No estado pré-absortivo**

1. Demonstrar a resposta endotelial e microvascular de pacientes com obesidade e DM2 virgens de tratamento pré e pós-tratamento com vildagliptina e metformina.
2. Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo e de inflamação em paciente com obesidade e DM2 virgens de tratamento antes e após o tratamento com vildagliptina e metformina.

##### **3.2.2 - No estado pós-prandial**

1. Demonstrar a resposta endotelial e microvascular de pacientes com obesidade e DM2 virgens de tratamento durante a sobrecarga lipídica, antes e após o tratamento com vildagliptina e metformina.
2. Avaliar os biomarcadores relacionados à lipemia pós-prandial em pacientes com obesidade e DM2 virgens de tratamento antes e após o tratamento com vildagliptina e metformina.

## **4 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 – Desenho do estudo**

O presente estudo é um ensaio clínico longitudinal aberto, controlado, de curto-prazo, cuja intervenção consistiu no uso da vildagliptina ou metformina como estratégias terapêuticas.

### **4.2 – Local de realização do estudo e aspectos éticos**

Todas as etapas do estudo, incluindo recrutamento e acompanhamento das pacientes, além de exames complementares foram realizadas na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), nos seguintes locais: a) Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular (BioVasc), vinculado ao Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes; b) Ambulatório de Obesidade na Policlínica Piquet Carneiro (PPC), vinculado à Unidade Docente-Assistencial de Endocrinologia, vinculada ao Hospital Universitário Pedro Ernesto e Faculdade de Ciências Médicas e c) Laboratório de Lípidos (LabLip), localizado na PPC.

Em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996, que dispõe as normas de pesquisas em seres humanos, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE (COEP 014/2013 – nº 087.3.2012 – Anexo A).

Todas as voluntárias incluídas no estudo foram previamente esclarecidas acerca de todos os procedimentos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

### **4.3 – Participantes**

Optamos por efetuar o recrutamento apenas de pacientes do sexo feminino, afim de garantir um grupo mais homogêneo, bem como minimizar os fatores de confundimento. O



recrutamento inicial das pacientes foi feito através de divulgação do projeto em meio de comunicação impresso (jornal) ou virtual (internet) - Anexo 5; além de busca ativa de pacientes pelos pesquisadores no ambulatório de Obesidade da PPC. As pacientes obesas e diabéticas eram convidadas a participar do estudo na dependência dos critérios de inclusão e exclusão.

#### **4.4 – Critérios de Inclusão**

1. Índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que  $30\text{kg/m}^2$ ;
2. Diagnóstico de DM2 em período inferior a seis meses;
3. Estar virgem de qualquer tratamento para o DM2;
4. Idade entre 19 a 50 anos;
5. Circunferência abdominal igual ou maior que 80 cm;

#### **4.5 – Critérios de Exclusão**

1. Presença de doença renal crônica (definido por clearance de creatinina inferior a  $60\text{ml/min}$ )(59);
2. Presença de doença coronariana, arterial periférica, hematológica ou hepática identificada através da anamnese dirigida;
2. Presença de hipertrigliceridemia grave ( $>400\text{mg/dL}$ );
3. Fumantes;
4. Perda de massa corporal significativa seis meses anteriores ao estudo (definida como uma perda superior a 10% do peso corporal total);
5. Uso de drogas que possam interferir na microcirculação, tais como aspirina, anticoncepcionais, anticoagulantes e hipolipemiantes orais;
6. Hipertensão não controlada previamente à inclusão do estudo;
7. Mulheres pós-menopausadas.

#### 4.6 – Avaliação médica

As mulheres interessadas na participação no estudo tinham uma consulta agendada onde eram entrevistadas e avaliadas por um médico, atendendo as seguintes etapas:

- Anamnese;
- Exame clínico e avaliação laboratorial: medidas antropométricas de acordo com as diretrizes brasileiras de obesidade (ABESO) (60), avaliando-se o peso, estatura, cálculo do índice de massa corporal(IMC), circunferência abdominal (CA)(61), circunferência de quadril (CQ), cálculo de relação cintura/quadril (RCQ); além da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), exame de região cervical (tireóide e cadeias de linfonodos), aparelhos respiratório e cardíaco, abdome e membros inferiores.

As pacientes que não se encaixavam nos critérios de inclusão, assim como aquelas que apresentavam critérios de exclusão, eram encaminhadas ao ambulatório de Obesidade na Policlínica Piquet Carneiro para subsequente acompanhamento.

Aquelas que preenchiam todos os critérios (excetuando-se o critério de inclusão 2) eram orientadas a realizar os seguintes exames de triagem (com jejum de dez a doze horas): hemograma completo, teste oral de tolerância à glicose com 75 gramas de glicose anidra (TOTG), hemoglobina glicosilada (HbA1c), colesterol total e frações, creatinina, aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT).

Apesar de aferida já nesses exames, a HbA1c foi utilizada como critério de resposta terapêutica naquelas incluídas no estudo e submetidas ao tratamento.

As determinações da gordura corporal e massa muscular por bioimpedância foram realizadas após jejum de doze horas. As pacientes foram ainda orientadas a seguir sua dieta de forma habitual, a não ingerir bebidas alcoólicas e nem realizar atividades físicas nas 24 horas precedentes à avaliação.

Aquelas que foram identificadas como portadoras de DM2 (62) foram incluídas na pesquisa. Nesse momento (início do estudo), foram coletadas amostras sanguíneas nos seguintes tempos: basal e 30, 60, 120 e 180 minutos após a ingestão da refeição-teste para dosagem dos seguintes marcadores: triglicérides, colesterol total e frações, LDL-oxidada, glicemia, insulina, glucagon, GLP-1, GIP, ácidos graxos não esterificados (NEFA), endotelina, TNF- $\alpha$ , interleucina6 (IL-6), adiponectina, resistina e atividade enzimática da DPP4(DPP4atv).

A urina para dosagens dos isoprostanos urinários foi coletada igualmente em período basal.

#### **4.7 – Seleção das pacientes nos dois grupos**

Após realização da primeira fase do estudo (avaliação da microcirculação e marcadores inflamatórios após a sobrecarga lipídica antes do tratamento), as pacientes eram direcionadas de maneira 1:1 em dois grupos: metformina e vildagliptina.

#### **4.8 – Terapêutica**

A metformina foi titulada até a dose de 1700 mg/dia, enquanto a vildagliptina foi usada na dose de 100 mg/dia, ambas pelo período de trinta dias. Com exceção dos antihipertensivos (mantidos nas mesmas doses usadas no início do estudo), outros medicamentos não eram permitidos durante o estudo. Os medicamentos de uso eventual deveriam ser obrigatoriamente comunicados aos médicos responsáveis pelo estudo para o aceite ou não de seu uso durante o período do estudo.

#### **4.9 - Seguimento das voluntárias**

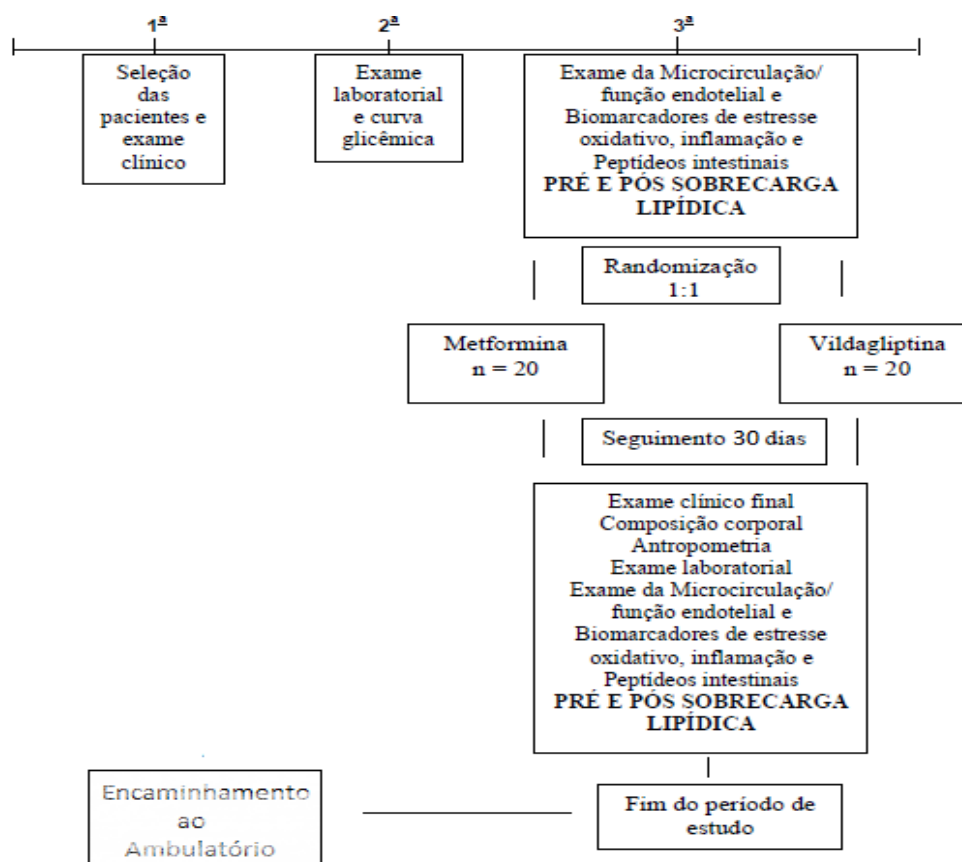
Todas as pacientes recebiam contatos telefônicos da equipe de pesquisadores para o caso de qualquer intercorrência.

Ligações telefônicas semanais e consulta médica presencial quinze dias após o início do tratamento foram realizadas em todas as pacientes. Desta forma, a equipe verificava se o uso dos medicamentos estava sendo feito de forma regular e correta e observava a ocorrência de efeitos colaterais.

#### 4.10 – Etapas do Estudo

A figura 1 demonstra as etapas do estudo de acordo com a sequência metodológica: recrutamento e avaliação clínica, coleta de exames laboratoriais, avaliação da função endotelial das pacientes selecionadas, randomização e seguimento.

Figura 1 - Etapas do estudo



Fonte: A autora, 2018.

#### 4.11 – Descrição dos exames realizados

- Antropometria: o peso corporal (kg) foi medido em balança plataforma (Filizola® com precisão de 100 g); a estatura foi aferida com estadiômetro acoplado à balança (precisão de 0,1 cm); o IMC foi calculado a partir da fórmula matemática: peso (kg) / [altura(m)<sup>2</sup>]; a CA foi

medida em duplicata com fita métrica (precisão de 0,1 cm) no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca durante a expiração; a CQ foi medida em duplicata no ponto de maior circunferência da região glútea e a RCQ foi obtida pela fórmula  $CA/CQ$ .

- Aferição da pressão arterial: foi utilizado um esfigmomanômetro semi-automático (*Spacelabs Medical, Redmond, WA, EUA*) no braço direito com as participantes na posição supina, em repouso, sendo realizada em dois momentos distintos, com pelo menos um minuto de intervalo entre eles.

- Bioimpedância (BIA): A avaliação da composição corporal (massa magra/massa gorda) foi feita em repouso, na posição supina, com o aparelho *Biodynamic 450 BodyCompositionAnalyzer™, BioDynamic Corporation®, SE, EUA*.

- Exames laboratoriais: as amostras de sangue e urina foram coletadas no laboratório BioVasc e processados tanto neste laboratório quanto no laboratório LabLip na PPC. A transferência dessas amostras para o outro local seguiu as normas exigidas.

As amostras para hemograma, bioquímica e TOTG eram processadas e analisadas no mesmo dia. Para as outras análises, alíquotas de plasma eram armazenadas em congelador com temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Essas amostras congeladas eram, em outro momento, descongeladas e analisadas (marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais) no laboratório BioVasc.

#### **4.12 - Dados técnicos de processamento das amostras**

- Hemograma: a contagem de células sanguíneas foi realizada pelo contador de hematologia automatizado XS1000i Sysmex® (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, JPN);

- Bioquímica: as amostras foram processadas por analisador automático *A25 BioSystems®* (*Biosystems S.A., Barcelona, ESP*) para as seguintes dosagens: Glicose, CT, HDL e TG quantificados por métodos de espectrofotometria, a saber, respectivamente: glicose oxidase/peroxidase [Coeficiente de variação (CV) intraensaio: 1,2% e interensaio: 2,7%],

colesterol oxidase/peroxidase (CV intraensaio: 1,1% e interensaio: 1,9%), detergente direto (CV intraensaio: 0,8% e interensaio: 1,3%) e glicerol-3-fosfato/peroxidase (CV intraensaio: 1,7% e interensaio: 2,6%). O LDL foi calculado pela equação matemática proposta por Friedewald(63);

- **Biomarcadores:** os níveis plasmáticos de IL-6 e endotelina-1 foram avaliados pelo ensaio ELISA (EnzymeLinkedImmunsorbent Assam) da Quantikine® High Sensitivity IL-6 e os kits ELISA Quantikine®Endothelin-1, respectivamente (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Para a determinação das concentrações séricas de LDL oxidada foi utilizado o kit ELISA Mercodia (Mercodia, Uppsala, Suécia). Todos os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos do fabricante. Os coeficientes de variação intra e inter-teste foram inferior a 10%. Os níveis ativos de GLP-1 foram analisados pelo método ELISA quimioluminescente de alta sensibilidade (Merck-Millipore, Billerica, MO, EUA). A análise por multiplexing por kits MagneticMilliplex® MAP (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA) foi utilizada para determinar a concentração simultânea de GIP, insulina, C-peptídeo, grelina, leptina, glucagon, polipeptídeo pancreático (PP), polipeptídeo YY (PYY), adiponectina, resistina e TNF- $\alpha$ . Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de <10% e <20%, respectivamente. A avaliação da atividade DPP4 foi realizada usando glicil-prolil-paranitroanilida (Gly-Pro-pNA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) como substrato cromogênico. No final do período de incubação, a atividade de DPP4 nas amostras foi determinada comparando a densidade óptica de cada amostra com a densidade óptica derivada da curva padrão de p-nitroanilina, gerada pelo software de análise de dados (KC Junior, BioTek, Winooski, VT, EUA). Os resultados são expressos como  $\mu\text{M}$  de p-nitroanilina/ml/min. A sensibilidade deste método foi de 0,1  $\mu\text{M}$  / ml/min e o coeficiente de variação intra-teste foi <3%;

- PCR ultrasensível: foi testada pelo analisador automatizado A25 BioSystems® (Biosystems SA, Barcelona, ESPANHA), medida por turbidimetria usando método de látex de alta sensibilidade com analisador automático A25 BioSystems® (Biosystems S.A., Barcelona, ESP) e quantificada por turbidimetria, pelo método látex de alta sensibilidade (CV intraensaio: 1,8 e interensaio: 3,6%).

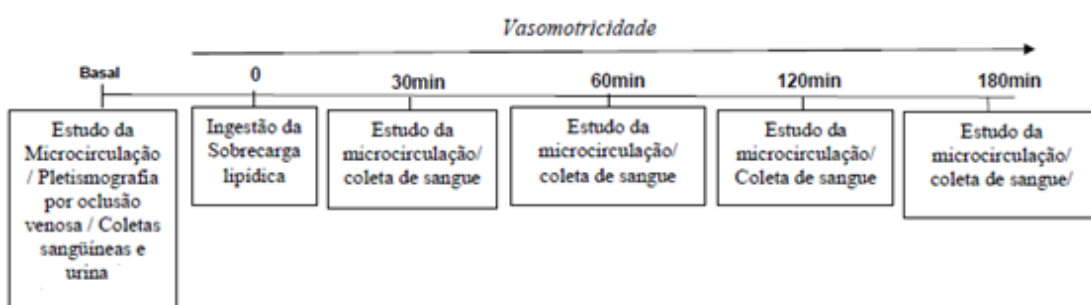
#### 4.13 – Caracterização da sobrecarga lipídica

A sobrecarga lipídica foi obtida através da ingestão de alimentos ricos em gorduras totais, principalmente em gorduras saturadas como leite integral (200ml), achocolatado (10g), margarina (20g), *croissant* (1 unidade), queijo cheddar (60g) e salame (31g) onde: 24,8% são carboidratos, 59,5% gorduras totais (sendo 21,9g de gordura saturada) e 15,7% de proteínas; totalizando 691,5 kcal. Esta refeição foi oferecida às pacientes incluídas no estudo imediatamente após as avaliações basais.

#### 4.14 – As etapas de avaliação microvascular e endotelial antes e após a sobrecarga lipídica

A figura 2 ilustra a sequência de exames realizados para avaliação da função endotelial durante a sobrecarga lipídica

Figura 2 - Sequência de exames durante a avaliação da função endotelial e sobrecarga lipídica



Legenda: minutos (min).

Fonte: A autora, 2018.

#### 4.15 - Pletismografia por oclusão venosa

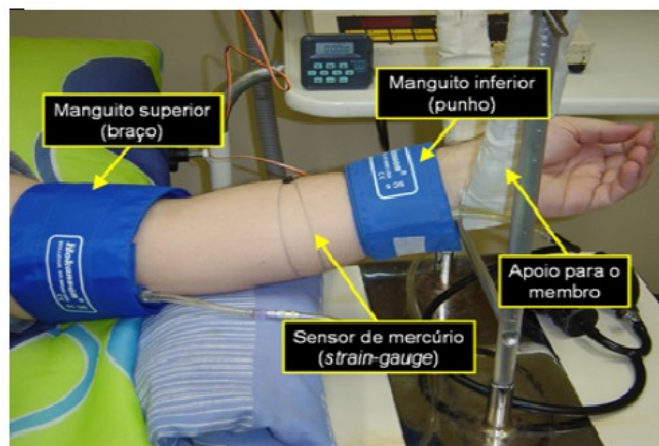
Os exames de pletismografia por oclusão venosa (POV; EC-6; Hokanson, Bellevue, WA, USA) foram feitos com protocolo não-invasivo sempre nos tempos basal (antes da refeição-teste) antes e ao término do período de tratamento.

A POV permite a mensuração do fluxo sanguíneo do antebraço (FSA), como previamente descrito e validado por Aguiar e colaboradores (64). Este método consiste no uso de um elástico de mercúrio, que nada mais é que um sensor de estiramento disposto no maior diâmetro do antebraço, conectado a um pletismógrafo com o intuito de aferir a mudança de volume do antebraço e inferir o FSA. A mão apresenta muitos *shunts* arteriovenosos e isso interfere nas aferições do FSA. Assim, um minuto antes de iniciar as análises, um manguito disposto no punho é insuflado a 200 mmHg para isolar a circulação do plexo palmar.

Para análise do FSA, um bloqueio do retorno venoso na porção proximal do braço é realizado por 10 segundos, pela insuflação de um manguito a 50 mmHg, seguido por um período de 5 segundos de liberação do retorno venoso, quando o manguito permanece desinflado (figura 3). Durante a insuflação do manguito, observa-se um bloqueio ao retorno venoso com manutenção do aporte sanguíneo arterial para o antebraço. Tal fato promove um aumento do volume do antebraço por formação de edema e, conseqüentemente, um estiramento do elástico de mercúrio, interpretado pelo pletismógrafo como uma curva (com a parte ascendente da curva representando o bloqueio do retorno venoso e a parte descendente, a liberação do retorno venoso).



Figura 3 - Posicionamento dos artefatos técnicos para a realização da pletismografia por oclusão venosa



Fonte: A autora, 2018.

A média das quatro primeiras curvas mensuradas foi utilizada para a determinação do FSA ( $\text{ml}/\text{min} \cdot 100 \text{ ml tecido}^{-1}$ ) no repouso (basal1). Para mensurar a vasodilatação endotélio-dependente, uma isquemia arterial de três minutos foi realizada através da insuflação do manguito localizado na região proximal do braço com pressão de 60 mmHg acima da PAS.

Após liberação do manguito, inicia-se a aferição do FSA durante a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO), da mesma maneira descrita para o FSA basal.

Após esta aferição, a participante fica em repouso durante 15 minutos com o intuito de restabelecer a homeostase vascular ao estado de repouso. Posteriormente, realiza-se uma nova aferição do FSA basal (basal2), seguido da avaliação da vasodilatação endotélio-independente. Para tal medida, administra-se por via sublingual 400mcg de nitroglicerina (NTG) sob a forma de spray (NTG - Nitrolingual® pumpspray, Aventis, Auckland, Austrália).

A NTG sublingual apresenta meia-vida de aproximadamente três minutos (65), sendo a medida do FSA realizado no quinto minuto após sua administração (FSANTG). Configuram-se, com isso, quatro tempos de medidas de FSA: basal1, FSA durante HRPO, basal2 e FASNTG. Por fim, a pressão arterial sistêmica foi aferida no membro superior contralateral em todos estes tempos. O equipamento da POV foi conectado a um conversor analógico-digital (PowerLab/8SP, AD instruments, Castle Hill, Australia) e os dados foram analisados pelo programa Power Lab (8SP-AD Instruments, Castle Hill, Australia) em computador IBM® compatível.

Os exames de pletismografia de oclusão venosa foram feitos logo antes e ao término do período de tratamento em ambos os grupos. Essas curvas sofreram tratamento matemático que resulta em medidas de fluxo sanguíneo em ml/min/100mL de tecido (66).

#### **4.16-Avaliação da reatividade microvascular**

Simultaneamente à avaliação laboratorial, as pacientes foram submetidas à videocapilaroscopia dinâmica no tecido cutâneo do dorso do dedo de acordo com metodologia previamente padronizada e validada(67).

Para a realização da videocapilaroscopia, as participantes foram orientadas a permanecer confortavelmente sentadas em uma cadeira fixa de base elevada, com o braço esquerdo erguido ao nível do coração. O antebraço e a mão esquerda, com a face dorsal voltada para cima, foram repousados em um suporte acolchoado (figura 4). O quirodáctilo sob avaliação (terceiro quirodáctilo) foi apoiado em uma base acrílica montada sobre a plataforma de um microscópio *Leica DM LM* (Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemanha), cuja extremidade distal foi gentilmente imobilizada por um grampo, a fim de evitar movimentos indesejados. O microscópio, por sua vez, foi acoplado a uma câmera de vídeo *TK-S250U* (JVC®, Yokohama, Japão). Algumas gotas de óleo de imersão foram aspergidas sobre os sítios de observação, visando reduzir a divergência da luz refletida, determinando uma melhor qualidade de imagem. Um manguito de pressão com 1 cm de largura foi posicionado envolvendo a base da falange proximal do quirodáctilo avaliado e conectado a um manômetro de mercúrio.

O exame foi registrado em vídeo com auxílio do programa *LeicaApplicationSuiteversion 4.4.0* (Leica Microsystems®, Heerbrugg, Suíça), transferidas para a televisão e gravadas em DVD, sendo posteriormente analisadas através do programa *CapIMAGE* (Capintec®, New Jersey, EUA) (68).

Figura 4 - Videocapilaroscopia do leito periungueal



Fonte: A autora, 2018.

Nosso estudo utilizou a videocapilaroscopia do dorso do terceiro quirodáctilo da mão esquerda, a uma distância de 3 mm proximal à cutícula. Esse método permite a verificação da densidade capilar funcional(DCF) no repouso durante 2 min e, após essa medida basal, o manguito de pressão na base do quirodáctilo foi insuflado a 200 mmHg para obtenção de uma isquemia total de 4 min, após a qual foi verificada a DCF durante a HRPO. Para a realização desse exame, as participantes foram aconselhadas a não ficarem expostas ao sol sem o uso de protetor solar e a não terem contato com produtos de limpeza sem a utilização de luvas, uma vez que esses fatores interferem na qualidade das imagens.

Previamente à realização deste exame, um cateter venoso salinizado foi inserido no braço contralateral, com a única intenção de manter um acesso venoso patente para a coleta das amostras sanguíneas durante o exame. A reatividade microvascular foi testada em estado basal, 30, 60, 120 e 180 min após a ingestão da refeição hiperlipídica.

#### **4.17 - O Estudo da Vasomotricidade**

A laser-Dopplerfluxometria (LDF) tem sido usado como medida do fluxo sanguíneo microvascular há mais de 30 anos inicialmente em tecido retiniano, mas posteriormente estendido para outros sítios (69). Considerado um método não invasivo para a determinação

contínua da perfusão microvascular, uma luz de Laser de baixa potência incide na superfície do tecido pesquisado e fótons migram através do tecido de maneira aleatória. A interação deste com um ou mais objetos que se movem pelo campo pesquisado, por exemplo, hemácias, desvia os fótons numa sequência e em quantidade determinada por um ângulo de desvio, pelo comprimento de onda da luz do laser e pela velocidade(67). Dessa forma, as técnicas de laser-Doppler fornecem um índice de perfusão da pele através da medição do deslocamento pelo efeito Doppler induzido pela dispersão da luz monocromática pelas células sanguíneas em movimento (70). O sinal é quantificado como o produto da velocidade média das hemácias pela sua concentração, o qual apresenta uma relação direta com o fluxo (71).

A laser-Doppler fluxometria (LDF) de ponto único (composto por um transmissor e um receptor de fibra óptica) é um método acurado para quantificar mudanças rápidas no fluxo de sangue, também permitindo a mensuração da perfusão microvascular do tecido cutâneo realizada primordialmente pela microcirculação não nutritiva da pele(72). Neste estudo, esse método foi utilizado exclusivamente para análise da vasomotricidade e de seus respectivos componentes (cardíaco, respiratório, miogênico, neurogênico e endotelial), sendo efetuada simultaneamente à videocapilaroscopia através do aparelho *PeriFlux System* (Perimed®, Estocolmo, Suécia).

O programa *PeriSoft for Windows (PSW) 2.5* (Perimed®, Estocolmo, Suécia) foi utilizado para a realização da análise espectral do sinal de fluxo, através da transformada rápida de Fourier. O sinal captado pela sonda era transmitido, processado, filtrado e convertido em uma representação gráfica linear que expressava a resposta ao estímulo farmacológico, bem as mudanças provocadas pela sobrecarga lipídica. Esse procedimento visava a identificação dos diferentes componentes que contribuem para a vasomotricidade, uma vez que cada um deles está relacionado a uma respectiva oscilação de frequência do sinal de fluxo: componente endotelial (oscilações de 0,01-0,02 Hz); neurogênico (0,02-0,06 Hz); miogênico (0,06-0,15 Hz); respiratório (0,15-0,4 Hz) e cardíaco (0,4-1,6 Hz) (73). As variações absolutas de amplitude em cada um desses intervalos, bem como seus valores normalizados, obtidos através da razão entre a amplitude média do respectivo intervalo de frequência sobre a amplitude média de todo o espectro de frequências de 0,005 a 2,0 Hz, foram os parâmetros analisados(73). A medição contínua foi realizada no intervalo de tempo entre basal e 180 minutos.

#### 4.18 – Análise estatística

Essa análise foi realizada através do programa GraphPad Prism 5 ® (*GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA*). As principais variáveis analisadas no estudo foram as diferenças entre parâmetros microvasculares, biomarcadores inflamatórios e peptídeos intestinais em jejum e no período PP; em estado basal e após o uso de vildagliptina ou metformina.

Estes resultados foram analisados em dois momentos distintos denominados efeitos agudos, ou seja, mudanças provocadas imediatamente após a ingestão de refeição rica em lipídeos e efeitos crônicos, definido pelas mudanças provocadas em jejum após terapia medicamentosa contínua por trinta dias.

Para avaliar os dados obtidos durante o período PP, realizamos as equações de regressão linear, analisando a relação entre a variável independente (tempo) e as variáveis dependentes (atividade DPP4, biomarcadores inflamatórios, perfil lipídico e componentes da função microvascular). Essas equações encontraram interceptos e inclinações para cada variável, que definiram a relação linear entre as variáveis dependentes (variável testada) e independente (tempo de coleta). Interceptos e inclinações de cada variável foram usadas nas análises.

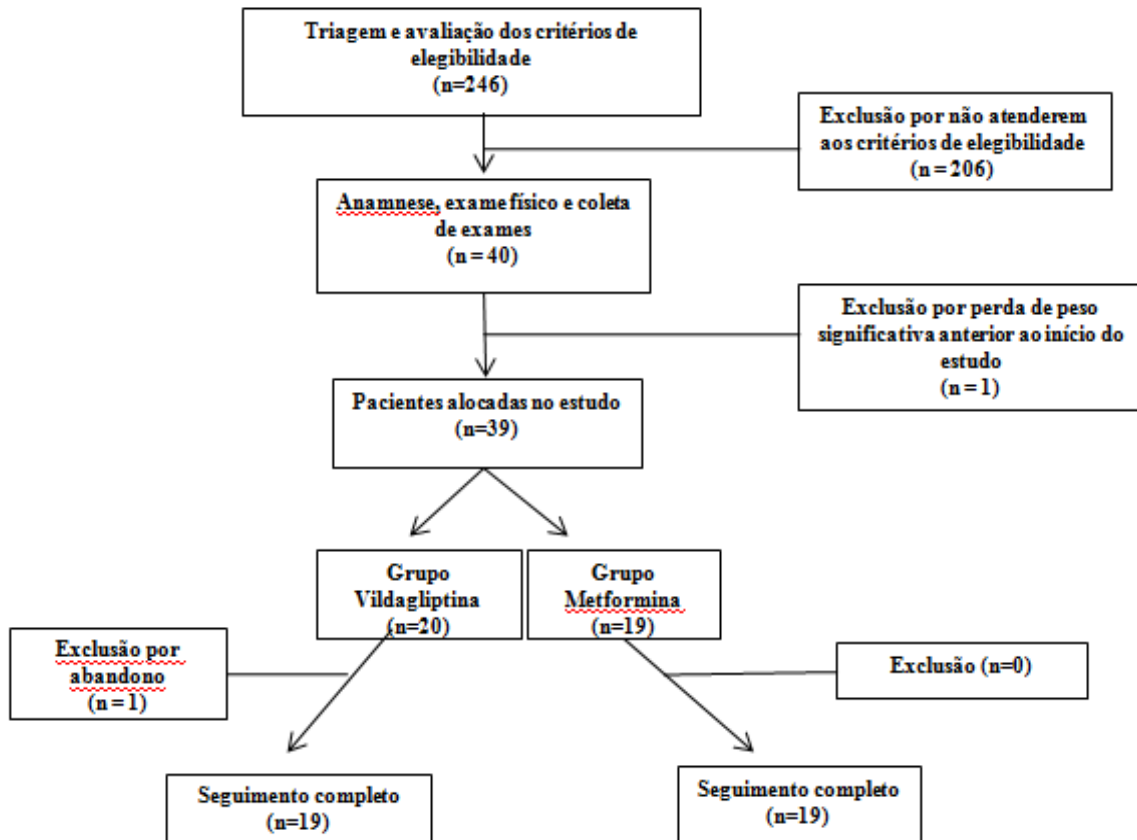
A distribuição das variáveis contínuas foi testada pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov*, *D'Agostino-Pearson* e *Shapiro-Wilk*. As comparações entre dois grupos foram feitas pelos testes de *Student* não pareado e *Mann-Whitney* e intragrupo pelos testes *t* de *Student* pareado e *Wilcoxon*, na dependência de distribuições normal e não-normal para as variáveis analisadas, respectivamente.

Para calcular o tamanho da amostra de 40 pacientes, utilizamos o programa *G \* Power* 3.1.9.2 (Universitat Kiel, Alemanha), com um poder real de 0.9500156 (testes *t*, ponto biserial, de duas caudas, tamanho do efeito de 0.51; erro de probabilidade de 0,05; um poder de 0,95). Os resultados são apresentados por média e desvio padrão (média  $\pm$  DP) utilizando-se um valor de *P* igual ou inferior a 0,05 como estatisticamente significativo.

## 5 – RESULTADOS

Foram recrutadas e selecionadas 246 pacientes para a realização da primeira visita. Destas, 206 pacientes foram excluídas por não terem o diagnóstico de DM2 ou já possuírem essa doença, estando já em tratamento. Após inclusão no estudo, duas pacientes foram excluídas por má adesão (n=1) ou por perda de peso significativa antes da avaliação microcirculatória (n=1). A figura 5 demonstra o organograma descrito.

Figura 5- Fluxograma das pacientes no estudo



Fonte: A autora, 2018.

## 5.1 – Características basais

Trinta e oito pacientes possuíam idade média de  $39,4 \pm 6,5$  e IMC de  $37,2 \pm 5,0$  kg/m<sup>2</sup>. Em estado basal (tabela 1), ambos os grupos possuíam as mesmas características clínicas, antropométricas e laboratoriais; bem como a mesma função endotelial e reatividade microvascular. Em relação à prevalência de hipertensão arterial, não observamos diferença nos dois drupos testados.

Tabela 1 - Comparação clínica, laboratorial e microcirculatória entre os Grupos Vildagliptina e Metformina em estado basal

| Variáveis                  | Vildagliptina<br>(n=19) | Metformina<br>(n=19) | P    |
|----------------------------|-------------------------|----------------------|------|
| Idade (anos)               | 39,0±5,3                | 39,7±7,7             | 0,44 |
| Peso (kg)                  | 94,9±14,0               | 99,5±16,1            | 0,31 |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )   | 36,0±3,9                | 38,4±6,1             | 0,25 |
| CA (cm)                    | 105,5±10,5              | 106,5±12,0           | 0,51 |
| CQ(cm)                     | 116,0±8,9               | 122,6±11,9           | 0,09 |
| Relação cintura/quadril    | 0,9±0,05                | 0,8±0,07             | 0,57 |
| PAS (mmHg)                 | 131,5±20,9              | 134,6±27,2           | 0,75 |
| PAD (mmHg)                 | 84,0±13,4               | 83,0±13,1            | 0,97 |
| PAM (mmHg)                 | 100,0±15,6              | 100,2±17,2           | 0,86 |
| Percentual de gordura (%)  | 39,5±3,9                | 41,1±4,2             | 0,29 |
| Massa magra (%)            | 60,4±6,4                | 59,2±6,1             | 0,30 |
| Insulina (mIU/l)           | 1,7±0,9                 | 1,9±1,1              | 0,75 |
| Glicose (mg/dl)            | 200,2±95,0              | 190,2±74             | 0,88 |
| Glicose após TOTG (mg/dl)* | 253,4±60,8              | 255,8±56,8           | 1,0  |
| HbA1c (%)                  | 8,0±1,7                 | 7,8±2,0              | 0,64 |
| CT (mg/dl)                 | 183,9±36,7              | 198,0±37,8           | 0,18 |
| TG (mg/dl)                 | 161,0±79,8              | 141,2±78,6           | 0,28 |
| HDL - c (mg/dl)            | 43,0±8,1                | 46,7±11,2            | 0,38 |
| LDL - c (mg/dl)            | 108,6±26,2              | 112,9±25,8           | 0,13 |
| VLDL - c (mg/dl)           | 32,2±15,9               | 28,2±15,7            | 0,3  |
| PCR (mg/dl)                | 1,1±1,3                 | 0,9±0,6              | 0,94 |
| Peptideo C (ng/ml)         | 1,7±0,9                 | 1,7±0,9              | 1,0  |
| Grelin (pg/ml)             | 45,5±19,8               | 44,3±26,9            | 0,57 |
| GIP (pg/ml)                | 24,3±14,6               | 20,2±12,2            | 0,32 |
| GLP-1 (pM/l)               | 1,1±1,0                 | 0,9±0,6              | 0,98 |
| Leptina (pg/ml)            | 21880±19430             | 25350±13330          | 0,52 |
| Glucagon (pg/ml)           | 23,4±20,6               | 31,4±53,4            | 0,53 |
| Adiponectina (ng/ml)       | 11950±11540             | 11590±6151           | 0,55 |

|  |           |           |      |
|--|-----------|-----------|------|
| <b>Resistina (ng/ml)</b>                                 | 34,0±11,4 | 36,0±18,7 | 0,95 |
| <b>PP (pg/ml)</b>  | 30,1±24,1 | 33,2±34,8 | 0,83 |
| <b>PYY (pg/ml)</b>                                       | 39,2±21,7 | 38,7±36,8 | 0,57 |
| <b>IL-6 (pg/ml)</b>                                      | 2,11±1,3  | 3,4±4,0   | 0,20 |
| <b>LDL<sub>ox</sub> (U/L)</b>                            | 74,8±31,3 | 62,1±16,8 | 0,24 |
| <b>NEFA (mmol/l)</b>                                     | 0,6±0,2   | 0,6±0,2   | 0,35 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>                   | 0,5±0,6   | 0,3±0,9   | 0,09 |
| <b>Endothelina (pg/ml)</b>                               | 1,6±0,5   | 1,6±0,5   | 0,83 |
| <b>atvDPP4 (uM/ml/min)</b>                               | 9,3±3,5   | 9,6±3,7   | 0,86 |
| <b>DCF (cap/mm<sup>2</sup>)</b>                          | 24,1±15,6 | 34,6±20,2 | 0,18 |
| <b>DCF após HRPO (cap/mm<sup>2</sup>)</b>                | 20,8±14,7 | 32,4±19,4 | 0,14 |
| <b>FSA<sub>b1</sub> (ml/min/100ml de tecido)</b>         | 3,0±1,8   | 2,3±1,5   | 0,34 |
| <b>FSA<sub>HRPO C1</sub> (ml/min/100ml de tecido)</b>    | 10,2±6,5  | 8,6±3,5   | 0,63 |
| <b>FSA<sub>HRPO C1-C4</sub> (ml/min/100ml de tecido)</b> | 5,8±3,0   | 4,5±1,6   | 0,19 |
| <b>FSA<sub>b2</sub> (ml/min/100ml de tecido)</b>         | 2,7±1,4   | 2,1±1,1   | 0,18 |
| <b>FSA<sub>NTG</sub> (ml/min/100ml de tecido)</b>        | 2,5±1,3   | 1,9±1,0   | 0,28 |

Nota: Dados expressos em média±desvio padrão (DP)

Legendas: IMC-índice de massa corporal, PAS – pressão arterial sistólica, PAD – pressão arterial diastólica, PAM – pressão arterial média, FC – frequência cardíaca, HbA<sub>1c</sub> – hemoglobina glicosilada, CT – colesterol total, TG – triglicerídeos, HDLc – lipoproteína de alta densidade, LDLc – lipoproteína de baixa densidade, VLDLc – lipoproteína de muita baixa densidade, GIP – polipeptídeoinsulínico glicose-dependente, GLP1 - peptídeo glucagon símile-1, PP – polipeptídeo pancreático, PYY – peptídeo YY, IL6 – interleucina 6, LDL<sub>ox</sub> – lipoproteína de baixa densidade oxidada, NEFA – ácido graxo não esterificado, atvDPP4 – atividade da enzima dipeptidyl peptidase 4, DCF – densidade capilar funcional, DCF após HRPO – densidade capilar funcional após hiperemia reativa, FSA<sub>b1</sub> – fluxo sanguíneo do antebraço basal 1, FSA<sub>HRPO C1</sub> – fluxo sanguíneo do antebraço após hiperemia reativa C1, FSA<sub>HRPO C1-C4</sub> – fluxo sanguíneo do antebraço após hiperemia reativa C1-C4, FSA<sub>b2</sub> – fluxo sanguíneo do antebraço basal 2, FSA<sub>NTG</sub> – fluxo sanguíneo do antebraço após nitroglicerina  
\*TOTG realizado apenas naquelas pacientes com glicemia de jejum inferior a 200mg/dl

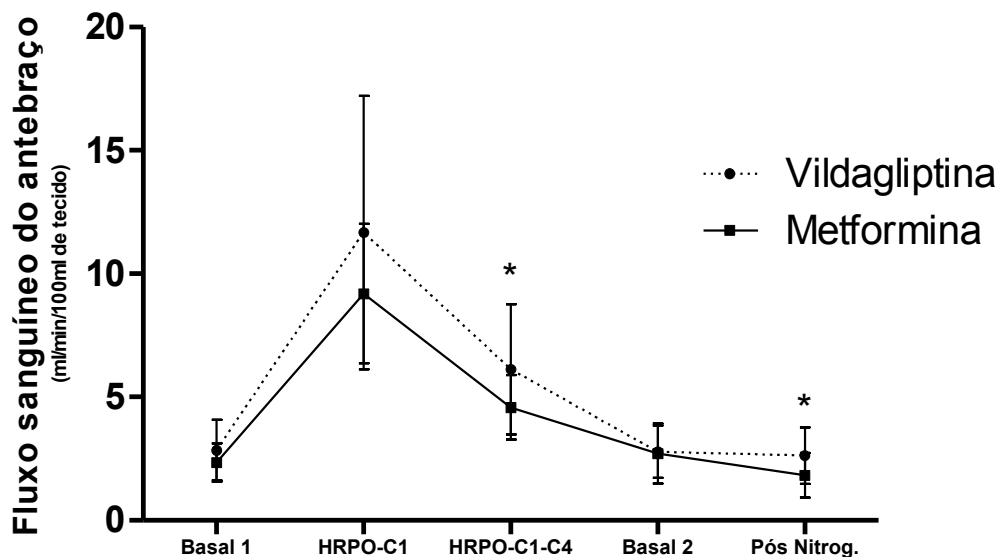
Fonte: A autora, 2018.

## 5.2 – Avaliação da função endotelial (pletismografia)

Nosso principal achado relaciona-se a uma melhora na vasodilatação endotélio-dependente e -independente no grupo tratado com vildagliptina em comparação com a metformina. Na figura 6, observamos que o uso da vildagliptina resultou numa melhora da função vascular, expressa em respostas mais elevadas de vasodilatação, tanto após hiperemia reativa (P=0,03; endotélio-dependente), quanto após a administração de nitroglicerina (P=0,02; endotélio-independente). As comparações intragrupo não mostraram diferenças entre os períodos pré e pós-tratamento em ambos os grupos.



Gráfico 1 - Comparação do fluxo sanguíneo por pletismografia por oclusão venosa em ambos os grupos após 30 dias de tratamento



Nota: Dados expressos em média±desvio padrão (DP)

Legendas: FSA b1 – fluxo sanguíneo do antebraço basal 1, FSA HRPO C1 – fluxo sanguíneo do antebraço após hiperemia reativa C1, FSA HRPO C1-C4 – fluxo sanguíneo do antebraço após hiperemia reativa C1-C4, FSA b2 – fluxo sanguíneo do antebraço basal 2, FSA NTG – fluxo sanguíneo do antebraço após nitroglicerina

Fonte: A autora, 2018.

### 5.3 – Avaliação da reatividade microvascular

#### 5.3.1 – Reatividade vascular em estado basal após trinta dias de tratamento (efeitos crônicos)

Em relação à microcirculação nutritiva capilar, percebemos que após trinta dias de uso das drogas o grupo tratado com metformina apresentou melhor DCF após HRPO, refletindo melhor recrutamento capilar ( $P=0,02$ ) em comparação ao grupo tratado com vildagliptina. A análise intragrupo não mostrou diferenças significativas. Os achados descritos podem ser observados na tabela 2.

Tabela2 - Comparação por videocapilaroscopia entre os efeitos da vildagliptina e metformina na reatividade vascular aos 30 dias de tratamento

| <b>Reatividade microvascular</b>       | <b>Vildagliptina<br/>(n=19)<br/>Dia 0</b> | <b>Vildagliptina<br/>(n=19)<br/>Dia 30</b> | <b>Metformina<br/>(n=19)<br/>Dia 0</b> | <b>Metformina<br/>(n=19)<br/>Dia 30</b> |
|--|---|--|--|---|
| DCF em repouso (cap/mm <sup>2</sup> )  | 24,1 ± 15,7                               | 32 ± 14,7                                  | 34,7 ± 20,3                            | 43,6 ± 16,3                             |
| DCF durante HRPO(cap/mm <sup>2</sup> ) | 20,8 ± 14,7                               | 28,97 ± 13,0                               | 32,4 ± 19,4                            | <b>45,8± 16,0<sup>&amp;</sup></b>       |

Dados expressos em média±desvio padrão (DP)

Legendas: DCF – densidade capilar funcional, DCF durante HRPO – densidade capilar funcional durante hiperemia reativa, & - Comparação intergrupo (&P<0,05)

Fonte: A autora, 2018.

### 5.3.2 – Reatividade vascular após sobrecarga lipídica (efeitos agudos)

Ao avaliarmos a reatividade vascular no período PP, observamos que a metformina apresentou maior intercepto para DCF durante a HRPO quando comparada à vildagliptina (tabela 3), sugerindo aspectos benéficos da metformina durante o recrutamento capilar, mesmo após a ingestão de uma refeição rica em gordura. A avaliação intragrupo não mostrou diferenças estatísticas.

Tabela 3 - Efeitos da vildagliptina e metformina na reatividade vascular aferida por após a ingestão de refeição rica em lipídeos em pacientes com DM2 virgens de tratamento

| <b>Reatividade microvascular</b>              | <b>Vildagliptina<br/>(n=19)<br/>Basal</b> | <b>Vildagliptina<br/>(n=19)<br/>Pós<br/>tratamento</b> | <b>Metformina<br/>(n=19)<br/>Basal</b> | <b>Metformina<br/>(n=19)<br/>Pós<br/>tratamento</b> |
|---|---|--|--|---|
| <b>DCF Em repouso</b> <sub>intercepto</sub>   | <b>24,4±13,2</b>                          | <b>33,4±12,6</b>                                       | <b>36,1±16,2</b>                       | <b>43,1±14,4</b>                                    |
| <b>DCF Durante HRPO</b> <sub>intercepto</sub> | <b>23±13,9</b>                            | <b>29,1±13,8</b>                                       | <b>38,7±19,6</b>                       | <b>45,1±14,5<sup>&amp;</sup></b>                    |

Dados expressos em média±desvio padrão (DP)

Legendas: DCF em repouso <sub>intercepto</sub> – intercepto da densidade capilar funcional em repouso, DCF durante HRPO <sub>intercepto</sub> – intercepto da densidade capilar funcional durante hiperemia reativa, & - Comparação intergrupo (&P<0,05)

Fonte: A autora, 2018.

## 5.4– Vasomotricidade

Em relação à vasomotricidade testada, a avaliação basal não demonstrou diferença entre os grupos (tabela 4):

Tabela 4 – Comparação da vasomotricidade por laser-doppler fluxometria entre os grupos Vildagliptina e Metformina ao início do recrutamento e durante o período pós-prandial

|   | <b>TEMPO (min)</b>                   |                       |                       |                       |                       |
|---|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|   | <b>Microfluxo não nutritivo</b>      |                       |                       |                       |                       |
|   | <b>Basal</b>                         | <b>30</b>             | <b>60</b>             | <b>120</b>            | <b>180</b>            |
| <b>Valor médio (unid)</b>                 |                                      |                       |                       |                       |                       |
| <b>METpré-tratamento</b>                  | 12,8<br>[7,8-16,3]                   | 11,4<br>[7,8-14,2]    | 11,3<br>[8,1-15,8]    | 10,7<br>[7,4-16,6]    | 108<br>[7,6-17,9]     |
| <b>VILpré-tratamento</b>                  | 13,2<br>[7,2-19,4]                   | 13,2<br>[6,1-20,3]    | 12,6<br>[6,2-16,5]    | 12<br>[6,5-16]        | 12<br>[5,9-17]        |
| <b>Média Total (unid)</b>                 |                                      |                       |                       |                       |                       |
| <b>METpré-tratamento</b>                  | 0,15<br>[0,1-0,5]                    | 0,16<br>[0,1-0,2]     | 0,15<br>[0,1-0,2]     | 0,17<br>[0,1-0,2]     | 0,17<br>[0,1-0,2]     |
| <b>VILpré-tratamento</b>                  | 0,1<br>[0,1-0,2]                     | 0,2<br>[0,1-0,3]      | 0,16<br>[0,1-0,3]     | 0,16<br>[0,1-0,4]     | 0,16<br>[0,1-0,2]     |
|   | <b>Vasomotricidade microvascular</b> |                       |                       |                       |                       |
| <b>Intervalo total de frequência (Hz)</b> |                                      |                       |                       |                       |                       |
| <b>METpré-tratamento</b>                  | 30,10<br>[0,17-100,4]                | 32,05<br>[0,16-42,66] | 31,19<br>[0,16-41,47] | 33,90<br>[0,23-48,92] | 33,96<br>[0,16-50,17] |
| <b>VILpré-tratamento</b>                  | 0,14<br>[0,09-0,24]                  | 0,16<br>[0,08-0,29]   | 0,16<br>[0,09-0,27]   | 0,16<br>[0,07-0,45]   | 0,16<br>[0,07-0,25]   |
| <b>Endotelial</b>                         |                                      |                       |                       |                       |                       |
| <b>METpré-tratamento</b>                  | 4<br>[2,1-10,54]                     | 3,9<br>[2,4-6,9]      | 4,26<br>[2,52-9,44]   | 3,72<br>[2,51-7,12]   | 3,38<br>[2,21-7,10]   |
| <b>VILpré-tratamento</b>                  | 4,1<br>[2,47-7,92]                   | 3,98<br>[2,11-7,0]    | 4,32<br>[1,98-8,62]   | 3,48<br>[2,0-7,36]    | 3,63<br>[2,46-7,38]   |
| <b>Simpático</b>                          |                                      |                       |                       |                       |                       |
| <b>METpré-tratamento</b>                  | 3,17<br>[1,6-4,92]                   | 3,13<br>[2,0-5,39]    | 3,73<br>[1,46-4,95]   | 3,4<br>[2,35-6,48]    | 3,26<br>[2,25-5,24]   |
| <b>VILpré-tratamento</b>                  | 3,71<br>[2,14-5,80]                  | 3,35<br>[1,99-5,90]   | 3,54<br>[1,92-9,35]   | 3,47<br>[2,0-9,97]    | 3,74<br>[2,0-8,40]    |
| <b>Miogênico</b>                          |                                      |                       |                       |                       |                       |
| <b>METpré-tratamento</b>                  | 2,14                                 | 2,05                  | 2,03                  | 2,11                  | 2,07                  |

|                          |                      |                     |                      |                     |                     |
|--------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                          | [1,69-3,57]          | [1,63-2,53]         | [1,73-2,63]          | [1,97-2,89]         | [1,68-2,96]         |
| <b>VILpré-tratamento</b> | 2,54<br>[1,21-3,20]  | 2,19<br>[1,73-2,90] | 2,35<br>[1,36-3,24]  | 2,25<br>[1,35-3,31] | 2,26<br>[1,92-2,92] |
| <b>Respiratório</b>      |                      |                     |                      |                     |                     |
| <b>METpré-tratamento</b> | 1,37<br>[0,73-1,53]  | 1,33<br>[0,99-1,99] | 1,28<br>[1,14-1,51]  | 1,33<br>[1,0-1,53]  | 1,31<br>[1,12-1,49] |
| <b>VILpré-tratamento</b> | 1,175<br>[0,69-1,46] | 1,23<br>[1,0-1,51]  | 1,255<br>[0,73-1,49] | 1,275<br>[0,67-1,5] | 1,315<br>[0,9-1,45] |
| <b>Cardíaco</b>          |                      |                     |                      |                     |                     |
| <b>METpré-tratamento</b> | 0,72<br>[0,61-0,81]  | 0,75<br>[0,66-1,48] | 0,71<br>[0,64-0,82]  | 0,71<br>[0,63-0,84] | 0,74<br>[0,63-0,84] |
| <b>VILpré-tratamento</b> | 0,71<br>[0,59-0,81]  | 0,71<br>[0,59-0,81] | 0,71<br>[0,52-0,98]  | 0,71<br>[0,50-0,79] | 0,71<br>[0,55-0,80] |

Dados expressos como média± desvio padrão (DP)

Legendas: MET – Grupo Metformina; VIL – Grupo Vildagliptina, & - análise intergrupo ( \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001)

Fonte: A autora, 2018.

Após o tratamento, a vildagliptina apresentou melhores valores médios de vasomotricidade durante quase todo o período do teste (de 30 a 180 minutos), além de apresentar um maior intervalo de frequência total no final do período pós-prandial (180 minutos), sugerindo um melhor efeito dessa droga sobre a vasomotricidade quando comparada à metformina. Ao subdividir os cinco componentes da vasomotricidade não observamos diferenças entre os dois grupos (tabela 5).

Tabela 5 – Comparação da vasomotricidade por laser-doppler fluxometria entre os grupos Vildagliptina e Metformina durante o período pós-prandial

|   | <b>TEMPO (min)</b>              |                        |                        |                        |                         |
|---|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|   | <b>Microfluxo não nutritivo</b> |                        |                        |                        |                         |
|   | <b>Basal</b>                    | <b>30</b>              | <b>60</b>              | <b>120</b>             | <b>180</b>              |
| <b>Valor médio (unid)</b>                 |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 12<br>[5,9-15,7]                | 10,2<br>[5,7-12,3]     | 10,1<br>[5,4-13,2]     | 10<br>[5,5-11]         | 10,4<br>[5,6-16]        |
| <b>VILpós-tratamento</b>                  | 13,1<br>[8,5-2]                 | 12,3<br>[7,8-18,4]&    | 12<br>[7,5-18]&        | 11,4<br>[5,7-18]&      | 10,9<br>[5,6-17,7]      |
| <b>Média Total (unid)</b>                 |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 0,2<br>[0,1-0,3]                | 0,1<br>[0,1-0,3]       | 0,1<br>[0,1-0,3]       | 0,1<br>[0,07-0,20]     | 0,1<br>[0,07-0,24]      |
| <b>VILpós-tratamento</b>                  | 0,1<br>[0,1-0,3]                | 0,1<br>[0,1-0,3]       | 0,1<br>[0,1-0,3]       | 0,14<br>[0,06-0,24]&   | 0,1<br>[0,1-0,2]        |
| <b>Vasomotricidade microvascular</b>      |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>Intervalo total de frequência (Hz)</b> |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 32,39<br>[14,25-65,26]          | 27,26<br>[12,9-67,24]  | 25,75<br>[13,05-66,37] | 23,26<br>[14,21-39,94] | 22,20<br>[15,21-48,65]  |
| <b>VILpós-tratamento</b>                  | 29,97<br>[20,57-59,70]          | 33,11<br>[18,63-54,28] | 30,56<br>[19,10-52,55] | 30,04<br>[5,55-48,69]  | 31,28<br>[16,42-50,02]& |
| <b>Endotelial</b>                         |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 4,22<br>[2,19-7,71]             | 3,74<br>[2,1-6,42]     | 3,9<br>[2,51-8,84]     | 4,09<br>[2,48-6,99]    | 4,39<br>[1,82-8,62]     |
| <b>VILpós-tratamento</b>                  | 4,69<br>[3,12-7,64]             | 3,86<br>[2,20-10,90]   | 5,26<br>[2,0-9,0]      | 4,95<br>[2,64-8,93]    | 4,78<br>[2,42-7,42]     |
| <b>Simpático</b>                          |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 3,76<br>[2,17-4,92]             | 3,66<br>[2,38-6,14]    | 3,74<br>[2,32-5,34]    | 3,73<br>[2,39-5,58]    | 4,0<br>[2,1-5,47]       |
| <b>VILpós-tratamento</b>                  | 3,66<br>[1,85-5,31]             | 3,86<br>[1,85-6,08]    | 3,87<br>[1,76-9,35]    | 4,47<br>[2,08-9,97]    | 3,89<br>[2,12-8,40]     |
| <b>Miogênico</b>                          |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 2,28<br>[1,65-3,54]             | 2,28<br>[1,7-3,5]      | 2,19<br>[1,62-2,86]    | 2,26<br>[1,64-3,69]    | 2,21<br>[1,78-3,78]     |
| <b>VILpós-tratamento</b>                  | 2,62<br>[1,75-4,11]             | 2,27<br>[1,70-3,50]    | 2,19<br>[1,79-3,24]    | 2,29<br>[1,74-4,20]    | 2,07<br>[1,69-3,85]     |
| <b>Respiratório</b>                       |                                 |                        |                        |                        |                         |
| <b>METpós-tratamento</b>                  | 1,26<br>[1,07-1,5]              | 1,28<br>[1,08-         | 1,33<br>[1,04-1,51]    | 1,29<br>[1,04-1,51]    | 1,16<br>[1,03-          |

|                               |                            |   |                            |                            |  |
|-------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|----------------------------|--|
| <b>VILpós-<br/>tratamento</b> | <b>1,17</b><br>[0,89-1,45] | <b>1,58]</b><br><b>1,205</b><br>[0,82-<br>1,52] | <b>1,23</b><br>[0,8-1,79]  | <b>1,14</b><br>[0,10-1,49] | <b>1,52]</b><br><b>1,24</b><br>[0,91-<br>1,47] |
| <b>Cardíaco</b>               |                            |   |                            |                            |  |
| <b>METpós-<br/>tratamento</b> | <b>0,69</b><br>[0,54-0,84] | <b>0,70</b><br>[0,64-<br>0,81]                  | <b>0,71</b><br>[0,64-0,81] | <b>0,69</b><br>[0,62-0,79] | <b>0,69</b><br>[0,61-<br>0,80]                 |
| <b>VILpós-<br/>tratamento</b> | <b>0,71</b><br>[0,59-0,81] | <b>0,71</b><br>[0,59-<br>0,81]                  | <b>0,71</b><br>[0,52-0,98] | <b>0,71</b><br>[0,50-0,79] | <b>0,71</b><br>[0,55-<br>0,80]                 |

Dados expressos como media  $\pm$  desvio padrão (DP)

Legendas: MET – Grupo Metformina; VIL – Grupo Vildagliptina, & - Análise intergrupo (&P<0,05; &&P<0,01; &&&P<0,001)

Fonte: A autora, 2018.

Por fim, ao investigarmos as mudanças intragrupo, observamos que o uso da vildagliptina preserva a vasomotricidade em relação aos valores basais e isso, na realidade, demonstra que o uso dessa droga não alterou a vasomotricidade microvascular; enquanto que, a metformina apresentou valores médios mais baixos ( $P < 0,05$ ) ao longo do período PP, o que foi mais relevante ao final desse período, da seguinte forma: 30 minutos (11,4 [7,8-14,2] vs 10,2 [5,7-12,3] Hz;  $P=0,03$ ), 60 minutos (11,3 [8,1-15,8] vs. 10,1 [5,4-13,2] Hz;  $P = 0,04$ ) e 120 minutos (10,7 [7,4-16,6] vs. 10 [5,5-11,0] Hz;  $P=0,04$ ). Comparando antes e após o tratamento, a metformina também promoveu uma redução nos valores totais médios ( $P < 0,05$ ) aos 120 minutos (0,17 [0,1-0,24] vs 0,12 [0,07-0,2] Hz;  $P=0,0007$ ) e 180 minutos (0,17 [0,09-0,25] vs 2,0 [0,07-0,24] Hz;  $P=0,014$ ). Podemos observar essas mudanças nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Efeitos da vildagliptina sobre a vasomotricidade durante o período pós-prandial após ingestão de refeição rica em lipídeos em pacientes DM2 virgens de tratamento

|   | <b>TEMPO (min)</b>              |                        |                        |                        |                        |
|---|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|   | <b>Microfluxo não nutritivo</b> |                        |                        |                        |                        |
|   | <b>Basal</b>                    | <b>30</b>              | <b>60</b>              | <b>120</b>             | <b>180</b>             |
| <b>Valor médio (unid)</b>                 |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 13,2<br>[7,2-19,4]              | 13,2<br>[6,1-20,3]     | 12,6<br>[6,2-16,5]     | 12<br>[6,5-16]         | 12<br>[5,9-17]         |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 13,1<br>[8,5-2]                 | 12,3<br>[7,8-18,4]     | 12<br>[7,5-18]         | 11,4<br>[5,7-18]       | 10,9<br>[5,6-17,7]     |
| <b>Média Total (unid)</b>                 |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 0,14<br>[0,1-0,2]               | 0,2<br>[0,1-0,3]       | 0,2<br>[0,1-0,3]       | 0,2<br>[0,1-0,4]       | 0,2<br>[0,1-0,2]       |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 0,1<br>[0,1-0,3]                | 0,2<br>[0,1-0,3]       | 0,1<br>[0,1-0,3]       | 0,1<br>[0,1-0,2]       | 0,1<br>[0,1-0,2]       |
| <b>Vasomotricidade microvascular</b>      |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>Intervalo total de frequência (Hz)</b> |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 29,31<br>[7,63-49,25]           | 33,45<br>[15,95-58,56] | 32,71<br>[17,47-55,36] | 32,96<br>[14,96-91,81] | 33,39<br>[15,03-52,02] |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 29,97<br>[20,57-59,70]          | 33,11<br>[18,63-54,28] | 30,56<br>[19,10-52,55] | 30,04<br>[5,55-48,69]  | 31,28<br>[16,42-50,02] |
| <b>Endotelial</b>                         |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 4,1<br>[2,47-7,92]              | 3,98<br>[2,11-7,0]     | 4,32<br>[1,98-8,62]    | 3,48<br>[2,0-7,36]     | 3,63<br>[2,46-7,38]    |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 4,69<br>[3,12-7,64]             | 3,86<br>[2,20-10,90]   | 5,26<br>[2,0-9,0]      | 4,95<br>[2,64-8,93]    | 4,78<br>[2,42-7,42]    |
| <b>Simpático</b>                          |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 3,71<br>[2,14-5,80]             | 3,35<br>[1,99-5,90]    | 3,54<br>[1,92-9,35]    | 3,47<br>[2,0-9,97]     | 3,74<br>[2,0-8,40]     |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 3,66<br>[1,85-5,31]             | 3,86<br>[1,85-6,08]    | 3,87<br>[1,76-9,35]    | 4,47<br>[2,08-9,97]    | 3,89<br>[2,12-8,40]    |
| <b>Miogênico</b>                          |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 2,54<br>[1,21-3,20]             | 2,19<br>[1,73-2,90]    | 2,35<br>[1,36-3,24]    | 2,25<br>[1,35-3,31]    | 2,26<br>[1,92-2,92]    |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 2,62<br>[1,75-4,11]             | 2,27<br>[1,70-3,50]    | 2,19<br>[1,79-3,24]    | 2,29<br>[1,74-4,20]    | 2,07<br>[1,69-3,85]    |
| <b>Respiratório</b>                       |                                 |                        |                        |                        |                        |
| <b>VIL pré-tratamento</b>                 | 1,17<br>[0,69-1,46]             | 1,23<br>[1,0-1,51]     | 1,25<br>[0,73-1,49]    | 1,27<br>[0,67-1,5]     | 1,31<br>[0,9-1,45]     |
| <b>VIL pós-tratamento</b>                 | 1,17<br>[0,89-1,45]             | 1,20<br>[0,82-1,52]    | 1,23<br>[0,8-1,79]     | 1,14<br>[0,10-1,49]    | 1,24<br>[0,91-1,47]    |
| <b>Cardíaco</b>                           |                                 |                        |                        |                        |                        |

|                                |                                   |                                   |                                   |                                   |                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>VIL pré-<br/>tratamento</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,61-0,80]</b> | <b>0,74</b><br><b>[0,63-1,42]</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,53-0,83]</b> | <b>0,72</b><br><b>[0,50-0,78]</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,55-0,78]</b> |
| <b>VIL pós-<br/>tratamento</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,59-0,81]</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,59-0,81]</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,52-0,98]</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,50-0,79]</b> | <b>0,71</b><br><b>[0,55-0,80]</b> |

Dados expressos como média± desvio padrão (DP)

Legendas: VIL – Grupo Vildagliptina, & - (Análise intergrupo: &P<0,05; &&P<0,01; &&&P<0,001)

Fonte: A autora, 2018.



Tabela 7 - Efeitos da metformina sobre a vasomotricidade durante o período pós-prandial após ingestão de refeição rica em lipídeos em pacientes DM2 virgens de tratamento

|   | <b>TEMPO (min)</b>              |                             |                              |                              |                              |
|---|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|   | <b>Microfluxo não nutritivo</b> |                             |                              |                              |                              |
|   | <b>Basal</b>                    | <b>30</b>                   | <b>60</b>                    | <b>120</b>                   | <b>180</b>                   |
| <b>Valor médio (unid)</b>                 |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>12,8</b><br>[7,8-16,3]       | <b>11,4</b><br>[7,8-14,2]   | <b>11,3</b><br>[8,1-15,8]    | <b>10,7</b><br>[7,4-16,6]    | <b>10,8</b><br>[7,6-17,9]    |
| <b>MET pós-tratamento</b>                 | <b>12</b><br>[5,9-15,7]         | <b>10,2</b><br>[5,7-12,3]*  | <b>10,1</b><br>[5,4-13,2]*   | <b>10</b><br>[5,5-11]*       | <b>10,4</b><br>[5,6-16]      |
| <b>Média Total (unid)</b>                 |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>0,1</b><br>[0,1-0,5]         | <b>0,2</b><br>[0,1-0,2]     | <b>0,1</b><br>[0,1-0,2]      | <b>0,2</b><br>[0,1-0,2]      | <b>0,2</b><br>[0,1-0,2]      |
| <b>MET pós-tratamento</b>                 | <b>0,2</b><br>[0,1-0,3]         | <b>0,1</b><br>[0,1-0,3]     | <b>0,1</b><br>[0,1-0,3]      | <b>0,1</b><br>[0,1-0,2]*     | <b>0,1</b><br>[0,1-0,2]*     |
| <b>Vasomotricidade microvascular</b>      |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>Intervalo total de freqüência (Hz)</b> |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>30,10</b><br>[0,17-100,4]    | <b>32,05</b><br>[0,16-42,6] | <b>31,19</b><br>[0,16-41,4]  | <b>33,90</b><br>[0,23-48,9]  | <b>33,96</b><br>[0,16-5,17]  |
| <b>MET pós-tratamento</b>                 | <b>32,39</b><br>[14,2-65,2]     | <b>27,26</b><br>[12,9-67,2] | <b>25,75</b><br>[13,05-66,3] | <b>23,26</b><br>[14,2-39,9]* | <b>22,20</b><br>[15,21-48,6] |
| <b>Endotelial</b>                         |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>4</b><br>[2,1-10,54]         | <b>3,9</b><br>[2,4-6,9]     | <b>4,26</b><br>[2,52-9,44]   | <b>3,72</b><br>[2,51-7,12]   | <b>3,38</b><br>[2,21-7,10]   |
| <b>MET pós-tratamento</b>                 | <b>4,22</b><br>[2,19-7,71]      | <b>3,74</b><br>[2,1-6,42]   | <b>3,9</b><br>[2,51-8,84]    | <b>4,09</b><br>[2,48-6,99]   | <b>4,39</b><br>[1,82-8,62]   |
| <b>Simpático</b>                          |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>3,17</b><br>[1,6-4,92]       | <b>3,13</b><br>[2,0-5,39]   | <b>3,73</b><br>[1,46-4,95]   | <b>3,4</b><br>[2,35-6,48]    | <b>3,26</b><br>[2,25-5,24]   |
| <b>MET pós-tratamento</b>                 | <b>3,76</b><br>[2,17-4,92]      | <b>3,66</b><br>[2,38-6,14]  | <b>3,74</b><br>[2,32-5,34]   | <b>3,73</b><br>[2,39-5,58]   | <b>4,0</b><br>[2,1-5,47]     |
| <b>Miogênico</b>                          |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>2,14</b><br>[1,69-3,57]      | <b>2,05</b><br>[1,63-2,53]  | <b>2,03</b><br>[1,73-2,63]   | <b>2,11</b><br>[1,97-2,89]   | <b>2,07</b><br>[1,68-2,96]   |
| <b>MET pós-tratamento</b>                 | <b>2,28</b><br>[1,65-3,54]      | <b>2,28</b><br>[1,7-3,5]    | <b>2,19</b><br>[1,62-2,86]   | <b>2,26</b><br>[1,64-3,69]   | <b>2,21</b><br>[1,78-3,78]   |
| <b>Respiratório</b>                       |                                 |                             |                              |                              |                              |
| <b>MET pré-tratamento</b>                 | <b>1,37</b><br>[0,73-1,53]      | <b>1,33</b><br>[0,99-1,99]  | <b>1,28</b><br>[1,14-1,51]   | <b>1,33</b><br>[1,0-1,53]    | <b>1,31</b><br>[1,12-        |

|                           |                            |                            |                            |                            |                                    |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <b>MET pós-tratamento</b> | <b>1,26</b><br>[1,07-1,5]  | <b>1,28</b><br>[1,08-1,58] | <b>1,33</b><br>[1,04-1,51] | <b>1,29</b><br>[1,04-1,51] | <b>1,49</b><br>1,16<br>[1,03-1,52] |
| <b>Cardíaco</b>           |                            |                            |                            |                            |                                    |
| <b>MET pré-tratamento</b> | <b>0,72</b><br>[0,61-0,81] | <b>0,75</b><br>[0,66-1,48] | <b>0,71</b><br>[0,64-0,82] | <b>0,71</b><br>[0,63-0,84] | <b>0,74</b><br>[0,63-0,84]         |
| <b>MET pós-tratamento</b> | <b>0,69</b><br>[0,54-0,84] | <b>0,70</b><br>[0,64-0,81] | <b>0,71</b><br>[0,64-0,81] | <b>0,69</b><br>[0,62-0,79] | <b>0,69</b><br>[0,61-0,80]         |

Dados expressos como media  $\pm$  desvio padrão (DP)

Legendas: MET – Grupo Metformina, & - (Análise intergrupo: &P<0,05; &&P<0,01; &&&P<0,001)

Fonte: A autora, 2018.

## 5.5 – Perfil lipídico e glicêmico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais

### 5.5.1 – Perfil lipídico e glicêmico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais em estado basal após trinta dias de tratamento (efeitos crônicos)

A tabela 8 descreve os achados em relação às variáveis descritas acima. É possível observar que após 30 dias de tratamento, os níveis de GLP1 elevaram-se de forma significativa no grupo Vildagliptina ao ser comparado ao grupo Metformina (P=0,03).

Em relação à avaliação intragrupo, a vildagliptinafoi capaz de promover uma redução nos níveis de insulina (P=0,008), peptídeo C (P=0,05) e LDLox (P=0,02); bem como um aumento nos níveis de adiponectina (P=0,04) e GLP1 (P=0,009). Por sua vez, o grupo metformina apresentou redução no peso corporal (P=0,03), glicemia de jejum (P=0,0005), CT (P=0,02), HDLc (P=0,03), LDLc (P=0,01), bem como uma redução na atividade da enzima DPP4 (P=0,03). Além disso, esse grupo apresentou maiores níveis de TNFalfa (P=0,008).

Tabela 8- Efeitos da Vildagliptina e Metformina sobre o perfil lipídico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais após trinta dias de tratamento medicamentoso (análises inter e intragrupo)

| Variáveis                        | Vildagliptina | Vildagliptina          | Metformina  | Metformina             |
|----------------------------------|---------------|------------------------|-------------|------------------------|
|                                  | (n=19)        | (n=19)                 | (n=19)      | (n=19)                 |
|                                  | basal         | dia 30                 | basal       | dia 30                 |
| <b>Idade (anos)</b>              | 39,0±5,3      | 39,0±5,3               | 39,7±7,7    | 39,7±7,7               |
| <b>Peso (kg)</b>                 | 94,9±14,0     | 95,0±14,1              | 99,5±16,1   | <b>98,6±15,7*</b>      |
| <b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>    | 36,0±3,9      | 35,6±4,1               | 38,4±6,1    | 37,2±5,9               |
| <b>Circ. da cintura(cm)</b>      | 105,5±10,5    | -                      | 106,5±12,0  | -                      |
| <b>Circ. do quadril (cm)</b>     | 116,1±8,9     | -                      | 122,6±11,9  | -                      |
| <b>Relaçãocintura/quadril</b>    | 0,91±0,1      | -                      | 0,8±0,1     | -                      |
| <b>PAS (mmHg)</b>                | 125,7±11,9    | 122,2±12,4             | 129,1±18,4  | 122,3±1                |
| <b>PAD (mmHg)</b>                | 75,5±13,4     | 72,2±9,3               | 75,8±10,3   | 73,7±8,2               |
| <b>FC(bpm)</b>                   | 75,6±12,6     | 69,8±10,4              | 70,1±12,9   | 73,1±10,8              |
| <b>Percentual de gordura (%)</b> | 39,5±3,9      | 39,3±3,8               | 41,1±4,2    | 41,3±3,5               |
| <b>Massa magra (%)</b>           | 60,4±6,4      | 60,6±3,8               | 59,2±6,1    | 58,6±3,5               |
| <b>Insulina (mIU/L)</b>          | 1,7±0,9       | <b>1,4 ± 0,7**</b>     | 1,9±1,1     | 1,5 ± 0,8              |
| <b>Glicose (mg/dL)</b>           | 200,2±95,0    | 193,0 ± 109            | 190,2±7     | <b>153,6 ± 61,1***</b> |
| <b>HbA1c (%)</b>                 | 8,0±1,7       | 7,3 ± 1,5              | 7,8±2,0     | 7,2 ± 2,5              |
| <b>CT (mg/dL)</b>                | 183,9±36,7    | 182,1 ± 41,2           | 198,0±37,8  | <b>187,8 ± 28,2*</b>   |
| <b>TG (mg/dL)</b>                | 161,0±79,8    | 148,4 ± 83,3           | 141,2±78,6  | 153,9 ± 72,7           |
| <b>HDL - c (mg/dL)</b>           | 43,0±8,1      | 44,1 ± 9,3             | 46,7±11,2   | <b>44,3 ± 9,6*</b>     |
| <b>LDL - c (mg/dL)</b>           | 108,6±26,2    | 105,6 ± 23,2           | 112,9±25,8  | <b>112,6 ± 22,5*</b>   |
| <b>VLDL - c (mg/dL)</b>          | 32,2±15,9     | 26,4 ± 9,5             | 28,2±15,7   | 30,8 ± 14,5            |
| <b>PCR (mg/dL)</b>               | 1,1±1,3       | 0,8 ± 0,7              | 0,9±0,6     | 0,7 ± 0,4              |
| <b>Peptídeo C (ng/mL)</b>        | 1,7±0,9       | <b>1,6 ± 0,7*</b>      | 1,7±0,9     | 1,5 ± 0,5              |
| <b>Grelin (pg/mL)</b>            | 45,5±19,8     | 47,3 ± 23,2            | 44,3±26,9   | 45,2 ± 33,3            |
| <b>GIP (pg/mL)</b>               | 24,3±14,6     | 20,4 ± 13,6            | 20,2±12,2   | 23,6 ± 17,6            |
| <b>GLP-1 (pM/L)</b>              | 1,1±1,0       | <b>3,6±3,6&amp;/**</b> | 0,9±0,6     | 1,4±1,3                |
| <b>Leptina (pg/mL)</b>           | 21880±19430   | 21460 ± 18257          | 25350±13330 | 26250 ± 14426          |
| <b>Glucagon (pg/mL)</b>          | 23,4±20,6     | 29,0 ± 26,4            | 31,4±53,4   | 30,8 ± 46,9            |
| <b>Adiponectina (ng/mL)</b>      | 11950±11540   | <b>15107 ± 18173*</b>  | 11590±6151  | 12212 ± 6723           |
| <b>Resistina (ng/mL)</b>         | 34,0±11,4     | 36,5 ± 13,8            | 36,0±18,7   | 35,9 ± 20,0            |
| <b>PP (pg/mL)</b>                | 30,1±24,1     | 35,0 ± 34,4            | 33,2±34,8   | 29,7 ± 29,4            |
| <b>PYY (pg/mL)</b>               | 39,2±21,7     | 36,5 ± 29,4            | 38,7±36,8   | 49,5 ± 31,4            |
| <b>IL-6 (pg/mL)</b>              | 2,1±1,3       | 2,01± 1,21             | 3,43±4,0    | 2,6 ± 2,5              |
| <b>LDL<sub>ox</sub> (U/L)</b>    | 74,8±31,3     | <b>67,3 ± 29,1*</b>    | 62,1±16,8   | 62,5 ± 20,0            |
| <b>NEFA (mmol/L)</b>             | 0,6±0,2       | 0,6 ± 0,2              | 0,6±0,2     | 0,6 ± 0,1              |

|   |                   |                   |                   |                                  |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>                | 0,5 $\pm$ 0,6     | 0,4 $\pm$ 0,4     | 0,3 $\pm$ 0,9     | <b>0,7<math>\pm</math>1,1**</b>  |
| <b>Endotelina (pg/mL)</b>                             | 1,6 $\pm$ 0,5     | 1,4 $\pm$ 0,3     | 1,6 $\pm$ 0,5     | 1,6 $\pm$ 0,5                    |
| <b>atvDPP4 (uM/mL/min)</b>                            | 9,3 $\pm$ 3,5     | 8,0 $\pm$ 3,4     | 9,6 $\pm$ 3,7     | <b>909 <math>\pm</math> 3,5*</b> |
| <b>Isoprostanos urinários (pg/Mmol/gr/creatinina)</b> | 283,2 $\pm$ 299,8 | 233,4 $\pm$ 122,3 | 214,2 $\pm$ 123,9 | 223,9 $\pm$ 78,5                 |

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP)

\*Avaliação intragrupo: \* P<0,05; \*\* P<0,01; P< 0,001

&Avaliação intergrupo: &P<0,05; &&P<0,01; &&&P<0,001

Legendas: IMC-índice de massa corporal, PAS – pressão arterial sistólica, PAD – pressão arterial diastólica, PAM – pressão arterial média, FC – frequência cardíaca, HbA1c – hemoglobina glicosilada, CT – colesterol total, TG – triglicerídeos, HDLc – lipoproteína de alta densidade, LDLc – lipoproteína de baixa densidade, VLDLc – lipoproteína de muita baixa densidade, GIP – polipeptídeoinsulínotropico glicose-dependente, GLP1 - peptídeo glucagon símile-1, PP – polipeptídeo pancreático, PYY – peptídeo YY, IL6 – interleucina 6, LDLox – lipoproteína de baixa densidade oxidada, NEFA – ácido graxo não esterificado, DPP4act – atividade da enzima dipeptidyl peptidase 4.

Fonte: A autora, 2018.

### 5.5.2 – Perfil lipídico e glicêmico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais após sobrecarga lipídica (efeitos agudos)

Os *slopes* calculados para cada variável não demonstraram qualquer diferença entre os grupos. Entretanto, ao calcularmos o intercepto para cada variável durante a sobrecarga lipídica, observamos que o grupo Vildagliptina apresentou níveis mais altos de GLP-1 (P=0,0017) e IL-6 (P<0,0001), enquanto a metformina apresentou maior intercepto para a leptina (P=0,04).

A comparação intragrupo por sua vez, demonstrou que a vildagliptina aumentou de forma significativa o intercepto da insulina (P=0,0002), GLP1 (P=0,01), polipeptídeo pancreático (P=0,0002) e leptina (P=0,003) e ainda, reduziu a atividade da enzima DPP4 (P=0,0002). Não observamos mudanças glicêmicas no grupo Vildagliptina ao passo que o grupo Metformina apresentou redução no intercepto para a glicemia(P=0,003) sem mudanças nas demais variáveis. As alterações intergrupo e intragrupo podem ser avaliadas através da tabela 9 a seguir.

Tabela 9 - Efeitos da Vildagliptina e Metformina sobre o perfil lipídico, marcadores inflamatórios e peptídeos intestinais após ingestão de refeição hiperlipídica

|   | Vildagliptina<br>(n=19)<br>Basal | Vildagliptina<br>(n=19)<br>Pós-tratamento | Metformina<br>(n=19)<br>Basal | Metformina<br>(n=19)<br>Pós-tratamento |
|---|----------------------------------|---|-------------------------------|--|
| Glicose <sub>intercepto</sub>           | 226,8±93,0                       | 216,3±109,2                               | 213,8±80,0                    | <b>175,3±61,6***</b>                   |
| Insulina <sub>intercepto</sub>          | 47,8±476,7                       | <b>1034±636,1***</b>                      | 1001±526,2                    | 993,5±415,7                            |
| CT <sub>intercepto</sub>                | 180,3±36,8                       | 177,2±40,4                                | 188,5±35,6                    | 184,7±27,5                             |
| TG <sub>intercepto</sub>                | 157,4±75,5                       | 146,2±80,4                                | 135,9±74,4                    | 144,7±67,5                             |
| HDL-C <sub>intercepto</sub>             | 41,7±8,5                         | 42,9±9,5                                  | 44,14±10,9                    | 43,4±9,5                               |
| LDL-C <sub>intercepto</sub>             | 107±26,9                         | 102,1±22,1                                | 116,8±23,3                    | 112,1±21,6                             |
| VLDL-C <sub>intercepto</sub>            | 30,9±16,1                        | 26,0±8,9                                  | 27,3±15,1                     | 29,2±13,6                              |
| Peptídeo C <sub>intercepto</sub>        | 2248±1112                        | 2179±1211                                 | 1823±942,6                    | 2018±624,2                             |
| Grelina <sub>intercepto</sub>           | 81,0±124,1                       | 48,4±22,0                                 | 44,9±26,5                     | 45,6±37,2                              |
| GIP <sub>intercepto</sub>               | 46,0±24,3                        | 64,8±35,3                                 | 52,2±34,9                     | 55,4±37,0                              |
| GLP-1 <sub>intercepto</sub>             | 2,5±1,8                          | <b>5,3±4,0**</b>                          | 2,1±1,08                      | <b>2,2±1,6&amp;&amp;&amp;</b>          |
| Glucagon <sub>intercepto</sub>          | 15,3±28,4                        | 26,5±25,2                                 | 29,0±43,5                     | 28,0±40,4                              |
| PP <sub>intercepto</sub>                | 31,2±32,5                        | <b>123,2±67,5***</b>                      | 92,6±63,1                     | 103,7±69,4                             |
| PYY <sub>intercepto</sub>               | 43,1±20,4                        | 45,1±26,1                                 | 42,6±32,3                     | 47,2±33,0                              |
| LDL <sub>ox</sub> <sub>intercepto</sub> | 44,5±59,4                        | 72,1±31,0                                 | 61,5±17,8                     | 61,3±21,4                              |
| NEFA <sub>intercepto</sub>              | 0,4±0,3                          | 0,6±0,2                                   | 0,6±0,1                       | 0,6±0,1                                |
| Leptina <sub>intercepto</sub>           | 4293±10864                       | <b>19102±17886**</b><br>*                 | 25384±13806                   | 25268±14088&                           |
| Adiponectina <sub>intercepto</sub>      | 15337±33018                      | 15588±21886                               | 12322±5965                    | 11659±6343                             |
| Resistina <sub>intercepto</sub>         | 19,6±30,0                        | 34,6±11                                   | 35,7±19,6                     | 34,5±19,1                              |
| IL-6 <sub>intercepto</sub>              | 1,9±2,6                          | 31,5±22,8                                 | 3,3±4,0                       | <b>2,4±2,6&amp;&amp;&amp;</b>          |
| Endotelina <sub>intercepto</sub>        | 1,5±1,3                          | 1,6±0,5                                   | 1,6±0,5                       | 1,6±0,5                                |
| atvDPP4 <sub>intercepto</sub>           | 10,2±3,4                         | <b>7,5±2,9***</b>                         | 9,5±3,5                       | 9,1±3,6                                |

Dados expressos em média±desvio padrão (DP)

\*Avaliação intragrupo: \* P<0,05; \*\* P<0,01; P< 0,001

&Avaliação intergrupo: & P<0,05; && P<0,01; &&&P<0,001

Legendas:CT – colesterol total, TG – triglicerídeos, HDLc – lipoproteína de alta densidade, LDLc – lipoproteína de baixa densidade, VLDLc – lipoproteína de muita baixa densidade, GIP – polipeptídeoinsulínico glicose-dependente, GLP1 - peptídeo glucagon símile-1, PP – polipeptídeo pancreático, PYY – peptídeo YY, IL6 – interleucina 6, LDLox – lipoproteína de baixa densidade oxidada, NEFA – ácido graxo não esterificado, atvDPP4 – atividade da enzima dipeptidyl peptidase 4.

Fonte: A autora, 2018.

## 5.6 – Eventos adversos

Todas as pacientes fizeram uso das medicações de forma regular conforme orientação médica e com boa aceitação. Ocorreram poucos relatos de intolerância ao tratamento, com predomínio de queixas gastrointestinais em sua totalidade. Não houve relato de eventos adversos graves durante toda a pesquisa. Não houve qualquer diferença nos eventos adversos entre os grupos.

A tabela 10 demonstra a incidência de eventos adversos leves relatados pelas pacientes durante o estudo.

Tabela 10- Efeitos colaterais relatados durante o estudo

| <b>Grupo</b>       | <b>Vildagliptina n (%)</b> | <b>Metformina n (%)</b> |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|
| Náuseas            | 2 (5,12)                   | 2 (5,12)                |
| Vômitos            | 0 (0)                      | 0 (0)                   |
| Diarreia           | 1 (2,56)                   | 3 (7,69)                |
| Constipação        | 2 (5,12)                   | 0 (0)                   |
| Plenitude Gástrica | 0 (0)                      | 1 (2,56)                |
| Dor abdominal      | 0 (0)                      | 1 (2,56)                |
| <b>Total</b>       | <b>5 (12,82)</b>           | <b>7 (17,94)</b>        |

Fonte: A autora, 2018.

## 6 – DISCUSSÃO

Duas principais características na fisiopatologia da aterosclerose estão intimamente relacionadas às complicações do diabetes: disfunção endotelial e inflamação de baixo grau(74). A microcirculação é o segmento mais importante do sistema cardiovascular, uma vez que é responsável pela regulação da perfusão tecidual, otimização do fornecimento de oxigênio e nutrientes, remoção das excretas celulares (75), bem como regulação da pressão hidrostática dos capilares, evitando flutuações da pressão intraluminal e conseqüentemente, regulação da resistência vascularperiférica(76).

O endotélio é uma camada única de células que reveste a parede interna dos vasos sanguíneos e linfáticos, ocupando uma área de superfície aproximada de 1 a 7 m<sup>2</sup>, estando acoplada estrutural e funcionalmente à camada muscular lisa vascular(77).Estruturalmente é bastante heterogêneo sob os seguintes aspectos: formato das células endoteliais, espaço entre elas, bem como a continuidade da camada formada. Estes fatores dependem da topografia do vaso sanguíneo, da velocidade e pressão do fluxo sanguíneo a que estão submetidas e dos eventos funcionais daquele determinado leito(78). Dependendo do tecido e da demanda, a densidade capilar funcional (DCF), ou seja, o número de microvasos compreendidos em determinada área de tecido é maior ou menor e a este processo de aumento da DCF demanda-dependente dá-se o nome de recrutamento capilar(79).

A microcirculação compreende o território vascular que engloba vasos com diâmetro menor que 100 µm e que inclui vênulas, capilares e arteríolas; sendo atualmente reconhecido como um fator envolvido na homeostase da glicose(80). Sabemos que a obesidade prejudica precocemente a reatividade vascular em crianças(22), adolescentes(81) e em mulheres jovens obesas (82). A enzima DPP4 por sua vez, está presente nas células endoteliais, sobretudo no sítio microcirculatório(82). Em comparação aos demais tecidos, estudos *in vitro* demonstram que sua atividade e expressão elevam-se de forma substancial durante a infusão de glicose apenas nestas célulasendoteliais(83), fornecendo uma justificativa para o uso de inibidores de DPP4 para protegê-las dos efeitos prejudiciais da hiperglicemia tanto ao nível microcirculatório(84) quanto macrocirculatório(85-87).

## **6.1 – Os efeitos distintos promovidos pela vildagliptina e metformina sobre a função endotelial em estado basal**

O achado principal observado em nosso estudo, relaciona-se à melhora da vasodilatação-endotélio dependente e –independente após somente 30 dias de terapia com vildagliptina em relação à metformina. Em contrapartida, a reatividade microvascular do tecido cutâneo foi marcadamente melhor no grupo tratado com metformina, representada por um melhor recrutamento capilar ao final do tratamento. Tal fato pode sugerir que mecanismos regulatórios distintos e sítio-específicos atuariam nesses vasos testados e seriam de forma distinta influenciados pelo uso das drogas testadas. Outro ponto importante a ser considerado, é o fato de que os achados descritos acima são independentes ao efeito antihiperlipêmico esperado pelo uso da vildagliptina, reforçando o conceito de que as modificações vasculares provocadas pela medicação seriam independentes ao seu efeito glicêmico.

A disfunção endotelial parece ser um fenômeno sistêmico, que afeta tanto os vasos de resistência quanto os vasos de condução (88). Dados recentes, sugerem que a disfunção endotelial coronariana é capaz de prever a progressão da doença aterosclerótica em longo prazo, assim como os eventos cardiovasculares (89), existindo correlação entre a resposta vasomotora observável no fluxo sanguíneo do antebraço (vasos de resistência) e das artérias coronárias (vasos de condução) (90). Portanto, o leito vascular do antebraço pode ser usado como uma ferramenta indireta para avaliar a função sistêmica endotelial, incluindo as artérias coronárias (88).

Dessa forma, nossos dados sugerem que em pacientes com DM2 virgens de tratamento e portadores de obesidade, o uso de um inibidor de DPP4 por apenas 30 dias, especificamente a vildagliptina, resultou em uma função vascular amplificada ao estímulo. Tal fato nos permite inferir que essa melhor resposta do vaso à vildagliptina se expressa em outros leitos vasculares que tenham mecanismos regulatórios semelhantes aos dos vasos aqui testados, possivelmente em leitos vasculares de órgãos-alvo como o coronário. Embora dados presentes na literatura mostrem benefícios semelhantes sobre essas variáveis com o uso da metformina (91;92), nosso estudo originalmente não observa esses achados com o uso deste medicamento e possivelmente esse achado pode ser explicado pelo curto período (30 dias) aqui empregado.

Um aspecto a ser considerado ao analisar nossos resultados, é a resposta distinta promovida pelas drogas de acordo com o calibre do vaso sanguíneo testado. O receptor do



GLP1 (GLP-1R) é um receptor acoplado à proteína G expresso em inúmeros órgãos; incluindo os vasos sanguíneos e o coração(93). Numerosos estudos demonstram os efeitos do GLP-1 na pressão arterial, frequência cardíaca, coagulabilidade, inflamação e função endotelial(94). Sua ativação possui também efeitos pleiotrópicos no sistema cardiovascular, aumentando a fosforilação da eNOS(95), além de também proteger os microvasos cardíacos contra o estresse oxidativo, apoptose e disfunção da barreira microvascular provocada pela hiperglicemia. Todos esses efeitos podem contribuir para a melhora da função cardíaca observada (96).

Sabemos ainda, que o GLP1 também é capaz de exercer seus efeitos não apenas através da produção de NO pelas células endoteliais(94;97), mas também através da ação direta na vasculatura das células do músculo liso (98). Eriksson e colaboradores corroboram esta hipótese, mostrando um efeito vasodilatador do GLP1 nas artérias femorais *ex vivo*, mesmo com inibição da eNOS e retirada do endotélio(93). GLP1 também teria a capacidade de inibir a proliferação das células musculares lisas(99), bem como reduzir a hiperplasia intimal(100). Esses achados observados previamente nos auxiliam no entendimento das respostas de curtíssimo prazo observadas com o uso da vildagliptina e, além disso, possivelmente corroboram nossas observações em relação às respostas amplificadas tanto na camada endotelial quanto na camada muscular dos vasos testados pela técnica da POV.

Acredita-se por sua vez, que a metformina exerça seus efeitos farmacológicos através da ativação do complexo AMPkinase (AMPK), levando à fosforilação da eNOS e liberação de NO(101;102). Parece também, aumentar a sinalização mediada pelo EDHF contribuindo para a melhora da função endotelial, provavelmente relacionada à uma produção reduzida de derivados da via da cicloxigenase(103). Tal fato poderia justificar os achados benéficos preponderantes na microcirculação nutritiva cutânea observada com a metformina. É possível que os efeitos de curtíssimo prazo já são observados nesse sítio vascular e poderiam estar relacionados a esses mecanismos regulatórios. Acreditamos, portanto, que os diferentes resultados encontrados entre os medicamentos possam ser justificados pelos distintos mecanismos de ação sobre cada seguimento vascular.

Apesar dos efeitos positivos relatados acima, os ensaios clínicos disponíveis na literatura são incapazes de demonstrar uma redução nos desfechos cardiovasculares em indivíduos diabéticos que tenham sido submetidos ao uso de inibidores de DPP4. Ao contrário, o estudo SAVOR-TIMI (*Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus*), onde 16.492 indivíduos diabéticos e com alto risco cardiovascular foram acompanhados por dois anos, não demonstrou diferença na incidência

de desfechos primários, tais como morte por doença cardiovascular, infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular encefálico em indivíduos tratados com saxagliptina ao serem comparados com placebo. Paradoxalmente, o estudo também observou uma maior incidência de internação por insuficiência cardíaca congestiva não fatal no grupo tratado com saxagliptina ao ser comparado com o grupo placebo (3,5 x 2,8%,  $P < 0,007$ ); sendo necessária a realização de outros estudos que esclarecessem melhor essa relação (104).

O estudo TECOS (*Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin*) por sua vez, avaliou a segurança cardiovascular da Sitagliptina em indivíduos portadores de DM2 e doença cardiovascular documentada. O estudo com duração média de três anos acompanhou cerca de 14.500 pacientes, não sendo observada nenhuma diferença na incidência de eventos cardiovasculares fatais ou não fatais entre os dois grupos avaliados (105). Por fim, uma metanálise englobando 40 estudos randomizados em que a vildagliptina foi comparada com outros hipoglicemiantes orais, não demonstrou diferença na incidência de complicações cardiovasculares entre os dois grupos (106).

Devemos lembrar que estes estudos foram conduzidos por apenas alguns anos, e em indivíduos com alto risco cardiovascular. Além disso, a maioria dos pacientes estavam recebendo estatinas, agentes antiplaquetários ou anti-hipertensivos, o que poderia ter influenciado os resultados encontrados. Nosso estudo por sua vez, foi conduzido em pacientes com diagnóstico recente de diabetes e sem doença macrovascular documentada. Apresentando portanto, um perfil metabólico distinto ao exposto acima. Acreditamos dessa forma, que estudos que abordem segurança, bem como redução do risco cardiovascular em longo prazo sejam necessários, contemplando indivíduos em todas as faixas de risco cardiovascular.

## **6.2 – Os efeitos promovidos pela vildagliptina e metformina no período pós-prandial sobre a função endotelial e perfil lipídico**

Embora os benefícios promovidos pela metformina e os inibidores da DPP4 no controle glicêmico no DM2 já estejam bem definidos, até o presente momento, não encontramos estudos que compararam seus efeitos durante o estado pós-prandial, sobretudo após uma refeição rica em lipídios.

Em nosso estudo, tanto a reatividade vascular quanto a vasomotricidade após a sobrecarga lipídica eram semelhantes em ambos os grupos. Entretanto, ao final do estudo a

metformina promoveu um efeito marcado na microcirculação nutritiva cutânea, isto é, no recrutamento capilar; ao passo que a vildagliptina apresentou melhores efeitos na microcirculação não-nutritiva bem como na vasomotricidade. Quando avaliamos os seus efeitos de forma pareada (análise intragrupo), observamos neutralidade da resposta da vasomotricidade no grupo tratado com vildagliptina, enquanto o grupo metformina mostrou uma diminuição na frequência de vasomotricidade na microcirculação; sugerindo que os inibidores da DPP4 seriam capazes de atenuar os efeitos deletérios da lipotoxicidade sobre a vasomotricidade.

Em concordância com nosso trabalho, alguns estudos avaliaram os efeitos dos agentes antihiperlipemiantes sobre a microcirculação através da LDF, mas nenhum deles analisou esses efeitos no período pós-prandial. Skrha e colaboradores não observaram mudança na microcirculação avaliada pela LDF em indivíduos diabéticos após uso de metformina por três meses (107). Em contraste, vários estudos foram capazes de demonstrar, através da LDF, uma melhora na reatividade vascular em indivíduos diabéticos após a utilização de inibidores da DPP4 (108;109).

Além do efeito incretínico bem documentado do GLP-1 sobre o controle glicêmico, seu papel no sistema cardiovascular também suscita interesse, embora seu papel fisiológico sobre esse sistema ainda seja pouco conhecido. Uma possível explicação para sua importância, seria considerar GLP-1 como um fator de proteção endógeno para o sistema vascular quando essa defesa é especialmente necessária: frente ao insulto oxidativo e metabólico durante uma refeição, em especial hiperlipídica (46).

Em indivíduos saudáveis, o aumento fisiológico dos níveis de insulina pós-prandial reduz o VLDL-c endógeno e inibe a lipólise do tecido adiposo, através da ativação da lipoproteína-lipase. Pacientes com DM2, por sua vez, possuem TG mais elevados em jejum, níveis mais baixos de HDL-c, bem como maior acúmulo de LDL-c que é mais facilmente oxidado (82). Após a ingestão de uma refeição rica em lipídios, pacientes com obesidade e DM2 apresentam elevação exagerada e prolongada dos triglicerídeos e dos marcadores inflamatórios (110), atingindo um pico pós-prandial após 4 horas e permanecendo elevados até 8 horas; predispondo alterações no metabolismo lipídico com tendência ao desenvolvimento da aterosclerose (80;111).

Nesse processo, classificado como lipotoxicidade alimentar, as células endoteliais são particularmente suscetíveis, havendo um significativo processamento das lipoproteínas e da sua interação com lipases hidrolíticas, bem como sua exposição constante aos ácidos graxos e colesterol no plasma (82;83). Estudos com modelos animais, mostram que ácidos graxos

saturados e dietas enriquecidas com colesterol aumentam a peroxidação lipídica (87), alteram os fosfolípidos das membranas celulares(112), causam disfunção mitocondrial e deflagram as vias apoptóticas(57). Em indivíduos com síndrome metabólica, bem como naqueles saudáveis, o jejum prolongado e o triglicérides pós-prandial foram relacionados ao aumento da espessura da mediointimal nas carótidas(98), além de provocar prejuízo à vasodilatação endotélio-dependente da artéria braquial(93).

Sugere-se que os inibidores de DPP4 também possam influenciar o metabolismo lipídico, embora os ensaios clínicos apresentem dados inconsistentes(113). Uma extensa metanálise sugeriu que essas drogas seriam capazes de reduzir os níveis de CT e TG(114), provavelmente por um efeito direto da estimulação do receptor GLP1 no metabolismo do colesterol(115). Terawaki e colaboradores, por sua vez, demonstraram que a linagliptina foi capaz de diminuir os níveis séricos de LDLox em pacientes com DM2 submetidos à diálise, independente dos efeitos glicêmicos, sugerindo uma redução no estresse oxidativo(116). Nosso estudo não foi capaz de demonstrar mudanças no perfil lipídico após a sobrecarga lipídica com o uso de vildagliptina. Entretanto, observamos que, em estado basal (período de jejum), a vildagliptina apresentou redução nos níveis de LDLox, sendo um importante fator para a predição de doenças cardiovasculares em pacientes com DM2(117).

A literatura também mostra resultados discrepantes sobre a influência da metformina no perfil lipídico(118), sugerindo efeitos positivos(119) ou neutros(120). Em nosso estudo, observamos uma redução nos níveis de CT, LDLc e HDLc em estado basal, mas sem mudanças após a sobrecarga lipídica. Acreditamos que outros estudos sejam necessários para esclarecer os achados que encontramos, embora seja importante ressaltar que, estudos onde se avalia os níveis incretínicos em indivíduos diabéticos no período pós-prandial mostram respostas distintas dependendo dos ácidos graxos oferecidos nas refeições. Observa-se que uma refeição rica em ácidos graxos monoinsaturados é capaz de atuar como um forte estimulador das secreções de GIP e GLP-1 ao contrário da refeição rica em ácidos graxos saturados (20). Acreditamos dessa forma, que a alta concentração de gordura saturada oferecida em nosso estudo poderia ter limitado os nossos resultados sobre o metabolismo lipídico. Entretanto, o foco principal do nosso estudo foi a investigação das respostas vasculares e sabidamente dietas ricas em gorduras saturadas têm um papel agressor superior.

### **6.3 – Os efeitos promovidos pela vildagliptina e metformina sobre níveis glicêmicos, marcadores inflamatórios, peptídeos intestinais e demais parâmetros metabólicos**

À medida que a glicemia se eleva os inibidores de DPP4 aumentam a biodisponibilidade de GPL1. Com isso, promovem uma melhora do funcionamento da célula beta-pancreática, aumentando a taxa de secreção de insulina; bem como suprimindo a secreção de glucagon pelas células alfa-pancreáticas com conseqüente redução da produção endógena de glicose, reforçando o conceito de que sua ação se dá de forma glicose-dependente (121). Em contrapartida, o principal mecanismo de ação da metformina no controle glicêmico ocorre primariamente por diminuir a gliconeogênese hepática, promovendo redução na glicemia de jejum (122). Essa característica poderia justificar os níveis mais baixos de glicemia encontrados após trinta dias de tratamento tanto no período de jejum bem como após a refeição hiperlipídica.

A primeira fase do nosso estudo foi conduzida no jejum onde não se observou mudanças no perfil glicêmico com o uso da vildagliptina. Seguindo essa lógica, observamos uma redução nos níveis de insulina e peptídeo C, em concomitância com níveis mais elevados de GLP1; provavelmente em decorrência de uma menor demanda pancreática esperada no estado de jejum. Posteriormente, embora tenhamos encontrado um aumento significativo nos níveis de GLP1 e de insulina, bem como uma esperada redução na atividade da enzima DPP4 no período pós-prandial ainda assim não observamos mudanças expressivas nos níveis glicêmicos.

Tais achados não podem ser justificados por propriedades intrínsecas à vildagliptina; uma vez que sua absorção não é influenciada por etnia, tipo de ingesta alimentar ou meia-vida (123). Portanto, devemos ressaltar e valorizar a neutralidade nos efeitos glicêmicos observados em nosso estudo, por reforçar o conceito de que os efeitos vasculares promovidos tanto em longo quanto curto prazos seriam gerados de forma independente à variação glicêmica.

O tecido adiposo não só armazena energia, mas também é um complexo órgão endócrino capaz de produzir um grande número de adipocitocina. Em indivíduos obesos, observamos uma produção exacerbada dessas substâncias, tais como ácidos graxos não esterificados (NEFA), angiotensinogênio, leptina, resistina, TNF- $\alpha$  e IL-6, assim como uma substancial redução nos níveis de adiponectina, uma adipocina metabolicamente protetora (124).

Ao contrário do que frequentemente é observado com o uso da metformina, a vildagliptina não foi capaz de promover uma redução do peso corporal. No entanto, apesar do efeito neutro sobre a composição corporal, o tratamento com vildagliptina por trinta dias foi capaz de promover um aumento nos níveis de adiponectina, cuja expressão é maior no tecido adiposo subcutâneo em detrimento ao visceral e está inversamente relacionada ao estado inflamatório e à resistência à insulina (125). A adiponectina também está envolvida na oxidação de ácidos graxos, produção de NO pelas células endoteliais, redução da produção de glicose hepática, inibição da adesão de monócitos bem como inibição da transformação de macrófagos em células espumosas na parede vascular (82). Acreditamos dessa forma, que apesar da neutralidade observada no peso corporal, o aumento nos níveis de adiponectina poderia refletir uma melhora da sensibilidade insulínica aos tecidos periféricos.

Embora inicialmente visto como um hormônio antiobesidade, o papel principal da leptina é servir como sinal metabólico de caráter sacietógeno quando os estoques energéticos são atingidos; havendo de forma análoga, redução abrupta durante a restrição calórica ou na perda de peso(126). Suas concentrações plasmáticas aumentam horas após uma refeição e, em humanos, por vários dias após um episódio de hiperfagia; sugerindo que a mesma possa atuar no controle de ingestão alimentar tanto a curto quanto em longo prazo (127).

Em nossa pesquisa, a sobrecarga lipídica promoveu níveis mais elevados de leptina no grupo metformina em comparação à vildagliptina; enquanto que a vildagliptina apresentou alterações nos níveis de leptina apenas na avaliação intragrupo, sugerindo que ambas possam exercer efeitos sobre essa adipocina, de forma mais atenuada quando a vildagliptina é empregada. Não encontramos ensaios clínicos na literatura que estabeleçam a relação entre os níveis de leptina e o efeito incretínico. Estudos experimentais mostram que a restrição alimentar diminui as concentrações plasmáticas de leptina de forma simultânea à expressão de GLP-1 no hipotálamo, sendo possível que a interdependência desses dois biomarcadores possa modular os centros cerebrais hipotalâmicos envolvidos no apetite (128).

No que diz respeito à metformina, entretanto, ainda não parece claro se a mesma é capaz de produzir algum efeito no metabolismo da leptina (129;130). Apesar das limitações relatadas acima, acreditamos que a metformina e em menor grau, a vildagliptina, possam exercer efeito sobre leptina e talvez sobre o mecanismo de saciedade promovido por ela, embora a quantificação de fome e saciedade não tenha sido objeto de nosso estudo.

Também observamos no período pós-prandial um nível inesperadamente elevado de IL6 no grupo tratado com vildagliptina em comparação à metformina. Este importante mediador da resposta imune e processo inflamatório é produzido não apenas pelo tecido

adiposo, mas também pelas células endoteliais, bem como pelas células musculares lisas (131). Tanto em humanos (132) quanto em modelos animais (133), seus níveis estão relacionados à uma piora do perfil lipídico e parece haver um aumento nos seus níveis séricos durante a ingestão de refeição rica em lipídeos(134). A análise desses dados nos sugere que a metformina tenha sido capaz de evitar esta resposta inflamatória no período pós-prandial em detrimento da vildagliptina, por mecanismos que ainda não são totalmente esclarecidos.

Em período pós-prandial, nosso estudo também mostrou níveis inesperadamente elevados de TNF- $\alpha$  no grupo metformina. Esta adipocina está elevada em indivíduos obesos, sobretudo naqueles resistentes à insulina e com acúmulo de gordura predominantemente visceral (135). Nossa amostra foi calculada com base nas características metodológicas da reatividade microvascular medida através videocapilaroscopia. Acreditamos dessa forma, que nosso número amostral possa ter, de certo modo, influenciado esses resultados inesperados tanto para o IL-6 quanto para o TNF- $\alpha$ .

## **7 – RESUMO DOS ACHADOS**

Este estudo nos mostrou que a terapia antihiperlipemizante oral com vildagliptina ou metformina em pacientes com obesidade e DM2 virgens de tratamento promoveu melhora da função vascular e que esta melhora ocorreu de forma distinta na dependência da droga empregada e do calibre do vaso sanguíneo testado, da seguinte maneira:

### **7.1 - Efeitos agudos após sobrecarga lipídica**

Ao exercer seus efeitos sobre a microcirculação, a metformina foi capaz de promover um maior recrutamento capilar, mesmo em estado pós-prandial. A vildagliptina, por sua vez, foi capaz de atenuar os efeitos deletérios promovidos pela sobrecarga lipídica sobre a vasomotricidade. Ambas as medicações, entretanto, não foram capazes de promover mudanças no perfil lipídico.

Em relação aos marcadores inflamatórios, ambas as drogas foram capazes de promover efeitos sobre a leptina. Entretanto, o papel desse efeito ainda é pouco conhecido, sendo necessário novos ensaios clínicos para elucidação dessa relação.

### **7.2 - Efeitos em curto-prazo após terapia farmacológica por trinta dias**

Ao estimular os efeitos incretínicos do GLP1, a vildagliptina foi capaz de atuar benéficamente sobre vasos de maior calibre (vasos de resistência), promovendo uma melhor resposta ao fluxo sanguíneo endotélio-dependente e -independente. Em contrapartida, ao exercer seus efeitos sobre a microcirculação, a metformina é capaz de promover um maior recrutamento capilar durante o período testado.

A neutralidade sobre a glicemia plasmática evidenciada no grupo tratado com vildagliptina merece atenção, reforçando o conceito de mecanismos extra-glicêmicos na melhora da função vascular. Além disso, a vildagliptina reduziu os níveis de insulina e



peptídeo C, bem como promoveu elevação nos níveis de adiponectina. Atribuímos esses achados a uma menor demanda pancreática, bem como melhora da resistência insulínica presente nos tecidos periféricos, respectivamente.

Em relação à composição corporal, a metformina promoveu redução peso, ao passo que a vildagliptina mostrou-se neutra. A metformina também foi capaz de melhorar o perfil lipídico, ao passo que a vildagliptina, reduziu os níveis de LDLox após trinta dias de terapia farmacológica.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso estudo mostrou que a vildagliptina e a metformina são capazes de melhorar a função vascular testada no jejum, tanto no uso diário em curto prazo, quanto de forma aguda, no estado PP. Esse processo ocorre através de mecanismos de ação distintos, e talvez complementares, com uma predileção da vildagliptina para atuar em vasos relacionados à resistência vascular periférica, enquanto a metformina atuaria sobre o microfluxo nutritivo ao nível capilar. Dessa forma sob ponto de vista de vaso-proteção, uma classe não deve substituir a outra no tratamento do DM2. Apesar de nossos achados se limitarem a uma avaliação de curto prazo e também aos efeitos agudos dessas drogas, possivelmente a vildagliptina e a metformina são complementares em suas ações na busca por melhora da função endotelial, fator primordial na prevenção das complicações vasculares promovidas pelo diabetes.

## REFERÊNCIAS

- (1) Aucott L, Poobalan A, Smith WC, Avenell A, Jung R, Broom J. Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term hypertension outcomes: a systematic review. *Hypertension* 2005 Jun;45(6):1035-41.
- (2) IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares. 2010.
- (3) Portal Brasil. [www.brasil.gov.br/saude/2013](http://www.brasil.gov.br/saude/2013). 2013.
- (4) Burke GL, Bertoni AG, Shea S, Tracy R, Watson KE, Blumenthal RS, et al. The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Intern Med* 2008 May 12;168(9):928-35.
- (5) Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006 Aug 24;355(8):763-78.
- (6) Resnick HE, Harris MI, Brock DB, Harris TB. American Diabetes Association diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease risk profiles: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2000 Feb;23(2):176-80.
- (7) Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005 Dec;19(4):649-63.
- (8) Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006 Mar;3(3):153-65.
- (9) DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009 Nov;32 Suppl 2:S157-S163.
- (10) DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 2004 Jul;88(4):787-835, ix.
- (11) Gan L, Xiang W, Xie B, Yu L. Molecular mechanisms of fatty liver in obesity. *Front Med* 2015 Sep;9(3):275-87.
- (12) Golay A, Felber JP, Jallut D, Munger R, Ruiz J, Jequier E. Effect of lipid oxidation on the regulation of glucose utilization in obese patients. *Acta Diabetol* 1995 Mar;32(1):44-8.
- (13) Santomauro AT, Boden G, Silva ME, Rocha DM, Santos RF, Ursich MJ, et al. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1999 Sep;48(9):1836-41.

- (14) Maranhao PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* 2011 May 28;8(1):32.
- (15) Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979 Sep;60(3):473-85.
- (16) Stensvold I, Tverdal A, Urdal P, Graff-Iversen S. Non-fasting serum triglyceride concentration and mortality from coronary heart disease and any cause in middle aged Norwegian women. *BMJ* 1993 Nov 20;307(6915):1318-22.
- (17) Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. [Non-fasting triglycerides and risk of for myocardial infarction and death among women and men]. *Ugeskr Laeger* 2007 Nov 5;169(45):3865-8.
- (18) Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. [Non-fasting triglycerides and risk of for myocardial infarction and death among women and men]. *Ugeskr Laeger* 2007 Nov 5;169(45):3865-8.
- (19) Klop B, Proctor SD, Mamo JC, Botham KM, Castro CM. Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle behaviour and metabolic diseases. *Int J Vasc Med* 2012;2012:947417.
- (20) Ansar S, Koska J, Reaven PD. Postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: focus on incretins. *Cardiovasc Diabetol* 2011 Jul 7;10:61.
- (21) Vilar L. Endocrinologia clínica. Investigaç o diagn stica das dislipidemias. 815-829. 2013.
- (22) Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003 Jun;14(3):281-7.
- (23) Gryglewski RJ. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 1995 Jul;77(1):1-9.
- (24) Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 2003 Apr;20(4):255-68.
- (25) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 Dec 19;420(6917):868-74.
- (26) Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994 Feb;74(2):349-53.
- (27) Bouloumie A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1999 Mar;41(3):773-80.

- (28) Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000 Feb 15;101(6):676-81.
- (29) Hu Q, Ziegelstein RC. Hypoxia/reoxygenation stimulates intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2000 Nov 14;102(20):2541-7.
- (30) Matsubara J, Sugiyama S, Akiyama E, Iwashita S, Kurokawa H, Ohba K, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease and uncontrolled diabetes. *Circ J* 2013;77(5):1337-44.
- (31) Laufs U, La F, V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998 Mar 31;97(12):1129-35.
- (32) van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Koning EJ, Rabelink TJ, et al. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 2003 Mar;44(3):576-83.
- (33) Altman R, Keenan AH, Newman JW, Rutledge JC. The Postprandial Effects of a Moderately High-Fat Meal on Lipid Profiles and Vascular Inflammation in Alzheimer's Disease Patients: A Pilot Study. *J Gen Pract (Los Angel )* 2014;2(6).
- (34) Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986 Aug;63(2):492-8.
- (35) Ebert R, Unger H, Creutzfeldt W. Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoadsorption. *Diabetologia* 1983 Jun;24(6):449-54.
- (36) Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 May;84(10):3434-8.
- (37) Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H, Drucker DJ. beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* 2005 Feb;54(2):482-91.
- (38) Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 2002 Sep;45(9):1263-73.
- (39) Ehses JA, Casilla VR, Doty T, Pospisilik JA, Winter KD, Demuth HU, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2003 Oct;144(10):4433-45.
- (40) Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007 Oct;87(4):1409-39.

- (41) Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, Zheng S, Sabo M, et al. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 May;288(5):G943-G949.
- (42) Meier JJ, Gethmann A, Gotze O, Gallwitz B, Holst JJ, Schmidt WE, et al. Glucagon-like peptide 1 abolishes the postprandial rise in triglyceride concentrations and lowers levels of non-esterified fatty acids in humans. *Diabetologia* 2006 Mar;49(3):452-8.
- (43) Wojdemann M, Wettergren A, Sternby B, Holst JJ, Larsen S, Rehfeld JF, et al. Inhibition of human gastric lipase secretion by glucagon-like peptide-1. *Dig Dis Sci* 1998 Apr;43(4):799-805.
- (44) Liu H, Hu Y, Simpson RW, Dear AE. Glucagon-like peptide-1 attenuates tumour necrosis factor-alpha-mediated induction of plasminogen [corrected] activator inhibitor-1 expression. *J Endocrinol* 2008 Jan;196(1):57-65.
- (45) Vilsboll T. Liraglutide: a once-daily GLP-1 analogue for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs* 2007 Feb;16(2):231-7.
- (46) Ceriello A, Esposito K, Testa R, Bonfigli AR, Marra M, Giugliano D. The possible protective role of glucagon-like peptide 1 on endothelium during the meal and evidence for an "endothelial resistance" to glucagon-like peptide 1 in diabetes. *Diabetes Care* 2011 Mar;34(3):697-702.
- (47) Sjöholm A. Impact of glucagon-like peptide-1 on endothelial function. *Diabetes Obes Metab* 2009 Dec;11 Suppl 3:19-25.
- (48) Mancini MC, Geloneze B, Salles JEN, de Lima JG, Carra MK. Tratado de obesidade. Regulação central do balanço energético. 1, 55-69. 2010.
- (49) Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E, et al. Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2001 Mar;24(3):489-94.
- (50) Kraemer de Aguiar LG, Laflor CM, Bahia L, Villela NR, Wiernsperger N, Bottino DA, et al. Metformin improves skin capillary reactivity in normoglycaemic subjects with the metabolic syndrome. *Diabet Med* 2007 Mar;24(3):272-9.
- (51) de Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, Laflor C, Sicuro F, Wiernsperger N, et al. Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2006 May;29(5):1083-9.
- (52) Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem* 2009;16(23):2943-51.
- (53) da Silva Junior W.S. DipeptidylPeptidase 4: A New Link between Diabetes Mellitus and Atherosclerosis? de Godoy-Matos A.F., Kraemer-Aguiar LG, editors. *BioMed Research International* . 201.

- (54) Lee SA, Kim YR, Yang EJ, Kwon EJ, Kim SH, Kang SH, et al. CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Jun;98(6):2553-61.
- (55) Ryskjaer J, Deacon CF, Carr RD, Krarup T, Madsbad S, Holst J, et al. Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake. *Eur J Endocrinol* 2006 Sep;155(3):485-93.
- (56) Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, et al. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005 Jun;48(6):1168-72.
- (57) Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol* 2011 Jul;55(1-3):10-6.
- (58) Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 2011 Jul;60(7):1917-25.
- (59) Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017 Nov 23;3:17088.
- (60) Assoc.Bras.para o estudo da obesidade e síndrome metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. [www.abeso.org.br](http://www.abeso.org.br). 2010.
- (61) Nakazone MA, Pinheiro A, Braile MC, Pinhel MA, de Sousa GF, Pinheiro S Jr, et al. [Prevalence of metabolic syndrome using NCEP-ATPIII and IDF definitions in Brazilian individuals]. *Rev Assoc Med Bras (1992 )* 2007 Sep;53(5):407-13.
- (62) 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017 Jan;40(Suppl 1):S11-S24.
- (63) Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA* 2013 Nov 20;310(19):2061-8.
- (64) Kraemer-Aguiar LG, de Miranda ML, Bottino DA, Lima RA, de SM, Balarini MM, et al. Increment of body mass index is positively correlated with worsening of endothelium-dependent and independent changes in forearm blood flow. *Front Physiol* 2015;6:223.
- (65) Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part II. *Clin Pharmacokinet* 1998 Jul;35(1):9-36.
- (66) Kraemer-Aguiar LG, Maranhao PA, Sicuro FL, Bouskela E. Microvascular dysfunction: a direct link among BMI, waist circumference and glucose homeostasis in young overweight/obese normoglycemic women? *Int J Obes (Lond)* 2010 Jan;34(1):111-7.

- (67) Buss C, Kraemer-Aguiar LG, Maranhao PA, Marinho C, de Souza MG, Wiernsperger N, et al. Novel findings in the cephalic phase of digestion: A role for microcirculation? *Physiol Behav* 2012 Feb 28;105(4):1082-7.
- (68) Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 1997 Jun;42(6):168-75.
- (69) Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 1972 Nov;11(11):936-44.
- (70) Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975 Mar 6;254(5495):56-8.
- (71) Ahn H, Johansson K, Lundgren O, Nilsson GE. In vivo evaluation of signal processors for laser Doppler tissue flowmeters. *Med Biol Eng Comput* 1987 Mar;25(2):207-11.
- (72) Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci* 2013 Jul;34(7):373-84.
- (73) Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, Kirkeboen KA. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc Res* 2006 Nov;72(3):120-7.
- (74) Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Segura-Galindo A, Del Canizo-Gomez FJ. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World J Diabetes* 2014 Aug 15;5(4):444-70.
- (75) Verdant C, De BD. How monitoring of the microcirculation may help us at the bedside. *Curr Opin Crit Care* 2005 Jun;11(3):240-4.
- (76) Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* 2001 Aug 7;104(6):735-40.
- (77) Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998 May 15;91(10):3527-61.
- (78) Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007 Feb 2;100(2):158-73.
- (79) Koepen BM, Stanton B. *Fisiologia. Bern & Levy.* 209.
- (80) Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001 Feb 1;154(2):475-83.
- (81) Castro CM, Botham KM, Mamo JC, Proctor SD. Novel Aspects of Nonfasting Lipemia in relation to Vascular Biology. *Int J Vasc Med* 2012;2012:419015.



- (82) Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 Apr;64(4):355-65.
- (83) Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995 Aug;44(8):863-70.
- (84) Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Biol Chem* 2001 Nov 9;276(45):42468-76.
- (85) Boquist S, Ruotolo G, Tang R, Bjorkegren J, Bond MG, de FU, et al. Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* 1999 Aug 17;100(7):723-8.
- (86) Lupattelli G, Lombardini R, Schillaci G, Ciuffetti G, Marchesi S, Siepi D, et al. Flow-mediated vasoactivity and circulating adhesion molecules in hypertriglyceridemia: association with small, dense LDL cholesterol particles. *Am Heart J* 2000 Sep;140(3):521-6.
- (87) Matheussen V, Baerts L, De MG, De KG, Van d, V, Augustyns K, et al. Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. *Biol Chem* 2011 Mar;392(3):189-98.
- (88) Wilkinson IB, Webb DJ. Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2001 Dec;52(6):631-46.
- (89) Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000 Apr 25;101(16):1899-906.
- (90) Hirooka Y, Egashira K, Imaizumi T, Tagawa T, Kai H, Sugimachi M, et al. Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans. *J Am Coll Cardiol* 1994 Oct;24(4):948-55.
- (91) Kraemer-Aguiar LG, Boyko EJ. Metformin and vasculoprotection: clinical aspects. *Transworld Research Network* 2, 111-129. 2008.
- (92) Magalhaes FO, Gouveia LM, Torquato MT, Paccola GM, Piccinato CE, Foss MC. Metformin increases blood flow and forearm glucose uptake in a group of non-obese type 2 diabetes patients. *Horm Metab Res* 2006 Aug;38(8):513-7.
- (93) Eriksson L, Nystrom T. Antidiabetic agents and endothelial dysfunction - beyond glucose control. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015 Jul;117(1):15-25.
- (94) Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* 2008 May 6;117(18):2340-50.

- (95) Wang D, Luo P, Wang Y, Li W, Wang C, Sun D, et al. Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular injury in diabetes via a cAMP/PKA/Rho-dependent mechanism. *Diabetes* 2013 May;62(5):1697-708.
- (96) Saraiva FK, Sposito AC. Cardiovascular effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonists. *Cardiovasc Diabetol* 2014 Oct 22;13:142.
- (97) Richter G, Feddersen O, Wagner U, Barth P, Goke R, Goke B. GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am J Physiol* 1993 Oct;265(4 Pt 1):L374-L381.
- (98) Nystrom T, Gonon AT, Sjöholm A, Pernow J. Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regul Pept* 2005 Feb 15;125(1-3):173-7.
- (99) Goto H, Nomiya T, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Komiya K, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Feb 4;405(1):79-84.
- (100) Murthy SN, Hilaire RC, Casey DB, Badejo AM, McGee J, McNamara DB, et al. The synthetic GLP-I receptor agonist, exenatide, reduces intimal hyperplasia in insulin resistant rats. *Diab Vasc Dis Res* 2010 Apr;7(2):138-44.
- (101) Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2003 Aug 22;278(34):31629-39.
- (102) Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 2006 Feb;55(2):496-505.
- (103) Gao X, Martinez-Lemus LA, Zhang C. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. *World J Cardiol* 2011 Jan 26;3(1):25-31.
- (104) Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2013 Oct 3;369(14):1317-26.
- (105) Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, et al. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015 Jul 16;373(3):232-42.
- (106) McInnes G, Evans M, Del PS, Stumvoll M, Schweizer A, Lukashevich V, et al. Cardiovascular and heart failure safety profile of vildagliptin: a meta-analysis of 17 000 patients. *Diabetes Obes Metab* 2015 Nov;17(11):1085-92.
- (107) Skrha J, Prazny M, Hilgertova J, Kvasnicka J, Kalousova M, Zima T. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol* 2007 Dec;63(12):1107-14.

- (108) Baltzis D, Dushay JR, Loader J, Wu J, Greenman RL, Roustit M, et al. Effect of Linagliptin on Vascular Function: A Randomized, Placebo-controlled Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 Nov;101(11):4205-13.
- (109) Ott C, Raff U, Schmidt S, Kistner I, Friedrich S, Bramlage P, et al. Effects of saxagliptin on early microvascular changes in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2014 Jan 14;13:19.
- (110) Klauser R, Prager R, Schernthaner G, Olefsky JM. Contribution of postprandial insulin and glucose to glucose disposal in normal and insulin-resistant obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 Oct;73(4):758-64.
- (111) Enkhmaa B, Ozturk Z, Anuurad E, Berglund L. Postprandial lipoproteins and cardiovascular disease risk in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2010 Feb;10(1):61-9.
- (112) Pala L, Pezzatini A, Dicembrini I, Ciani S, Gelmini S, Vannelli BG, et al. Different modulation of dipeptidyl peptidase-4 activity between microvascular and macrovascular human endothelial cells. *Acta Diabetol* 2012 Dec;49 Suppl 1:S59-S63.
- (113) Aschner P, Katzeff HL, Guo H, Sunga S, Williams-Herman D, Kaufman KD, et al. Efficacy and safety of monotherapy of sitagliptin compared with metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2010 Mar;12(3):252-61.
- (114) Monami M, Lamanna C, Desideri CM, Mannucci E. DPP-4 inhibitors and lipids: systematic review and meta-analysis. *Adv Ther* 2012 Jan;29(1):14-25.
- (115) Juntti-Berggren L, Pigon J, Karpe F, Hamsten A, Gutniak M, Vignati L, et al. The antidiabetogenic effect of GLP-1 is maintained during a 7-day treatment period and improves diabetic dyslipoproteinemia in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1996 Nov;19(11):1200-6.
- (116) Terawaki Y, Nomiyama T, Takahashi H, Tsutsumi Y, Murase K, Nagaishi R, et al. Efficacy of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin in patients with type 2 diabetes undergoing hemodialysis. *Diabetol Metab Syndr* 2015;7:44.
- (117) Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Kume A, et al. Predictive value of circulating oxidized LDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care* 2004 Mar;27(3):843-4.
- (118) Wulffele MG, Kooy A, de ZD, Stehouwer CD, Gansevoort RT. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Intern Med* 2004 Jul;256(1):1-14.
- (119) Eleftheriadou I, Grigoropoulou P, Katsilambros N, Tentolouris N. The effects of medications used for the management of diabetes and obesity on postprandial lipid metabolism. *Curr Diabetes Rev* 2008 Nov;4(4):340-56.
- (120) Groop L, Widen E, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Schalin C, et al. Different effects of insulin and oral antidiabetic agents on glucose and energy metabolism in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1989 Aug;32(8):599-605.

- (121) Gerlies Bock, Chiara Dalla Man, Francesco Micheletto, Rita Basu. The effect of DPP-4 inhibition with sitagliptin on incretin secretion and on fasting and postprandial glucose turnover in subjects with impaired fasting glucose. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 73(2), 189-196. 2010.
- (122) Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 2012 Jul;27(4):269-73.
- (123) He YL. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin. *Clin Pharmacokinet* 2012 Mar 1;51(3):147-62.
- (124) Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jun;89(6):2548-56.
- (125) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Apr 2;257(1):79-83.
- (126) Izadi V, Saraf-Bank S, Azadbakht L. Dietary intakes and leptin concentrations. *ARYA Atheroscler* 2014 Sep;10(5):266-72.
- (127) Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* 2003 May;111(9):1409-21.
- (128) Ronveaux CC, Tome D, Raybould HE. Glucagon-like peptide 1 interacts with ghrelin and leptin to regulate glucose metabolism and food intake through vagal afferent neuron signaling. *J Nutr* 2015 Apr;145(4):672-80.
- (129) Romualdi D, Campagna G, Selvaggi L, Jr., Cento R, Proto C, Lanzone A, et al. Metformin treatment does not affect total leptin levels and free leptin index in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008 May;89(5):1273-6.
- (130) Nar A, Gedik O. The effect of metformin on leptin in obese patients with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease. *Acta Diabetol* 2009 Jun;46(2):113-8.
- (131) Papanicolaou DA, Vgontzas AN. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Mar;85(3):1331-3.
- (132) Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Sep;85(9):3338-42.
- (133) Memon RA, Holleran WM, Moser AH, Seki T, Uchida Y, Fuller J, et al. Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Aug;18(8):1257-65.
- (134) Lundman P, Boquist S, Samnegard A, Bennermo M, Held C, Ericsson CG, et al. A high-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007 Mar;17(3):195-202.

- (135) Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 Oct;14(5):447-55.

**APÊNDICE A** - Effects of vildagliptin and metformin on microvascular function, low-grade inflammation, plasma viscosity, gastrointestinal peptides and oxidative stress during post-prandial state on obese women recently diagnosed with type 2 diabetes: a randomized head-to-head study (1º artigo submetido)

**Effects of vildagliptin and metformin on microvascular function, low-grade inflammation, plasma viscosity, gastrointestinal peptides and oxidative stress during post-prandial state on obese women recently diagnosed with type 2 diabetes: a randomized head-to-head study**

Alessandra Schiapaccassa<sup>1</sup>, Priscila A. Maranhão<sup>2</sup>, Maria das Graças Coelho de Souza<sup>3</sup>, Diogo G. Panazzolo<sup>4</sup>, José Firmino Nogueira Neto<sup>5</sup>, Eliete Bouskela<sup>3</sup>, Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar<sup>3,6\*</sup>

.1- Graduate Program in Clinical and Experimental Physiopathology (FISCLINEX). Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-013 –Brazil.

2- Department of Information Sciences and Health Decision (CIDES) of the Faculty of Medicine of the University of Porto - Portugal

3- Laboratory of Clinical and Experimental Research on Vascular Biology (BioVasc), Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-013 - Brazil.

4- Endocrinology, University Hospital of Santa Maria, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-340 - Brazil

5- Lipids Laboratory (Lablip), Policlínica Piquet Carneiro, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-003 – Brazil.

6- Obesity Unit, Policlínica Piquet Carneiro, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-030 – Brazil.

**Running head:** Antihyperglycemic drugs, microcirculation and post-prandial state

\*Corresponding Author:

Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar

E-mail: lgkraemeraguiar@gmail.com

Tel. 55-21-2334-0703 Fax. 55-21-2334-0692

Endocrinology, Department of Internal Medicine

Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, 20550-013, Rio de Janeiro, BRAZIL

**Word count:** abstract: 250 words, main text: 3561 words, tables: 4.

## ABSTRACT

**Introduction:** Type 2 diabetes mellitus (T2D) and obesity are related to cardiovascular (CV) risk and endothelial dysfunction, present at early stages. Postprandial (PP) lipemia is also a CV risk. Incretin's effects are reduced on T2D while effects of PP lipemia are more pronounced. Our purpose was to compare the effects of metformin and vildagliptin, both used to treat T2D, during PP state, on endothelial function, oxidative stress, inflammation, plasma viscosity and gastrointestinal peptides after a lipid-rich meal in obese T2D women.

**Methods:** 38 T2D women recently diagnosed and medically-naïve, aged between 19 and 50 years, BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> were subjected to endothelial measurements and sample collections at fasting and 30, 60, 120 and 180 min after a lipid-rich meal and randomized 1:1 to metformin (850 mg) or vildagliptin (50 mg), given orally before the meal. We evaluated endothelial function by videocapillaroscopy and Laser-Doppler flowmetry and plasma viscosity, inflammatory and oxidative stress biomarkers, gastrointestinal peptides and metabolic profile in all time points.

**Results:** At baseline no differences were noticed. During PP state, metformin elicited an increase in functional capillary density while vildagliptin kept microvascular blood flow and vasomotion unchanged. Additionally, vildagliptin increased GLP-1 and IL-6 while leptin increased after metformin. Intragroup comparisons showed that vildagliptin significantly increased insulin, GLP-1, pancreatic polypeptide and leptin; and decreased DPP4 activity. On the counterpart, metformin reduced only glycemia.

**Conclusions:** After a lipid-rich meal, the use of vildagliptin preserved non-nutritive microflow and vasomotion while metformin induced an increase in capillary recruitment suggesting different and complementary mechanisms of action.

**Key Words:** Endothelium, Metformin, Vildagliptin, postprandial state

## INTRODUCTION

The prevalence of obesity has constantly increased over the past decades, elevating the incidence of cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus (T2D)(1). Endothelial dysfunction is present at early stages of atherosclerosis, and it has been associated with obesity independently of T2D(2). Under physiological conditions, microcirculation is

responsible for the regulation of tissue perfusion, optimizing oxygen diffusion, nutrient delivery and cell excreta, with marked impair in obesity and T2D(3). Many mechanisms are involved in this pathogenic process, including insulin resistance, inflammation and increased oxidative stress(4); as well as a direct action of hyperglycemia and hyperinsulinemia, stimulating the release of endothelin-1, reduction of endothelium-derived nitric oxide (NO) bioavailability and of the increment in microvascular flow velocity, density and tissue perfusion(5).

Although humans spend longer periods of their days in postprandial (PP) state, clinical studies that investigate microvascular reactivity were elaborated to test it during fasting (6). Many studies however, suggest that lipid-rich diets would cause acute damage/dysfunction to cardiovascular function, indicating that the development of atherosclerosis would be also related to PP phenomenon (7).

Metformin is the first-choice drug to treat T2D with proved beneficial effects on vascular function, oxidative stress and low-grade inflammation(8). Other antidiabetic drugs, known as dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitors, are widely used to treat T2D with well-established incretinomimetic and insulinotropic actions (9), being vildagliptin one of the most prescribed DPP4 inhibitor. Both drugs are usually prescribed in the same patient.

Studies on microvascular reactivity testing the above-mentioned drugs during PP state are not available in the medical literature; and possible beneficial effects could be related to inflammation, oxidative stress and/or gastrointestinal peptides. From these premises, we aimed to compare the effects of vildagliptin and metformin on microvascular protection after lipid overload, in obese treatment-naïve T2D women. Additionally, we have investigated changes on concentration of some biomarkers during PP state to evaluate possible mechanisms of action. We hypothesized that the regulatory mechanisms of beneficial microvascular actions, especially those related to vildagliptin, would be due to oxidative stress, inflammation, and maybe, also influenced by gastrointestinal peptides.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

This is a head-a-head clinical randomized trial that tested vildagliptin and metformin effects during PP state. Selected patients were recruited in the Policlínica Piquet Carneiro located at State University of Rio de Janeiro. The trial was conducted according to guidelines set out in the Declaration of Helsinki, approved by the local Research Ethical Committee (COEP:0.87.3.2012), and registered in clinicaltrials.gov (NCT01827280).



During the first visit, the study was explained and a written informed consent was obtained from all subjects. Afterwards, a medical exam was performed aiming to evaluate inclusion and exclusion criteria. We selected only females, aged between 19 and 50 years old, with BMI  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ , and abdominal circumference  $\geq 80 \text{ cm}$ . We also asked about concomitant drugs in use and proceeded a physical exam. After signing the informed consent these women were subjected to blood sample collection to determine whether the patient would or would not be eligible for the study; being necessary the diagnosis of T2D without any treatment with any antihyperglycemic agents. At this clinical visit, patients underwent a 75-g oral anhydrous glucose tolerance test (fasting and 2h), hepatic enzymes, creatinine, total blood and leucocyte counts and lipid profile determination after 12 hours fast. T2D diagnosis was established if fasting plasma glucose (PG) was  $\geq 126 \text{ mg/dl}$  and/or post-load PG after 2 hours after ingestion of 75g of glucose anhydrous was  $\geq 200 \text{ mg/dl}$  (10). In asymptomatic patients, T2D diagnosis was only established after another fasting PG  $\geq 126 \text{ mg/dl}$ .

Exclusion criteria were uncontrolled hypertension, pregnancy, major illness such as renal or hepatic insufficiency, history of previous myocardial infarction or angina pectoris, postmenopausal status, hematological diseases, triglycerides  $\geq 400 \text{ mg/dl}$ , smoking, significant loss ( $\geq 5\%$ ) of body mass during the last six months; previous diagnosis of T2D or being regular users of drugs for T2D, and also aspirin, hormonal contraceptives, anticoagulants and/or drugs for dyslipidemia. During the trial, those hypertensive patients who needed to change antihypertensive drugs or dosages were excluded.

We interviewed and selected 246 women for the first visit but recruited only 40 patients. During the study, two were excluded due to non-compliance (n=1) and the other one for having a significant weight loss before the first test meal (n=1).

### *Study design*

The first clinical visit and procedures are described above. After considering the patient as an eligible one, a second visit was appointed. In this visit, we assessed nutritive and non-nutritive microvascular reactivity of the patients at the following time points: baseline (fasting period), 30, 60, 120 and 180 min after the intake of a lipid rich meal, without ingesting any drug. After this test, volunteers were randomized 1:1 to receive metformin (1700 mg/day) or vildagliptin (100 mg/day) during 30 days by external selection (1700 mg/day). Thirty days after, a third visit was appointed, and the same tests performed according to patient's group, a pill of metformin or vildagliptin was ingested at baseline period during meal intake.

According to ethical rules, we have started the use of vildagliptin or metformin during 30 days before the second assessment of the test protocol used to investigate our hypothesis. Therefore, we have initiated treatment of the patients for 30 days and the acute effects of the drugs were re-tested 30 days after and, during post-prandial period, but at this time after the ingestion of one pill (metformin – 850 mg or vildagliptin – 50 mg). Since these patients were diagnosed as T2D being all treatment-naïve until entering in the study, the test of acute effects was made 30 days after the beginning of drug use minimizing the glycemic effects secondary of the use.

#### *Anthropometric, clinical and laboratory measurements*

The same trained examiner collected anthropometric measurements in duplicate: waist at its smallest point with the abdomen relaxed and weight using a digital scale (Filizola, São Paulo, SP, Brazil). BMI was defined as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Blood pressure was also measured twice in the supine position with a 5-min interval of rest between measurements, using an automated apparatus (multiparameter patient monitor, Lifewindow LW6000; Digicare Biomedical Technology, West Palm Beach, FL).

#### *Lipid-rich meal*

This meal consisted of foods rich in total fat, especially saturated fat, based on whole milk with chocolate, bread croissant-type with butter, cheddar cheese and salami, with the following amounts: whole milk (200ml), chocolate (10g), margarine (20g), croissant (1 unit), cheddar cheese (60g) and salami (31g). This meal consisted of 564.6kcal, with 28.9%, 20.7% and 69.7% of carbohydrates, proteins and total fat, respectively. Of the latter nutrient, 21.9g of this was composed of saturated fat.

#### *Nutritive microvascular reactivity*

The patients arrived in a fasting state of 12 hours in the morning, and were accommodated in an acclimated room with controlled temperature at  $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 30min before the beginning of the procedure. They were comfortably sat in a chair with the left arm put at the heart level. All patients had the arm blood pressure measurement carried out in this position. The left forearm and hand (dorsal part up) were put to rest on a cushion and the 3th finger was put on a pedestal mounted in X-Y status of a Leica DM/LM microscope. The top of the finger was gently immobilized by a clip, to avoid minimum movements. Experiments were carried out with continuous recording of temperature from the finger skin.

The nutritive skin microcirculation was investigated by videocapillaroscopy performed at the dorsum of the third finger at baseline and after 4 minutes ischemia. This method is recognized in the literature as the best one to assess the number of perfused capillaries (11). It was performed and analyzed according to our standardized well-validated methodology described elsewhere in the literature (12). This exam was always performed and analyzed by the same observer, blinded to patient data. Using this method, we have assessed functional capillary density (FCD) at basal state and during post-occlusive reactive hyperemia (FCD during PORH), that respectively, represent the number of capillaries/mm<sup>2</sup> with blood flow at basal state and after ischemia, using an optical microscope (DM/LM, Wetzlar, Germany) with 250x magnification.

This technique was carried out at the baseline and 30, 60, 120 and 180 minutes after lipid-rich meal intake.

#### *Plasma Viscosity*

In this study, plasma viscosity was evaluated according to previously validated protocol (13) throughout the study period (at all-time points). For that, immediately after blood collection, a tube of 5 ml of blood was centrifuged during 5 minutes at 1500/g. After this, the supernatant was collected and 0.5ml was used to test plasma viscosity ( $\eta_p$ ), assessed with a cone-in-plate viscosimeter DV-II+ PRO Digital (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, USA) at 230 s<sup>-1</sup> shear rates at 37°C. Results were expressed as mPascal × sec (mPa.s).

#### *Non-nutritive microvascular flow and vasomotion*

We have also assessed non-nutritive skin microflow and microvascular vasomotion by laser Doppler flowmetry (LDF; Perimed AB, Stockholm, Sweden). These measurements were made at baseline and during test meals using a probe positioned at the dorsal side of the left wrist. Absolute amplitude variations within each frequency band were analyzed, as well as their normalized values, which are the interval of mean amplitude divided by the total spectrum mean amplitude (14). We used Perisoft software (PSW version 2.50, Perimed AB, Stockholm, Sweden) for data analysis and fast Fourier transform to determine the contribution of different vasomotion frequency components to signal variability. We have assumed five frequency intervals previously defined (15) in the spectrum between 0.01 and 1.6 Hz: (1) endothelial (0.01–0.02 Hz); (2) neurogenic (0.02–0.06 Hz); (3) myogenic (0.06–0.15 Hz); (4) respiratory (0.15–0.4 Hz) and (5) heart beat (0.4–1.6 Hz) activities.

*Biomarkers of low-grade inflammation, oxidative stress and intestinal peptides*

Plasma levels of IL-6 and endothelin-1 were evaluated by Quantikine® High Sensitivity IL-6 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and Quantikine® Endothelin-1 ELISA kits, respectively (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

For determination of serum concentrations of oxidized LDL was used Mercodia ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). All assays were performed according to manufacturer protocols. The intra and inter assay precision were inferior than 10%.

Active GLP-1 levels were analyzed by sandwich high-sensitivity ELISA chemiluminescent assay (Merck-Millipore, Billerica, MO, USA).

Multiplexing analysis was used to determine simultaneously concentration of GIP, insulin, C-peptide, ghrelin, leptin, glucagon, pancreatic polypeptide (PP), peptide YY (PYY), adiponectin, resistin and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ); by Magnetic Milliplex® MAP kits (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). All intra and inter assay precisions were <10% and <20%, respectively.

DPP4 activity assessment was performed using glycyl-prolyl-paranitroanilide (Gly-Pro-pNA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as chromogenic substrate. At the end of incubation period, activity of DPP4 in the samples was determined by comparing the optical density of each sample with the optical density derived from p-nitroanilin standard curve, generated by data analysis software (KC Junior, Bio Tek, Winooski, VT, USA). Results are expressed as  $\mu\text{M}$  of p-nitroaniline/ml/min. The sensitivity of this method was 0.1  $\mu\text{M}$ /ml/min and intra-assay precision was <3%.

Ultrasensitive C-reactive protein (CRP) was tested by automated analyzer A25 BioSystems® (Biosystems SA, Barcelona, SPAIN) and measured by turbidimetry using high sensitivity latex method. Additionally, blood cell count was performed by automated hematology counter XS1000i Sysmex® (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, JPN). Blood levels of glucose, total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and triglycerides (TG) were evaluated spectrophotometrically by the respective methods: glucose oxidase/peroxidase, cholesterol oxidase/peroxidase, direct detergent and glycerol 3-phosphate/peroxidase. These analyses were performed by an automated analyzer A25 BioSystems® (Biosystems SA, Barcelona, Spain). LDL-c levels were calculated using the mathematical equation proposed by Friedewald(16).

## STATISTICAL ANALYSIS

We used GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) for statistical analysis. Gaussian distribution was checked and parametric and non-parametric data are expressed as mean±SD. We used unpaired t-test and U test according to data distribution to compare groups. In order to optimize data obtained during fasting plus PP periods, we performed individual regression equations for modeling the relationship between independent (time) and dependent variables (DPP4 activity, biomarkers of inflammation or components of microvascular function). These equations found intercepts for each variable, which defined the linear relationship between the dependent (variable tested) and independent (time of collection) variables. A regression line was obtained and the intercept was the point where it crosses the axis of the dependent variable. Intercepts were compared between groups. Correlation analysis was performed by Spearman rank-order test. To establish correlations, we calculated delta difference from post minus pre-treatment period and correlated them. We have used G\*Power 3.1.9.2 (Universität Kiel, Germany) to calculate sample size of 40 patients with an actual power of 0.9500156 (t tests; point biserial; two-tailed; effect size of 0.51;  $\alpha$  probability error of 0.05; and a power of 0.95). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

Thirty-eight women aged  $39.4 \pm 6.5$  years and with BMI  $37.3 \pm 5.0 \text{ kg/m}^2$  were included. At baseline, both groups had the same characteristics on anthropometric, clinical and laboratorial variables. They also had the same microvascular reactivity (table 1).

Table 1: Comparison between Vildagliptin and Metformin groups on clinical, anthropometrical, laboratorial and microcirculatory variables at baseline.

|                          | Vildagliptin<br>(n=19) | Metformin<br>(n=19) | P value |
|--------------------------|------------------------|---------------------|---------|
| Age (years)              | 39.05±5.32             | 39.79±7.7           | 0.44    |
| Weight (kg)              | 94.96±14.03            | 99.51±16.11         | 0.31    |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) | 36.03±3.96             | 38.48±6.12          | 0.25    |
| Waist Circumference (cm) | 105.59±10.5            | 106.55±12.05        | 0.51    |
| Hip Circumference (cm)   | 116.06±8.99            | 122.68±11.95        | 0.09    |
| WHR                      | 0.91±0.05              | 0.88±0.07           | 0.57    |
| Systolic BP (mmHg)       | 131.55±20.93           | 134.6±27.24         | 0.75    |
| Diastolic BP (mmHg)      | 84.02±13.43            | 83.05±13.12         | 0.97    |
| Mean BP (mmHg)           | 100.02±15.61           | 100.23±17.21        | 0.86    |
| Fat mass (%)             | 39.55±3.95             | 41.10±4.25          | 0.29    |

|  |              |              |      |
|--|--------------|--------------|------|
| Leanmass (%)                           | 60.45±6.48   | 59.20±6.13   | 0.30 |
| Insulin (mIU/l)                        | 1.76±0.90    | 1.91±1.17    | 0.75 |
| PG (mg/dl)                             | 200.26±95.07 | 190.26±74    | 0.88 |
| Post-load PG (mg/dl)                   | 253.4±60.89  | 255.88±56.86 | 1.0  |
| HbA1c (%)                              | 8.03±1.79    | 7.85±2.03    | 0.64 |
| TC (mg/dl)                             | 183.90±36.74 | 198.00±37.8  | 0.18 |
| TG (mg/dl)                             | 161.00±79.84 | 141.21±78.66 | 0.28 |
| HDL - c (mg/dl)                        | 43.00±8.19   | 46.73±11.28  | 0.38 |
| LDL - c (mg/dl)                        | 108.60±26.28 | 112.90±25.89 | 0.13 |
| VLDL - c (mg/dl)                       | 32.26±15.97  | 28.26±15.73  | 0.29 |
| CRP (mg/dl)                            | 1.15±1.38    | 0.92±0.62    | 0.94 |
| C-Peptide (ng/ml)                      | 1.74±0.91    | 1.78±0.91    | 1.0  |
| Ghrelin (pg/ml)                        | 45.58±19.87  | 44.32±26.92  | 0.57 |
| GIP (pg/ml)                            | 24.3±14.6    | 20.29±12.28  | 0.32 |
| GLP-1 (pM/l)                           | 1.15±1.04    | 0.98±0.67    | 0.98 |
| Leptin (pg/ml)                         | 21880±19430  | 25350±13330  | 0.52 |
| Glucagon (pg/ml)                       | 23.47±20.63  | 31.46±53.48  | 0.53 |
| Adiponectin (ng/ml)                    | 11950±11540  | 11590±6151   | 0.55 |
| Resistin (ng/ml)                       | 34.01±11.45  | 36.06±18.74  | 0.95 |
| PP (pg/ml)                             | 30.17±24.19  | 33.26±34.8   | 0.83 |
| PYY (pg/ml)                            | 39.24±21.73  | 38.76±36.88  | 0.57 |
| IL-6 (pg/ml)                           | 2.117±1.37   | 3.436±4.04   | 0.20 |
| LDL <sub>ox</sub> (U/L)                | 74.8±31.33   | 62.13±16.81  | 0.24 |
| NEFA (mmol/l)                          | 0.67±0.23    | 0.63±0.25    | 0.35 |
| TNF- $\alpha$ (pg/ml)                  | 0.54±0.61    | 0.36±0.90    | 0.09 |
| Endothelin (pg/ml)                     | 1.67±0.55    | 1.62±0.55    | 0.83 |
| DPP4 <sub>act</sub> (uM/ml/min)        | 9.37±3.52    | 9.65±3.73    | 0.86 |
| Plasma Viscosity (30mPa.s)             | 1.8±0.1      | 1.84±0.10    | 0.36 |
| Plasma Viscosity (50mPa.s)             | 1.81±0.09    | 1.84±0.13    | 0.41 |
| FCD (cap/mm <sup>2</sup> )             | 24.10±15.65  | 34.64±20.29  | 0.18 |
| FCD during PORH (cap/mm <sup>2</sup> ) | 20.81±14.72  | 32.4±19.41   | 0.14 |

Data are expressed as means±standard deviation (SD).

Legends: BMI – body mass index; BP – blood pressure, HbA1c – glycated hemoglobin, PG – plasma glucose, TC – total cholesterol, TG – triglycerides, HDLc – high density lipoprotein cholesterol; LDLc – low density lipoprotein cholesterol; VLDLc – very low density lipoprotein cholesterol; GIP – Glucose-dependent insulinotropic peptide; GLP-1 – glucagon-like peptide-1; PP – Pancreatic polypeptide; PYY – Peptide YY 3-36; IL-6 – Interleukin 6; LDL<sub>ox</sub> – oxidized low density lipoprotein; NEFA – non-esterified fatty acids; DPP4<sub>act</sub> – Dipeptidylpeptidase 4 activity; FCD - resting functional capillary density, FCD during PORH at dorsal site – functional capillary density during post occlusive reactive hyperemic response after ischemia.

Additionally, we calculated intercepts for each variable (expressed as variableintercept) collected during test meal protocol and we did not observe any significant differences between groups at baseline period, but the comparison between groups at the second test meal demonstrated that vildagliptin increased GLP-1intercept and IL-6intercept, while metformin showed higher leptinintercept (table 2). In a step further, we have observed

that intragroup comparisons showed that vildagliptin increased significantly Insulinintercept, GLP-1intercept, pancreatic polypeptideintercept and leptinintercept; and also decreased DPP4 activity intercept. In the Vildagliptin group no effects on glucoseintercept was noted, while on Metformin Group only glucose intercept was reduced without any effect on other tested variables (table 2). No significant differences on plasma viscosity intercept were noted.

Table 2: Effects of Vildagliptin and Metformin on plasma viscosity, metabolic and inflammatory biomarkers during post-prandial state after lipid-rich meal

|  | <b>Vildagliptin</b><br>Baseline | <b>Vildagliptin</b><br>Post-treatment | <b>Metformin</b><br>Baseline | <b>Metformin</b><br>Post-treatment |
|--|---------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Glucose <sub>intercept</sub>                     | 226.8±93.01                     | 216.3±109.2                           | 213.8±80.09                  | <b>175.3±61.68***</b>              |
| Insulin <sub>intercept</sub>                     | 47.84±476.7                     | <b>1034±636.1***</b>                  | 1001±526.2                   | 993.5±415.7                        |
| TC <sub>intercept</sub>                          | 180.3±36.85                     | 177.2±40.42                           | 188.5±35.63                  | 184.7±27.56                        |
| TG <sub>intercept</sub>                          | 157.4±75.5                      | 146.2±80.44                           | 135.9±74.41                  | 144.7±67.57                        |
| HDL-C <sub>intercept</sub>                       | 41.7±8.5                        | 42.9±9.53                             | 44.14±10.94                  | 43.49±9.5                          |
| LDL-C <sub>intercept</sub>                       | 107±26.97                       | 102.1±22.15                           | 116.8±23.37                  | 112.1±21.67                        |
| VLDL-C <sub>intercept</sub>                      | 30.97±16.11                     | 26.08±8.9                             | 27.38±15.19                  | 29.29±13.65                        |
| C-Peptide <sub>intercept</sub>                   | 2248±1112                       | 2179±1211                             | 1823±942.6                   | 2018±624.2                         |
| Grelin <sub>intercept</sub>                      | 81.08±124.1                     | 48.43±22.08                           | 44.96±26.59                  | 45.66±37.21                        |
| GIP <sub>intercept</sub>                         | 46.09±24.32                     | 64.8±35.35                            | 52.2±34.95                   | 55.48±37.09                        |
| GLP-1 <sub>intercept</sub>                       | 2.53±1.89                       | <b>5.33±4.09**</b>                    | 2.15±1.087                   | <b>2.26±1.674&amp;&amp;&amp;</b>   |
| Glucagon <sub>intercept</sub>                    | 15.36±28.43                     | 26.59±25.27                           | 29.04±43.57                  | 28.08±40.45                        |
| PP <sub>intercept</sub>                          | 31.25±32.51                     | <b>123.2±67.58***</b>                 | 92.65±63.12                  | 103.7±69.46                        |
| PYY <sub>intercept</sub>                         | 43.18±20.43                     | 45.16±26.11                           | 42.64±32.38                  | 47.28±33.08                        |
| LDL <sub>ox</sub> <sub>intercept</sub>           | 44.59±59.42                     | 72.16±31.01                           | 61.50±17.8                   | 61.37±21.43                        |
| NEFA <sub>intercept</sub>                        | 0.47±0.35                       | 0.63±0.20                             | 0.64±0.18                    | 0.65±0.17                          |
| Leptin <sub>intercept</sub>                      | 4293±10864                      | <b>19102±17886***</b>                 | 25384±13806                  | <b>25268±14088&amp;</b>            |
| Adiponectin <sub>intercept</sub>                 | 15337±33018                     | 15588±21886                           | 12322±5965                   | 11659±6343                         |
| Resistin <sub>intercept</sub>                    | 19.6±30.02                      | 34.63±11                              | 35.75±19.67                  | 34.53±19.18                        |
| IL-6 <sub>intercept</sub>                        | 1.948±2.62                      | 31.51±22.81                           | 3.316±4.08                   | <b>2.422±2.62&amp;&amp;&amp;</b>   |
| Endotelin <sub>intercept</sub>                   | 1.504±1.35                      | 1.641±0.51                            | 1.674±0.55                   | 1.634±0.56                         |
| DPP4 <sub>act</sub> <sub>intercept</sub>         | 10.27±3.45                      | <b>7.59±2.99***</b>                   | 9.59±3.56                    | 9.117±3.69                         |
| Plasma Viscosity<br>30mPa.S <sub>intercept</sub> | 1.82±0.09                       | 1.78±0.11                             | 1.88±0.1                     | 1.86±0.2                           |
| Plasma Viscosity<br>50mPa.S <sub>intercept</sub> | 1.8±1.11                        | 1.76±0.11                             | 1.69±0.46                    | 1.83±0.19                          |

Data are expressed as means±standard deviations (SD).

\*Intragroup comparisons: \* P<0.05; \*\* P<0.01; P< 0.001

&Intergroup comparisons: & P<0.05; && P<0.01; &&&P<0.001

Legends: BMI – body mass index; BP – blood pressure, HbA1c – glycated hemoglobin, TC – total cholesterol, TG – triglycerides, HDLc – high density lipoprotein cholesterol; LDLc - low density lipoprotein cholesterol; VLDLc – very low density lipoprotein cholesterol; GIP – Glucose-dependent insulinotropic peptide); GLP-1 – glucagon-like peptide-1; PP – Pancreatic polypeptide; PYY – Peptide YY 3-36; IL-6 – Interleukin 6; LDL<sub>ox</sub> – oxidized low density lipoprotein; NEFA – non esterified fatty acids; DPP4<sub>act</sub> – Dipeptidylpeptidase 4 activity.

Results on microvascular reactivity are depicted on tables 3 and 4. We noticed that metformin showed higher FCD intercept during PORH compared to vildagliptin. This finding points to beneficial aspects of metformin related to capillary recruitment during PORH even after the intake of a lipid-rich meal in T2D patients. We also made an intragroup analysis but no significant changes were observed.

Table 3: Effects of vildagliptin and metformin on post-prandial microvascular reactivity after lipid-rich meal in treatment-naïve obese type 2 diabetes patients

| Nutritive reactivity                 | microvascular | Vildagliptin | Vildagliptin   | Metformin   | Metformin                    |
|--------------------------------------|---------------|--------------|----------------|-------------|------------------------------|
|                                      |               | Baseline     | Post-treatment | Baseline    | Post-treatment               |
| Resting FCD <sub>intercept</sub>     |               | 24.43±13.18  | 33.42±12.59    | 36.14±16.18 | 43.14±14.4                   |
| FCD during PORH <sub>intercept</sub> |               | 23±13.9      | 29.15±13.84    | 38.75±19.62 | 45.11±14.46 <sup>&amp;</sup> |

Data are expressed as means±standard deviation (SD).

<sup>&</sup>Intergroup comparisons: <sup>&</sup>P<0.05

**Legends:** FCD- functional capillary density, PORH – post-occlusive reactive hyperemic.

On table 4, it is possible to observe non-nutritive blood microflow and vasomotion tested continuously during test meals. Baseline comparisons between groups did not show any significant differences (data not shown), but at post-treatment period and after the ingested pill, vildagliptin showed higher mean values of microflow during almost all test period (from 30 to 180 minutes) while also promoting higher total frequency interval at the end of the post-prandial period (180 minutes), suggesting better effect on non-nutritive microflow and vasomotion. By subdividing the five components of microcirculatory vasomotion, we did not observe any significant differences. We additionally investigated intragroup differences and observed that use of vildagliptin did not change vasomotion; while metformin changed vasomotion during post-prandial state, resulting in lower mean values of vasomotion (P<0.05), which was more relevant at the end of the post-prandial period, as follows: 30 minutes (11.4[7.8-14.2] vs. 10.2[5.7-12.3]Hz; P=0.03), 60 minutes (11.3[8.1-15.8] vs. 10.1[5.4-13.2]Hz; P=0.04) and 120 minutes (10.7[7.4-16.6] vs. 10[5.5-11]Hz; P=0.04). Comparing before and after treatment, metformin also promoted a reduction in mean total values (P<0.05) at 120 minutes (0.17[0.1-0.24] vs. 0.12[0.07-0.2]Hz; P=0.0007) and 180 minutes (0.17[0.09-0.25] vs. 0.11[0.07-0.24]Hz; P=0.014).

Table 4 –Comparison between vildagliptin and metformin on non-nutritive skin microvascular reactivity and vasomotion during postprandial state

|                                | TIME (min) |    |    |     |     |
|--------------------------------|------------|----|----|-----|-----|
|                                | Rest       | 30 | 60 | 120 | 180 |
| <b>Non-nutritive microflow</b> |            |    |    |     |     |



|                                      |                        |                        |                        |                        |                         |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>Mean Value (unit)</b>             |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 12<br>[5.9-15.7]       | 10.2<br>[5.7-12.3]     | 10.1<br>[5.4-13.2]     | 10<br>[5.5-11]         | 10.4<br>[5.6-16]        |
| VIL post-treatment                   | 13.1<br>[8.5-23]       | 12.3<br>[7.8-18.4]&    | 12<br>[7.5-18]&        | 11.4<br>[5.7-18]&      | 10.9<br>[5.6-17.7]      |
| <b>Mean Total (unit)</b>             |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 0.16<br>[0.07-0.32]    | 0.14<br>[0.06-0.33]    | 0.12<br>[0.06-0.33]    | 0.12<br>[0.07-0.20]    | 0.11<br>[0.07-0.24]     |
| VIL post-treatment                   | 0.14<br>[0.10-0.30]    | 0.16<br>[0.09-0.27]    | 0.15<br>[0.09-0.26]    | 0.15<br>[0.06-0.24]    | 0.15<br>[0.08-0.25]     |
| <b>Microvascular vasomotion</b>      |                        |                        |                        |                        |                         |
| <b>Total Frequency interval (Hz)</b> |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 32.39<br>[14.25-65.26] | 27.26<br>[12.9-67.24]  | 25.75<br>[13.05-66.37] | 23.26<br>[14.21-39.94] | 22.20<br>[15.21-48.65]  |
| VIL post-treatment                   | 29.97<br>[20.57-59.70] | 33.11<br>[18.63-54.28] | 30.56<br>[19.10-52.55] | 30.04<br>[5.55-48.69]  | 31.28<br>[16.42-50.02]& |
| <b>Endothelial (Hz)</b>              |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 4.22<br>[2.19-7.71]    | 3.74<br>[2.1-6.42]     | 3.9<br>[2.51-8.84]     | 4.09<br>[2.48-6.99]    | 4.39<br>[1.82-8.62]     |
| VIL post-treatment                   | 4.69<br>[3.12-7.64]    | 3.86<br>[2.20-10.90]   | 5.26<br>[2.0-9.0]      | 4.95<br>[2.64-8.93]    | 4.78<br>[2.42-7.42]     |
| <b>Sympathetic(Hz)</b>               |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 3.76<br>[2.17-4.92]    | 3.66<br>[2.38-6.14]    | 3.74<br>[2.32-5.34]    | 3.73<br>[2.39-5.58]    | 4.0<br>[2.1-5.47]       |
| VIL post-treatment                   | 3.66<br>[1.85-5.31]    | 3.86<br>[1.85-6.08]    | 3.87<br>[1.76-9.35]    | 4.47<br>[2.08-9.97]    | 3.89<br>[2.12-8.40]     |
| <b>Myogenic(Hz)</b>                  |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 2.28<br>[1.65-3.54]    | 2.28<br>[1.7-3.5]      | 2.19<br>[1.62-2.86]    | 2.26<br>[1.64-3.69]    | 2.21<br>[1.78-3.78]     |
| VIL post-treatment                   | 2.6<br>[1.75-4.11]     | 2.27<br>[1.70-3.50]    | 2.19<br>[1.79-3.24]    | 2.29<br>[1.74-4.20]    | 2.07<br>[1.69-3.85]     |
| <b>Respiratory(Hz)</b>               |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 1.26<br>[1.07-1.5]     | 1.28<br>[1.08-1.58]    | 1.33<br>[1.04-1.51]    | 1.29<br>[1.04-1.51]    | 1.16<br>[1.03-1.52]     |
| VIL post-treatment                   | 1.17<br>[0.89-1.45]    | 1.205<br>[0.82-1.52]   | 1.23<br>[0.8-1.79]     | 1.14<br>[0.10-1.49]    | 1.24<br>[0.91-1.47]     |
| <b>Heart beat(Hz)</b>                |                        |                        |                        |                        |                         |
| MET post-treatment                   | 0.69<br>[0.54-0.84]    | 0.70<br>[0.64-0.81]    | 0.71<br>[0.64-0.81]    | 0.69<br>[0.62-0.79]    | 0.69<br>[0.61-0.80]     |
| VIL post-treatment                   | 0.71<br>[0.59-0.81]    | 0.71<br>[0.59-0.81]    | 0.71<br>[0.52-0.98]    | 0.71<br>[0.50-0.79]    | 0.71<br>[0.55-0.80]     |

Data are expressed as means±standard deviation (SD).

&Intergroup comparisons: &P<0.05; &&P<0.01; &&&P<0.001

**Legends:**MET – Metformin group; VIL – Vildagliptin group

Finally, we investigated correlations between microvascular reactivity and clinical-laboratorial variables. Previously, we have calculated delta differences from post minus pre-treatment period for each intercept of the tested variable and then performed correlations. We noticed that FCD in vildagliptin group correlated with the levels of resistin ( $\rho=-0.69$ ,  $P<0.05$ ); while in Metformin group, FCD correlated to adiponectin ( $\rho=-0.96$ ,  $P<0.01$ ) and DPP4 activity ( $\rho=-0.78$ ,  $P<0.05$ ). In this group, a correlation between FCD during PORH

and insulin ( $\rho=-0.85$ ,  $P<0.05$ ) as well as C-peptide ( $\rho=-0.78$ ,  $P<0.05$ ) was also noticed but in Vildagliptin group no association with FCD during PORH was noted.

## DISCUSSION

Although the benefits promoted by metformin and DPP4 inhibitors on glycemic control in T2D are already well-defined, and many studies have also demonstrated the extra glycemic effects of metformin(8) and also DPP4 inhibitors(17) on endothelial function, until now, there is no study that compared their head-to-head effects during PP state after a lipid-rich meal. In this study, we have originally investigated it and observed beneficial effects of both drugs. While metformin promoted a marked effect on nutritive microcirculation, i.e. capillary recruitment, vildagliptin showed better effects on non-nutritive microflow and also on vasomotion during PP state. Although a great number of biomarkers was tested to investigate possible mechanisms involved on these effects, only limited results added knowledge to our findings.

In healthy individuals, the physiological increase of PP insulin reduces the endogenous VLDL-c and inhibits lipolysis, through activation of lipoprotein-lipase. Actually, it is known that after an intake of a lipid-rich meal, patients with obesity and T2D present an exaggerated and prolonged elevation in triglycerides and inflammatory markers(18), reaching a PP peak after 4 hours lasting for up to 8 hours. This phenomenon may predispose to alterations on lipid metabolism with a trend towards development of atherosclerosis(19) named as dietary-lipotoxicity and, endothelial cells may be particularly susceptible to this(20).

Dipeptidil peptidase-4 is expressed on endothelial cells, especially in the microcirculation(21). Its activity and expression are increased in vitro by high glucose only in microvascular endothelial cells(22), providing a rationale for an inhibition of DPP4 to protect the microcirculation from hyperglycemia. Some data also suggest that DPP4 inhibitors may benefit not only micro but also macrocirculation(23). Possible benefits may have GLP-1 as mediator since it may be viewed as an endogenous protective factor for the vascular system when this defense is especially needed: during a meal. In contrast, metformin action is believed to exert endothelial-dependent effects through AMPK activation, which leads to phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and vascular protection(8). Additionally, it also appears to increase endothelium derived hyperpolarizing factor signaling through processes that improve overall endothelial function, and are likely

related to reduced production of derivatives of cyclooxygenase pathway(24). Therefore, distinct mechanisms may be involved in microvascular effects of the drugs herein compared.

DPP4 inhibitors and metformin have also been reported to influence lipids but results are inconsistent across trials(25-27). An extensive meta-analysis has suggested that DPP4 inhibitors are able to lower total cholesterol and triglycerides, probably due to direct effect of GLP1 receptor stimulation on cholesterol metabolism(28). Incretin effect seems to reduce intestinal lymph flow, triglycerides absorption and apolipoprotein synthesis, being able to limit the flow of triglycerides to circulation(29). Studies evaluating incretin levels on PP state in T2D show distinct responses depending on fatty acids offered in the meals. We believe that high concentration of saturated fat herein offered to patients could have limited incretin effects on lipid metabolism since diets rich in monounsaturated fatty acids act as stronger stimulators on GLP-1 and GIP (30) than the one we opted to use.

The adipose tissue is the major site for storage of excess energy as triglycerides, also expressing and secreting a variety of adipokines including leptin, adiponectin, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukins (IL)1, 6 and 8. Although initially viewed as an antiobesity hormone, leptin's primary role is to serve as metabolic signal of energy sufficiency rather than excess, rapidly declining with caloric restriction and weight loss. In our research, metformin promoted higher leptin levels compared to vildagliptin; whereas vildagliptin promoted changes in leptin only in intragroup analyses. Experimental studies showed that food deprivation decreases leptin concurrently with GLP-1 overexpression in the hypothalamus, and it is possible that GLP-1 released from leptin-stimulated neurons modulates hypothalamic brain centers involved in appetite (31). In respect to metformin, is not clear however, if it produces any effect on leptin system. Adamia and co-workers reported that metformin use did not change leptin in obese T2D women(32), while other study showed a reduction on it(33).

We also observed an unexpected higher IL-6 concentration in vildagliptin group compared to metformin one. In humans, IL-6 is correlated with increased fasting triglycerides and free fatty acids and low HDL-c(34); and animal models support a causal relationship between elevated IL-6 and increased hepatic secretion of TG and production of VLDL particles (35). We believe that metformin was able to prevent this inflammatory response in the PP period in detriment to vildagliptin, due to intrinsic mechanisms related to its action still unknown. Although we found an increase in GLP-1 and insulin, as well as an expected reduction in DPP4 activity with Vildagliptin, no significant change in glucose was observed which could not be explained only by intrinsic properties of the drug. Possible extremely

short-term use and sample size influenced glycemic results but the absence of glycemic effects reinforces the concept that vascular effects of vildagliptin are possibly pleiotropic. Maybe metformin effects were in part influenced by its effect on glucose observed during PP state. In respect to microvascular reactivity, vildagliptin showed negative correlation between this variable and resistin, which would be translated to better insulin sensitivity; while metformin showed negative correlation with adiponectin levels, insulin and C-peptide.

Our study was not able to demonstrate important elevations in triglycerides during PP period, probably due to composition of the meal which was rich on saturated fat; but maybe also sample size, initially calculated based on methodological characteristics of microvascular reactivity.

In conclusion, our study showed that vildagliptin and metformin were both able to improve microvascular function in our tested patients during PP state; probably through distinct and complementary mechanisms of action on the microcirculation. Although many biomarkers were tested without important changes independently of the drug it should also be reinforced that benefits found during PP after lipid-rich meal with vildagliptin were glucose-independent, emphasizing its pleiotropic effects on microcirculation.

#### **DECLARATION OF INTEREST**

This work was partially supported Novartis S.A. in a study originally applied to this company by an initiative of the researcher (LGK-A).

#### **Reference List**

1. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH: Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 113:898-918, 2006
2. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP: Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67:968-977, 1983
3. Golay A, Ybarra J: Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:649-663, 2005

4. Francischetti EA, Tibirica E, da Silva EG, Rodrigues E, Celoria BM, de Abreu VG: Skin capillary density and microvascular reactivity in obese subjects with and without metabolic syndrome. *Microvasc Res* 81:325-330, 2011
5. Halfoun VL, Pires ML, Fernandes TJ, Victor F, Rodrigues KK, Tavares R: Videocapillaroscopy and Diabetes mellitus: area of transverse segment in nailfold capillar loops reflects vascular reactivity. *Diabetes Res Clin Pract* 61:155-160, 2003
6. Verma S, Anderson TJ: Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105:546-549, 2002
7. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT: Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 20:255-268, 2003
8. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH: Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 55:496-505, 2006
9. Vella A, Bock G, Giesler PD, Burton DB, Serra DB, Saylan ML, Dunning BE, Foley JE, Rizza RA, Camilleri M: Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on gastrointestinal function, meal appearance, and glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* 56:1475-1480, 2007
10. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 40:S11-S24, 2017
11. Halfoun VL, Pires ML, Fernandes TJ, Victor F, Rodrigues KK, Tavares R: Videocapillaroscopy and Diabetes mellitus: area of transverse segment in nailfold capillar loops reflects vascular reactivity. *Diabetes Res Clin Pract* 61:155-160, 2003
12. Maranhao PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, Koury JC, Bouskela E: Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* 8:32, 2011
13. Panazzolo DG, da Silva LH, Maranhao PA, Souza MG, Nogueira Neto JF, Leao LM, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG: Short-term effects of low-dose estradiol on endothelial function and blood viscosity in nondiabetic postmenopausal overweight women: a double-blind, placebo-controlled study. *Menopause* 23:1114-1121, 2016
14. Buss C, Kraemer-Aguiar LG, Maranhao PA, Marinho C, de Souza MG, Wiernsperger N, Bouskela E: Novel findings in the cephalic phase of digestion: A role for microcirculation? *Physiol Behav* 105:1082-1087, 2012

15. Stefanovska A, Bracic M, Kvernmo HD: Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Trans Biomed Eng* 46:1230-1239, 1999
16. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, Jones SR: Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA* 310:2061-2068, 2013
17. Ayaori M, Iwakami N, Uto-Kondo H, Sato H, Sasaki M, Komatsu T, Iizuka M, Takiguchi S, Yakushiji E, Nakaya K, Yogo M, Ogura M, Takase B, Murakami T, Ikewaki K: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors attenuate endothelial function as evaluated by flow-mediated vasodilatation in type 2 diabetic patients. *J Am Heart Assoc* 2:e003277, 2013
18. Klauser R, Prager R, Schernthaner G, Olefsky JM: Contribution of postprandial insulin and glucose to glucose disposal in normal and insulin-resistant obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 73:758-764, 1991
19. Enkhmaa B, Ozturk Z, Anuurad E, Berglund L: Postprandial lipoproteins and cardiovascular disease risk in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 10:61-69, 2010
20. Boquist S, Ruotolo G, Tang R, Bjorkegren J, Bond MG, de FU, Karpe F, Hamsten A: Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* 100:723-728, 1999
21. Matheussen V, Baerts L, De MG, De KG, Van d, V, Augustyns K, Dubois V, Scharpe S, De M, I: Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. *Biol Chem* 392:189-198, 2011
22. Pala L, Pezzatini A, Dicembrini I, Ciani S, Gelmini S, Vannelli BG, Cresci B, Mannucci E, Rotella CM: Different modulation of dipeptidyl peptidase-4 activity between microvascular and macrovascular human endothelial cells. *Acta Diabetol* 49 Suppl 1:S59-S63, 2012
23. Eriksson L, Nystrom T: Antidiabetic agents and endothelial dysfunction - beyond glucose control. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 117:15-25, 2015
24. Gao X, Martinez-Lemus LA, Zhang C: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. *World J Cardiol* 3:25-31, 2011
25. Juntti-Berggren L, Pigon J, Karpe F, Hamsten A, Gutniak M, Vignati L, Efendic S: The antidiabetogenic effect of GLP-1 is maintained during a 7-day treatment period and improves diabetic dyslipoproteinemia in NIDDM patients. *Diabetes Care* 19:1200-1206, 1996
26. Wulfele MG, Kooy A, de ZD, Stehouwer CD, Gansevoort RT: The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Intern Med* 256:1-14, 2004

27. Eleftheriadou I, Grigoropoulou P, Katsilambros N, Tentolouris N: The effects of medications used for the management of diabetes and obesity on postprandial lipid metabolism. *Curr Diabetes Rev* 4:340-356, 2008
28. Monami M, Lamanna C, Desideri CM, Mannucci E: DPP-4 inhibitors and lipids: systematic review and meta-analysis. *Adv Ther* 29:14-25, 2012
29. Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, Zheng S, Sabo M, D'Alessio DA, Tso P: GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G943-G949, 2005
30. Ansar S, Koska J, Reaven PD: Postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: focus on incretins. *Cardiovasc Diabetol* 10:61, 2011
31. Ronveaux CC, Tome D, Raybould HE: Glucagon-like peptide 1 interacts with ghrelin and leptin to regulate glucose metabolism and food intake through vagal afferent neuron signaling. *J Nutr* 145:672-680, 2015
32. Adamia N, Virsaladze D, Charkviani N, Skhirtladze M, Khutsishvili M: Effect of metformin therapy on plasma adiponectin and leptin levels in obese and insulin resistant postmenopausal females with type 2 diabetes. *Georgian Med News* 52-55, 2007
33. Romualdi D, Campagna G, Selvaggi L, Jr., Cento R, Proto C, Lanzone A, Guido M: Metformin treatment does not affect total leptin levels and free leptin index in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 89:1273-1276, 2008
34. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B: Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342, 2000
35. Memon RA, Holleran WM, Moser AH, Seki T, Uchida Y, Fuller J, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR: Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1257-1265, 1998

**APÊNDICE B** - Short-term extra-glycemic effects of vildagliptin on vascular function, inflammatory and oxidative stress biomarkers, and intestinal peptides on treatment-naïve obese type 2 diabetes women: a randomized head-to-head metformin-controlled study (2<sup>o</sup> artigo submetido)

**Short-term extra-glycemic effects of vildagliptin on vascular function, inflammatory and oxidative stress biomarkers, and intestinal peptides on treatment-naïve obese type 2 diabetes women: a randomized head-to-head metformin-controlled study**

Alessandra Schiapaccassa<sup>1</sup>, Priscila A. Maranhão<sup>2</sup>, Maria das Graças Coelho de Souza<sup>3</sup>, Diogo G. Panazzolo<sup>4</sup>, José Firmino Nogueira Neto<sup>5</sup>, Eliete Bouskela<sup>3</sup>, Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar<sup>3,6\*</sup>

.1- Graduate Program in Clinical and Experimental Physiopathology (FISCLINEX). Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-013 –Brazil.

2- Department of Information Sciences and Health Decision (CIDES) of the Faculty of Medicine of the University of Porto - Portugal

3- Laboratory of Clinical and Experimental Research on Vascular Biology (BioVasc), Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-013 - Brazil.

4- Endocrinology, University Hospital of Santa Maria, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-340 - Brazil

5- Lipids Laboratory (Lablip), Policlínica Piquet Carneiro, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-003 – Brazil.

6- Obesity Unit, Policlínica Piquet Carneiro, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-030 – Brazil.

**Running head:** Vildagliptin, metformin and endothelium

\*Corresponding Author:

Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar

E-mail: lgkraemeraguiar@gmail.com

Tel. 55-21-2334-0703 Fax. 55-21-2334-0692

Endocrinology, Department of Internal Medicine



Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, 20550-013, Rio de Janeiro, BRAZIL

Word count: abstract: 237, maintext: 3427, tables: 3, figures: 1.

## ABSTRACT

**Introduction:** Obesity is the main risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2D) and excessive visceral fat triggers low-grade inflammatory process, mediated by activation and release of cytokines and high flow of free fat acids that contribute to insulin resistance, increased oxidative stress, and impaired endothelial function. Metformin and vildagliptin have known vasculo-protective actions, but the value of these drugs on medically-naïve T2D during short-term use warrants investigation. Our purpose was to observe their effects on endothelial function, oxidative stress, inflammatory markers and blood viscosity.

**Methods:** 38 obese medically-naïve T2D women, aged between 19 and 50 years,  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$  were subjected to measurements of endothelial function, nutritive skin microvascular reactivity, blood viscosity, inflammatory and oxidative stress biomarkers at fasting state at baseline and randomized 1:1 to ingest metformin (850 mg twice/day) or vildagliptin (50 mg twice/day) during 30 days; and then, re-evaluated.

**Results:** Groups were considered similar at baseline. After treatment, vildagliptin promoted an improvement on endothelial-dependent and independent-vasodilatations, while metformin resulted in improved nutritive microvascular reactivity at capillary level. Intragroup analysis showed that vildagliptin reduced insulin, C-peptide and oxidized LDL, and increased adiponectin and GLP1 while metformin reduced weight, glycaemia, total cholesterol, HDL-c, LDL-c and DPP4 activity, with an unexpected increase on TNF- $\alpha$ . No significant differences in blood viscosity were noted.

**Conclusion:** In the microvascular bed investigated, both drugs improved microcirculatory function on obese T2D women, through distinct and complementary mechanisms of action on the vascular tissue.

**Keywords:** Diabetes, Obesity, Vildagliptin, Metformin, Endothelium, Atherosclerosis.

## INTRODUCTION

Obesity is a chronic disease, characterized by increased amount of body fat, predisposing to or being related to cardiovascular complications such as coronary artery disease, heart failure and also sudden death (1-3). Visceral obesity is more related to cardiovascular risk than subcutaneous one, since it is currently known that intra-abdominal

adipocytes are metabolically more active than ones located at subcutaneous sites. Excessive visceral fat accumulation is not only associated with precocious atherogenic abnormalities, but also to increased incidence of type 2 diabetes mellitus (T2D)(4).

The pathophysiology of excessive visceral fat is related to an underlying inflammatory process named low-grade inflammation mediated by activation/release of many cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). In addition, the increased flow of free fat acids (FFA), derived from visceral adipose tissue, contributes to insulin resistance (RI), to predisposition of atherosclerosis and also of T2D(5).

Obesity is the main causative factor for the increased prevalence of T2D which affects approximately 171 million of individuals worldwide. Over diverse periods of time, patients with obesity maintain glucose homeostasis due to hypersecretion of insulin and, the underlying hyperinsulinemia aims to overcome insulin resistance(6). However, over time and, as obesity and age progress, pancreatic  $\beta$  cells are not able to maintain insulin's hypersecretion and a relative insulin deficiency is observed, triggering glucose intolerance or T2D diagnosis. Paralleled with this pathophysiology, the occurrence of low levels of incretins, such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) influences negatively insulin secretion(7).

T2D increases macro and microvascular risks, but recent evidences show that states of glucose intolerance per se would be enough to promote them(8,9). Currently, microvascular dysfunction tested on skin of individuals with parents with T2D is already present even without altered glucose homeostasis, associated to occurrence of insulin resistance(10). Such findings reveal a new concept that endothelial damage precedes T2D diagnosis and even the occurrence of glucose intolerance(11,12).

Metformin is the most prescribed drug for T2D treatment. Although this drug has little, if any, direct vasomotor effect on large and mid-sized arteries(13), its capacity to improve endothelial function has been repeatedly demonstrated in animals and humans, as follows: in T2D(14,15), in populations with impaired glucose tolerance(16) or with metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome(17) targeting the microcirculation.

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors, including vildagliptin, are drugs also largely used in the treatment of T2D(18). Since some investigations associate beneficial effects of GLP-1 on endothelial function and vildagliptin's incretinomimetic and insulinotropic actions are well-established with additional benefits on reduction of glycated hemoglobin and control of T2D. These described actions of DPP4 inhibitors may be

associated to the same or even greater beneficial impact on vascular function on T2D patients.

We aimed to compare the effects of vildagliptin and metformin on vascular protection in treatment-naïve T2D women with obesity. We hypothesized that regulatory mechanisms of these beneficial vascular actions, especially vildagliptin's effects, would be related to oxidative stress, inflammation and maybe also influenced by incretins.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### *Subjects and study design*

This is a short-term randomized head-to-head clinical trial. Selected patients were recruited at Policlínica Piquet Carneiro of the State University of Rio de Janeiro. This study was conducted according to guidelines set out in the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethical Committee of Pedro Ernesto University Hospital (COEP: 0.87.3.2012) and registered in the Clinical Trials (NCT01827280).

During the first visit, the research protocol was explained and the written informed consent was obtained from all subjects. Afterwards, medical examination was performed aiming to evaluate inclusion and exclusion criteria, assessment of concomitant drugs in use, physical exam and collection of blood samples. At this visit, patients underwent a 75-g oral anhydrous glucose tolerance test (fasting and 2h), hepatic enzymes, creatinine, total blood and leukocyte counts and lipid profile determination after 10 hours fast. T2D diagnosis was established if fasting plasma glucose (PG) was  $\geq 126$  mg/dl and/or post-load (75g of glucose anhydrous) PG was  $\geq 200$  mg/dl (19). Asymptomatic patients with PG  $\geq 126$  mg/dl collected another sample to confirm T2D diagnosis.

The primary inclusion criteria were to have BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> and T2D diagnosis without any previous treatment with any antihyperglycemic agent. Additionally, these patients should be aged between 19 and 50 years old and have an abdominal circumference  $\geq 80$  cm.

We have excluded women who presented uncontrolled hypertension, or with clinical indication to change antihypertensive dosage during the study, pregnancy, major illness such as renal or hepatic insufficiency, history of previous myocardial infarction or angina pectoris, postmenopausal status, hematological diseases, triglycerides  $\geq 400$  mg/dl, being an active smoker, having a significant loss ( $\geq 5\%$ ) of body mass during the last six months; or being regular users of aspirin, hormonal contraceptives, anticoagulants and drugs for dyslipidemia.

Two hundred and forty-six women were interviewed and selected for the first visit and screening procedures and, 40 of them were included in the study. The main cause for exclusion was due to because they did not have T2D, or had it, but were already on treatment (n=206). After included in the study, one patient was excluded to non-compliance (n=1) and another one due to significant weight loss before the first endothelial test.

The participants were randomized by external selection 1:1 in order to receive metformin or vildagliptin. To minimize glycemic effects on vascular function, we have designed the experiment to last only 30 days. The total dosage was 1700 mg/day (850mg/pill) and 100mg/day (50mg/pill), respectively for metformin and vildagliptin; being both ingested twice a day (at lunch and dinner). No patient received both drugs concomitantly. During the first week of treatment, only the dinner pill was taken to minimize gastrointestinal side effects. All subjects were informed to keep their usual diet, physical activity and also regular use of other proposed medications in both groups. Except for antihypertensive drugs, which were not changed during the study, no other drug was accepted for use without previous communication. Compliance was tested at days 15 and 30 by counting pills. Criteria for non-compliance was the use of less than 85% of the total dosage/period of counting. The following described measures were assessed before (day 0-baseline) and after (day 30) treatment period.

#### *Anthropometric, clinical and laboratory measurements*

The same trained examiner collected anthropometric measurements: weight (days 0 and 30) using a digital scale (Filizola, São Paulo, SP, Brazil) and waist (day 0) at its smallest point with the abdomen relaxed. BMI was defined as weight in kilograms divided by the square of height in meters. Blood pressure was also measured twice in supine position with 5-min resting interval between measurements, using an automated apparatus (Lifewindow LW6000; Digicare Biomedical Technology, West Palm Beach, FL). We also evaluated the percentage of body fat and lean mass through bioimpedance (Biodynamics 450; Biodynamics Corporation, USA) at baseline and day 30.

#### *Endothelial function assessment*

We assessed forearm blood flow (BF) by non-invasive venous occlusion plethysmography (Hokanson, EC6, D.E., Bellevue, WA, USA) expressed in ml/min.100 ml<sup>-1</sup> of tissue as previously described (20) in the non-dominant forearm with a mercury-in-silastic strain gauge placed on the maximum circumference of forearm upper third portion. Two

inflating cuffs were used, one on the arm and the other on the wrist. On the arm, the cuff was inflated to 50 mmHg to intermittently avoid venous blood return. On the wrist, the cuff was inflated 1 min before forearm blood flow assessment and set to 60 mmHg above systolic blood pressure (BP) to exclude flow from hand arteriovenous shunts and avoid bias.

Before BF measurements, patients rested for 20 minutes on recumbent position. Venous occlusion plethysmography comprised four phases: first basal flow (b1); reactive hyperemia response after 3 min arterial occlusion (post-occlusive reactive hyperemia response - PORH); second basal flow (b2) and flow 5 min after 0.4 mg sublingual nitroglycerin (NTG) (Nitrolingual, BurnsAdler Pharmaceuticals Inc., Charlotte, NC, USA) After PORH, a 15-minute interval was given before b2. Blood flows were measured in cycles of 15 seconds each (10 s venous pressure use followed by 5 s venous pressure release) over 2 minutes. The mean of the first 4 measurements in each recording period was used for analysis.

Heart rate and BP was continuously measured using a cardiac monitor (DX 2021, DixtalBiomedica Ind. Com. Ltda., São Paulo, SP, Brazil) adjusted in the dominant arm.

#### *Skin nutritive microvascular assessment*

To test the effect of both drugs on nutritive skin microcirculation we used videocapillaroscopy performed at the dorsum site of the third finger at resting and after 4 minutes ischemia. This method is recognized in the literature as the best method for assessment of the number of perfused capillaries and it was performed and analyzed according to our well-validated methodology(21) by the same observer who was blinded to patient data. Using this method, we assessed functional capillary density (FCD) before and during post-occlusive reactive hyperemia response (FCD during PORH) that respectively represents the number of capillaries/mm<sup>2</sup> with blood flow at basal state and after ischemia, using an optical microscope (DM/LM, Wetzlar, Germany) with 250x magnification.

Patients arrived in a fasting state of 12 hours in the morning and were accommodated in an acclimated room with controlled temperature of 22°±1°C for 30 min before the beginning of the procedure. They were comfortably sat in a chair with the left arm put at the heart level. All patients had the arm blood pressure measurement carried out in this position. The left forearm and hand (dorsal part up) were put to rest on a cushion and the 3th finger was put on a pedestal mounted in X-Y status of a Leica DM/LM microscope. The top of the finger was gently immobilized by a clip, to avoid minimum movements. Experiments were carried out with continuous recording of temperature from the finger skin. This technique was carried out at the baseline and 30 thirty days after treatment.

### *Plasma Viscosity*

In this study, plasma viscosity was evaluated according to previously validated protocol(20). For that, immediately after blood collection, a tube of 5 ml of blood was centrifuged during 5 min at 1500/g. After this, the supernatant was collected and 0.5ml was used to test viscosity in plasma ( $\eta_p$ ) samples, assessed with a cone-in-plate viscosimeter DV-II+ PRO Digital (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, USA) at 230  $s^{-1}$  shear rates and 37°C. Results were expressed as mPascal  $\times$  sec (mPa.s).

### *Biomarkers of low-grade inflammation, oxidative stress and intestinal peptides*

Plasma levels of IL-6 and endothelin-1 were evaluated by Quantikine® High Sensitivity IL-6 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and Quantikine® Endothelin-1 ELISA kits, respectively (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For determination of serum concentrations of oxidized LDL was used Mercodia ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Urinary levels of isoprostanes were evaluated by Bioxytech® Urinary 8-epi-Prostaglandin F2 $\alpha$  kit (Oxis Research, Foster City, CA, USA). All assays were performed according to manufacturer protocols and intra and inter assay precision were inferior than 10%, except for urinary isoprostane analysis which was less than 20%. Active GLP-1 levels were analyzed by sandwich high-sensitivity ELISA chemiluminescent assay (Merck-Millipore, Billerica, MO, USA).

Multiplexing analysis was used to determine simultaneously the concentration of GIP, insulin, C-peptide, ghrelin, leptin, glucagon, pancreatic polypeptide (PP), peptide YY (PYY), adiponectin, resistin and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) by Magnetic Milliplex® MAP kits (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). All intra and interassay precisions were <10% and <20%, respectively.

DPP4 activity assessment was performed using glycyl-prolyl-paranitroanilide (Gly-Pro-pNA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as chromogenic substrate. At the end of incubation period, the activity of DPP4 in the samples was determined by comparing the optical density of each sample with the optical density derived from p-nitroanilin standard curve, generated by data analysis software (KC Junior, BioTek, Winooski, VT, USA). Results were expressed as  $\mu$ M of p-nitroaniline/ml/min. The sensitivity of this method was 0.1  $\mu$ M/ml/min and intra-assay precision was <3%.

Ultrasensitive C-reactive protein (CRP) was tested by automated analyzer A25 BioSystems® (Biosystems SA, Barcelona, SPAIN) and measured by turbidimetry using high

sensitivity latex method. Additionally, blood cell count was performed by automated hematology counter XS1000i Sysmex® (Sysmex Corporation, Kobe, Kansai, JPN). Blood levels of glucose, total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and triglycerides (TG) were evaluated spectrophotometrically by the following methods: glucose oxidase/oxidase, cholesterol oxidase/oxidase, direct detergent and glycerol 3-phosphate/oxidase. These analyses were performed by an automated analyzer A25 BioSystems® (Biosystems SA, Barcelona, Spain). LDL-c levels were calculated using the mathematical equation proposed by Friedewald(22).

### *Statistical analysis*

We used GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) for statistical analysis. Gaussian distribution was checked and parametric and non-parametric data are expressed as mean±SD. All variables were checked for normality and comparisons were performed according to distribution of variables and tested by paired and unpaired t tests, or U test. To correlate them we have used Spearman rank-order test. To establish correlations, we first calculated the delta difference from post minus pre-treatment period and then correlated these deltas. Variables are presented as mean±SD. We used G\*Power 3.1.9.2 (Universität Kiel, Germany) to calculate sample size of 40 patients with an actual power of 0.9500156 (t tests; point biserial; two-tailed; effect size of 0.51;  $\alpha$  probability error of 0.05; and a power of 0.95). Significant differences were assumed to be present at  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

Thirty-eight subjects aged  $39.4 \pm 6.5$  years with BMI of  $37.2 \pm 5.0$  kg/m<sup>2</sup> were included in the analysis. At baseline (table 1), both groups had the same characteristics on anthropometric, clinical and laboratory variables.

Table 1: Comparison between Vildagliptin and Metformin groups on clinical, anthropometrical and laboratorial variables after treatment period (intergroup and intragroup analysis)

| Variables                                    | Vildagliptin | Vildagliptin          | Metformin    | Metformin               |
|--|--------------|-----------------------|--------------|-------------------------|
|  | (baseline)   | (day 30)              | (baseline)   | (day 30)                |
| Age (years)                                  | 39.05±5.32   | 39.05±5.32            | 39.79±7.7    | 39.79±7.7               |
| Weight (kg)                                  | 94.96±14.03  | 95.05±14.14           | 99.51±16.11  | <b>98.69±15.70*</b>     |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> )                     | 36.03±3.96   | 35.63±4.10            | 38.48±6.12   | 37.29±5.92              |
| Waist Circumference (cm)                     | 105.59±10.5  | -                     | 106.55±12.05 | -                       |
| Hip Circumference (cm)                       | 116.06±8.99  | -                     | 122.68±11.95 | -                       |
| WHR  | 0.91±0.05    | -                     | 0.88±0.07    | -                       |
| Systolic BP (mmHg)                           | 125.7±11.91  | 122.2±12.44           | 129.1±18.41  | 122.3±12                |
| Diastolic BP (mmHg)                          | 75.58±13.41  | 72.26±9.33            | 75.84±10.37  | 73.79±8.28              |
| Heart rate(bpm)                              | 75.68±12.68  | 69.84±10.49           | 70.05±12.95  | 73.11±10.89             |
| Fat mass (%)                                 | 39.55±3.95   | 39.32±3.87            | 41.10±4.25   | 41.36±3.53              |
| Lean mass (%)                                | 60.45±6.48   | 60.68±3.87            | 59.20±6.13   | 58.64±3.53              |
| Insulin (mIU/L)                              | 1.76±0.90    | <b>1.49 ± 0.73**</b>  | 1.91±1.17    | 1.57 ± 0.85             |
| Glucose (mg/dL)                              | 200.26±95.07 | 193.08 ± 109          | 190.26±74    | <b>153.6 ± 61.19***</b> |
| HbA1c (%)                                    | 8.03±1.79    | 7.37 ± 1.58           | 7.85±2.03    | 7.2 ± 2.55              |
| TC (mg/dL)                                   | 183.90±36.74 | 182.1 ± 41.28         | 198.00±37.8  | <b>187.8 ± 28.23*</b>   |
| TG (mg/dL)                                   | 161.00±79.84 | 148.4 ± 83.31         | 141.21±78.66 | 153.9 ± 72.75           |
| HDL - c (mg/dL)                              | 43.00±8.19   | 44.11 ± 9.35          | 46.73±11.28  | <b>44.32 ± 9.62*</b>    |
| LDL - c (mg/dL)                              | 108.60±26.28 | 105.6 ± 23.24         | 112.90±25.89 | <b>112.6 ± 22.57*</b>   |
| VLDL - c (mg/dL)                             | 32.26±15.97  | 26.44 ± 9.51          | 28.26±15.73  | 30.89 ± 14.55           |
| CRP (mg/dL)                                  | 1.15±1.38    | 0.89 ± 0.7            | 0.92±0.62    | 0.75 ± 0.46             |
| C-Peptide (ng/mL)                            | 1.74±0.91    | <b>1.64 ± 0.74*</b>   | 1.78±0.91    | 1.52 ± 0.50             |
| Grelin (pg/mL)                               | 45.58±19.87  | 47.34 ± 23.28         | 44.32±26.92  | 45.28 ± 33.36           |
| GIP (pg/mL)                                  | 24.3±14.6    | 20.48 ± 13.65         | 20.29±12.28  | 23.65 ± 17.66           |
| GLP-1 (pM/L))                                | 1.15±1.04    | <b>3.62±3.61**</b>    | 0.98±0.67    | 1.47±1.32&              |
| Leptin (pg/mL)                               | 21880±19430  | 21460 ± 18257         | 25350±13330  | 26250 ± 14426           |
| Glucagon (pg/mL)                             | 23.47±20.63  | 29.02 ± 26.4          | 31.46±53.48  | 30.82 ± 46.98           |
| Adiponectin (ng/mL)                          | 11950±11540  | <b>15107 ± 18173*</b> | 11590±6151   | 12212 ± 6723            |
| Resistin (ng/mL)                             | 34.01±11.45  | 36.5 ± 13.81          | 36.06±18.74  | 35.93 ± 20.01           |
| PP (pg/mL)                                   | 30.17±24.19  | 35.02 ± 34.45         | 33.26±34.8   | 29.72 ± 29.43           |
| PYY (pg/mL)                                  | 39.24±21.73  | 36.51 ± 29.42         | 38.76±36.88  | 49.51 ± 31.45           |
| IL-6 (pg/mL)                                 | 2.117±1.37   | 2.018± 1.213          | 3.436±4.04   | 2.69 ± 2.5              |
| LDL <sub>ox</sub> (U/L)                      | 74.8±31.33   | <b>67.31 ± 29.13*</b> | 62.13±16.81  | 62.54 ± 20.04           |
| NEFA (mmol/L)                                | 0.67±0.23    | 0.64 ± 0.24           | 0.63±0.25    | 0.65 ± 0.19             |
| TNF-α (pg/mL)                                | 0.54±0.61    | 0.42±0.44             | 0.36±0.90    | <b>0.73±1.19**</b>      |
| Endotelin (pg/mL)                            | 1.67±0.55    | 1.49 ± 0.35           | 1.62±0.55    | 1.62 ± 0.58             |
| DPP4 <sub>act</sub> (uM/mL/min)              | 9.37±3.52    | 8.05 ± 3.49           | 9.65±3.73    | <b>9.09 ± 3.52*</b>     |
| UrinaryIsoprostranes (pg/Mmol/gr/creatinine) | 283.2±299.8  | 233.4±122.3           | 214.2±123.9  | 223.9±78.52             |
| PlasmaViscosity (30mPa.s)                    | 1.84±0.1     | 1.88±0.23             | 1.88±0.14    | 1.79±0.13               |



|                            |           |           |           |           |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Plasma Viscosity (50mPa.s) | 1.84±0.13 | 1.85±0.21 | 1.81±0.09 | 1.78±0.12 |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|

Data are expressed as means±standard deviation (SD).

\*Intragroup comparisons: \* P<0.05; \*\* P<0.01; P< 0.001

&Intergroup comparisons: &P<0.05; &&P<0.01; &&&P<0.001

Legends: BMI – body mass index; BP – blood pressure, HbA1c – glycated hemoglobin, TC – total cholesterol, TG – triglycerides, HDLc – high density lipoprotein cholesterol; LDLc - low density lipoprotein cholesterol; VLDLc – very low density lipoprotein cholesterol; GIP – Glucose-dependent insulinotropic peptide; GLP-1 – glucagon-like peptide-1; PP – Pancreatic polypeptide; PYY – Peptide YY; IL-6 – Interleukin 6; LDL<sub>ox</sub> – oxidized low density lipoprotein; NEFA – non esterified fatty acids; DPP4<sub>act</sub> – Dipeptidylpeptidase4 activity.

They also had the same endothelial function (table 2) and nutritive microvascular reactivity (table 3).

Table 2: Comparison between Vildagliptin and Metformin groups on endothelial function before treatment period (baseline measures).

|  | Vildagliptin | Metformin | P value |
|--|--------------|-----------|---------|
| FBF <sub>b1</sub> (ml/min/100ml of tissue)         | 3.02±1.81    | 2.39±1.56 | 0.34    |
| FBF <sub>PORH C1</sub> (ml/min/100ml of tissue)    | 10.21±6.55   | 8.61±3.59 | 0.63    |
| FBF <sub>PORH C1-C4</sub> (ml/min/100ml of tissue) | 5.82±3.06    | 4.56±1.69 | 0.19    |
| FBF <sub>b2</sub> (ml/min/100ml of tissue)         | 2.77±1.43    | 2.19±1.13 | 0.18    |
| FBF <sub>NTG</sub> (ml/min/100ml of tissue)        | 2.55±1.36    | 1.97±1.02 | 0.28    |

Data are expressed as means±standard deviation (SD).

Legends: FBF<sub>b1</sub> – Baseline measure of forearm blood flow, FBF<sub>PORH-C1</sub>–Forearm blood flow during post-occlusive reactive hyperaemia (first curve), FBF<sub>PORH-C1-C4</sub> - Forearm blood flow during post-occlusive reactive hyperaemia (mean of the first four curves), FBF<sub>b2</sub>– Baseline (post-PORH) measure of forearm blood flow, FBF<sub>NTG</sub> – Forearm blood flow during post-sublingual nitro-glycerine.

Table 3: Comparison between Vildagliptin and Metformin groups on microvascular reactivity after treatment period (intergroup and intragroup analysis)

|  | Vildagliptin<br>(Day 0) | Vildagliptin<br>(Day 30) | Metformin<br>(Day 0) | Metformin<br>(Day 30)               |
|--|-------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Resting FCD (cap/mm <sup>2</sup> )     | 24.1 ± 15.65            | 32 ± 14.69               | 34.64 ± 20.29        | 43.61 ± 16.33                       |
| FCD during PORH (cap/mm <sup>2</sup> ) | 20.81 ± 14.72           | 28.97 ± 13.01            | 32.40 ± 19.41        | <b>45.75± 15.98<sup>&amp;</sup></b> |

Data are expressed as means±standard deviation (SD).

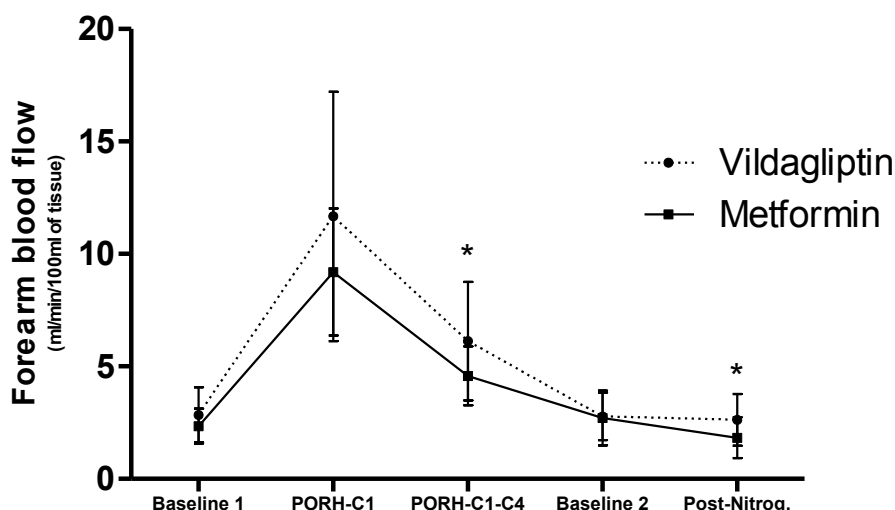
Intergroup comparisons: &P<0.05

Legends: FCD - functional capillary density, PORH –post occlusive reactive hyperemia

Our main finding was related to an improvement on endothelial-dependent and -- independent vasodilatation on vildagliptin group, while metformin resulted in improved nutritive microvascular reactivity at capillary level. As observed on figure 1, the use of vildagliptin resulted in improvement of vascular function, expressed in augmented responses for endothelial-dependent (during PORH; P=0.03) and independent-

vasodilatation (post-nitroglycerin;  $P=0.02$ ) compared to metformin. Intragroup comparisons did not show any significant differences between pre- and post-treatment periods on both groups.

Figure 1: Post-treatment measurement of forearm blood flow between groups



Data are expressed as means $\pm$ SD

Legends:  $FBF_{b1}$  – Baseline measurement of forearm blood flow,  $FBF_{PORH-C1}$ –Forearm blood flow during post-occlusive reactive hyperaemia (first curve),  $FBF_{PORH-C1-C4}$ –Forearm blood flow during post-occlusive reactive hyperaemia (mean of the first four curves),  $FBF_{b2}$ – Baseline (post-PORH) measure of forearm blood flow,  $FBF_{NTG}$ – Forearm blood flow during post-sublingual nitro-glycerine

In respect to nutritive microcirculatory function at capillary level (table 2), we noticed that after the use during 30 days, metformin improved functional capillary density (FCD) during PORH (i.e., increased capillary recruitment;  $P=0.02$ ) compared to vildagliptin (table 2) while intragroup analysis did not show any significant difference in FCD at rest ( $P=0.49$  for vildagliptin and  $P=0.55$  for metformin) or during PORH ( $P=0.21$  for vildagliptin and  $P=0.10$  for metformin, respectively).

After 30 days of treatment we have observed some changes on tested biomarkers (table 1).GLP-1 levels were significantly higher in the Vildagliptin group compared to Metformin one ( $P=0.03$ ). In a step further, we have investigated intragroup comparisons and noticed that vildagliptin reduced insulin ( $P=0.008$ ), C-peptide ( $P=0.05$ ), and oxidized LDL ( $P=0.02$ ). Additionally, the use of vildagliptin resulted in increments of adiponectin ( $P=0.04$ ) and GLP-1 ( $P=0.009$ ) levels after treatment. In turn, the use of metformin reduced body weight ( $P=0.03$ ), fasting PG ( $P=0.0005$ ), total cholesterol( $P=0.02$ ), HDL-c ( $P=0.03$ ),

LDL-c ( $P=0.01$ ) and also DPP4 activity ( $P=0.03$ ). Of interest, this drug induced an increase in TNF- $\alpha$  levels ( $P=0.008$ ). We did not observe any significant difference in plasma viscosity.

We have correlated delta changes (post- minus pre-treatment) among variables that showed intergroup differences post-treatment, as follows: in the Vildagliptin group, FCD during PORH correlated to weight ( $\rho=0.88$ ,  $P<0.01$ ), BMI ( $\rho=0.88$ ,  $P<0.01$ ) and VLDL-c ( $\rho=-0.73$ ,  $P<0.05$ ); while in the Metformin group a correlation to PYY ( $\rho=0.71$ ,  $P<0.05$ ) was noticed. In respect to endothelial function, vildagliptin showed correlation between endothelial-dependent vasodilatation and DPP4 activity ( $\rho=0.46$ ,  $P<0.05$ ); while metformin correlated to HbA1c ( $\rho=-0.48$ ,  $P<0.05$ ), C-peptide ( $\rho=0.47$ ,  $P<0.05$ ), GIP ( $\rho=0.54$ ,  $P<0.05$ ), IL-6 ( $\rho=0.65$ ,  $P<0.01$ ), adiponectin ( $\rho=-0.59$ ,  $P<0.01$ ), BMI ( $\rho=-0.55$ ,  $P<0.05$ ), plasma viscosity ( $\rho=0.66$ ,  $P<0.05$ ), %body fat ( $\rho=0.66$ ,  $P<0.01$ ) and %lean mass ( $\rho=-0.66$ ,  $P<0.01$ ). Vildagliptin also showed correlation to endothelial-independent vasodilatation and %fat mass ( $\rho=-0.56$ ,  $P<0.05$ ), %lean mass ( $\rho=0.56$ ,  $P<0.05$ ) and heart rate ( $\rho=0.47$ ,  $P<0.05$ ); while metformin showed correlation to plasma viscosity ( $\rho=0.71$ ,  $P<0.05$ ).

## DISCUSSION

Two key features in the pathophysiology of atherothrombosis are closely related to diabetes complications: endothelial dysfunction and low-grade inflammation(23). The microcirculation is the main site of the cardiovascular system, responsible for the regulation of tissue perfusion, optimization of oxygen and nutrient delivery and cell/gas excreta and also for the regulation of capillary hydrostatic pressure, preventing fluctuations of intraluminal pressure and, consequently helping to regulate peripheral vascular resistance. In this study, we have employed a method that assessed these sites, compared metformin and vildagliptin on endothelial function during short-term use in T2D patients who had never been subjected to any treatment. We have observed an improvement in endothelial-dependent and - independent vasodilatation after 30 days use of vildagliptin over metformin. Endothelial dysfunction appears to be a systemic phenomenon, affecting resistance and conduit vessels in the forearm as well as the coronary circulation(24). Recent data suggest that coronary endothelial dysfunction predicts long-term atherosclerotic disease progression and cardiovascular event rates(25), existing correlation between forearm vasomotor response (resistance vessels) and coronary arteries (conduit vessels)(26). Therefore, the forearm vascular bed can probably be used as a surrogate marker for assessing endothelial systemic function, including coronary arteries(24). Our data showed that, in treatment-naïve T2D

patients, the use of vildagliptin for only 30 days improved vascular function, suggesting a benefit to systemic vascular bed. Although previous data have shown similar benefits on these variables with the use of metformin (27), we could not reproduce it by using this drug for only 30 days.

One of the aspects to be considered when analyzing the results found in our study is the different response of drugs according to vessel caliber. GLP-1 receptor is a G-protein coupled receptor expressed in innumerable organs, including vessel walls and myocytes(28), with numerous studies showing effects of GLP-1 on blood pressure, heart rate, ischemia/reperfusion injury, coagulability, inflammation and endothelial function(29). Some studies suggest that GLP-1 is able to exert its effects on nitric oxide production by endothelial cells(30,31) and also through direct action on the smooth muscle cells in the vessel wall(32) and, our findings corroborate it.

On the other hand, metformin is believed to exert its pharmacological effects through 5-AMP-activated protein kinase, which ultimately increases nitric oxide synthesis and release(33,34). Metformin also appears to increase endothelial derived hyperpolarizing factor mediated (EDHF-mediated) signaling through processes that improve overall endothelial function, and are likely related to reduced production of cyclooxygenase pathway derivatives(35). Therefore, possibly the differences observed according to vessel site tested in our study could be related, not only to the period of use, but also to different mechanisms of action on tested vessels.

Other important aspect to be considered is that in respect to vildagliptin the findings described above are glucose-independent, since no change in PG was noticed in this group. GLP1 and DPP4 inhibitors lower postprandial PG in T2D, at least, in part through their ability to increase insulin secretion and to inhibit glucagon release. Possible additional influences on observed results could be associated to reduction in fasting insulin and C-peptide levels even with higher levels of GLP1, probably due to lower pancreatic demand found during fasting period. Distinctively from vildagliptin, metformin acts inhibiting gluconeogenesis during fasting period and this feature could have influenced the observed changes in fasting PG.

Our study also showed unexpected higher levels of TNF- $\alpha$  in the Metformin group, which is highly increased in obese subjects and positively correlated to visceral adiposity and insulin resistance(36). Our sample was initially calculated based on methodological characteristics of vascular reactivity measured by videocapillaroscopy and believe that our sample size may have influenced this unexpected result. Additionally, we also included the

evaluation of blood viscosity since it is an important hemorheological variable regulating blood flow in the microcirculation(37), being considered a cardiovascular risk factor (38). Our investigation however, did not reveal significant viscosity changes between the two groups.

Our findings also showed correlations between endothelial dependent and independent changes with vildagliptin and improvement in body composition, demonstrated by negative correlation with body fat changes and consequently, positive correlation with lean mass. This variation, however, was not accompanied by reduction in DPP4 activity. Despite the good correlation found between vasodilatation in the arteriolar level and body composition, vildagliptin was not able to promote similar correlations in the capillary one.

We concluded that both drugs, vildagliptin and metformin, were capable of improving vascular function in obese, T2D women, probably through distinct and complementary mechanisms of action on the vascular wall; with predilection of vildagliptin to act on vessels more related to peripheral vascular resistance while metformin acts on nutritive microflow at capillary level. In this view, one class should not replace the other for treating T2D in respect to vasculo-protection during short-term use. Instead, they are complementary classes of drugs for T2D in the search for vascular function improvement and possible protection.

#### **DECLARATION OF INTEREST**

This work was partially supported by Novartis S.A. in a study originally applied to this company by an initiative of the researcher (LGK-A).

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank Amélio F. Godoy-Matos and Maria Aparecida F. de Oliveira.

#### **REFERENCE LIST**

1. Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Speizer FE, Hennekens CH: A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 341:650-658, 1999
2. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF: Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 355:763-778, 2006
3. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP: Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67:968-977, 1983

4. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C: Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 10:497-511, 1990
5. Cartier A, Lemieux I, Almeras N, Tremblay A, Bergeron J, Despres JP: Visceral obesity and plasma glucose-insulin homeostasis: contributions of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in men. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1931-1938, 2008
6. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP, .: Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42:1663-1672, 1993
7. Drucker DJ: The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3:153-165, 2006
8. Nielson C, Lange T, Hadjokas N: Blood glucose and coronary artery disease in nondiabetic patients. *Diabetes Care* 29:998-1001, 2006
9. Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL: Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52:2867-2873, 2003
10. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Haring HU: Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 101:1780-1784, 2000
11. Hsueh WA, Lyon CJ, Quinones MJ: Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med* 117:109-117, 2004
12. Tooke JE, Goh KL: Endotheliopathy precedes type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21:2047-2049, 1998
13. Kraemer-Aguiar, L. G. and Boyko, E. J. Metformin and vasculoprotection: clinical aspects. *Transworld Research Network* 2, 111-129. 2008.
14. Magalhaes FO, Gouveia LM, Torquato MT, Paccola GM, Piccinato CE, Foss MC: Metformin increases blood flow and forearm glucose uptake in a group of non-obese type 2 diabetes patients. *Horm Metab Res* 38:513-517, 2006
15. Mather KJ, Verma S, Anderson TJ: Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 37:1344-1350, 2001
16. Vitale C, Mercurio G, Cornoldi A, Fini M, Volterrani M, Rosano GM: Metformin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *J Intern Med* 258:250-256, 2005

17. Orio F, Jr., Palomba S, Cascella T, De SB, Manguso F, Savastano S, Russo T, Tolino A, Zullo F, Lombardi G, Azziz R, Colao A: Improvement in endothelial structure and function after metformin treatment in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome: results of a 6-month study. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6072-6076, 2005
18. Duez H, Cariou B, Staels B: DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol* 83:823-832, 2012
19. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 40:S11-S24, 2017
20. Panazzolo DG, da Silva LH, Maranhao PA, Souza MG, Nogueira Neto JF, Leao LM, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG: Short-term effects of low-dose estradiol on endothelial function and blood viscosity in nondiabetic postmenopausal overweight women: a double-blind, placebo-controlled study. *Menopause* 23:1114-1121, 2016
21. Maranhao PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, Koury JC, Bouskela E: Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* 8:32, 2011
22. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, Jones SR: Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA* 310:2061-2068, 2013
23. Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Segura-Galindo A, Del Canizo-Gomez FJ: Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World J Diabetes* 5:444-470, 2014
24. Wilkinson IB, Webb DJ: Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol* 52:631-646, 2001
25. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM: Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101:1899-1906, 2000
26. Hirooka Y, Egashira K, Imaizumi T, Tagawa T, Kai H, Sugimachi M, Takeshita A: Effect of L-arginine on acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation differs between the coronary and forearm vasculatures in humans. *J Am Coll Cardiol* 24:948-955, 1994
27. de Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, Laflor C, Sicuro F, Wiernsperger N, Bottino D, Bouskela E: Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 29:1083-1089, 2006

28. Eriksson L, Nystrom T: Antidiabetic agents and endothelial dysfunction - beyond glucose control. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 117:15-25, 2015
29. Ussher JR, Drucker DJ: Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev* 33:187-215, 2012
30. Richter G, Feddersen O, Wagner U, Barth P, Goke R, Goke B: GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am J Physiol* 265:L374-L381, 1993
31. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hofer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M: Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* 117:2340-2350, 2008
32. Nystrom T, Gonon AT, Sjöholm A, Pernow J: Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regul Pept* 125:173-177, 2005
33. Morrow VA, Fougere F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP: Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 278:31629-31639, 2003
34. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH: Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 55:496-505, 2006
35. Gao X, Martinez-Lemus LA, Zhang C: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. *World J Cardiol* 3:25-31, 2011
36. Ruan H, Lodish HF: Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447-455, 2003
37. Coppola L, Cerciello T, Boviatsi P, Pastore A, Coppola A, Antonio G, Mastrolorenzo L, Marfella R, Gombos G: Effect of postprandial hyperglycaemia on blood viscosity in aged patients suffering from type 2 diabetes as compared with healthy volunteers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 18:745-750, 2007
38. Koenig W, Sund M, Lowe GD, Lee AJ, Resch KL, Tunstall-Pedoe H, Keil U, Ernst E: Geographical variations in plasma viscosity and relation to coronary event rates. *Lancet* 344:711-714, 1994



## ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa Hupe – Uerj

**Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Sr2****Comissão de Ética em Pesquisa – COEP**

Rua São Francisco Xavier, 524, bloco E, 3º. andar, sala 3018 - Maracanã.

CEP 20550-900 – Rio de Janeiro, RJ.

E - mail: [etica@uerj.br](mailto:etica@uerj.br) - Telefone: (21) 2334 2180**PARECER COEP 014/2013**

A Comissão de Ética em Pesquisa – COEP, em sua 11ª Reunião Ordinária em 13 de dezembro de 2012, analisou o protocolo de pesquisa n.º.087.3.2012, segundo as normas éticas vigentes no país para pesquisa envolvendo sujeitos humanos e emite seu parecer.

**Projeto de pesquisa :** *“Efeitos agudos e crônicos de curto prazo de vildagliptina sobre as funções endotelial e microvascular, inflamação de baixo grau e estresse oxidativo em obesas diabéticas recém-diagnosticadas ”*

**Pesquisador Responsável:** Luiz Guilherme Kraemer

**Instituição Responsável –** Laboratório de Pesquisa Clínica e Experimental em Biologia Vascular(BIOVASC)/ IBRAG/UERJ

**Área do Conhecimento:** 4.00 –Ciências da Saúde

**Sumário:** Atualmente, os alimentos que consumimos apresentam um alto teor de gordura e após uma refeição os níveis de lipídeos, ou seja, gorduras, no sangue aumentam consideravelmente podendo causar prejuízos aos vasos sanguíneos. Este estudo tem como propósito avaliar, em indivíduos com diabetes , os efeitos das drogas metformina e a vildagliptina na função vascular e no estresse oxidativo, após uma refeição rica em gordura. Estas drogas são liberadas pelo Ministério da Saúde para uso em humanos e amplamente utilizada para o tratamento de diabetes melittus tipo 2.

**Objetivo:** Avaliar, em indivíduos com diabetes , os efeitos das drogas metformina e a vildagliptina na função vascular e no estresse oxidativo, após uma refeição rica em gordura.

**Considerações Finais:** Após debate entre os membros, a COEP considerou que o projeto de pesquisa possui metodologia e objetivos claros e bem apresentados. O TCLE está adequado para o público alvo, de acordo com as orientações da COEP. O cronograma é adequado à proposta de estudo.

Após o cumprimento das exigências ao parecer 007/2013, a COEP considerou o projeto aprovado.

Faz-se necessário apresentar Relatório Anual - **previsto para fevereiro de 2014**, para cumprir o disposto no item VII. 13.d da RES. 196/96/CNS. Além disso, a COEP deverá ser informada de fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo, devendo o pesquisador apresentar justificativa, caso o projeto venha a ser interrompido e/ou os resultados não sejam publicados.

**Situação: Projeto Aprovado**

Rio de janeiro, 07 de fevereiro de 2013

Profª. Dra. Rosa M. E. Moreira da Costa  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa/UERJ  
Mat 34509-0

**ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido**

**CÓDIGO DO PACIENTE \_\_\_\_\_**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

“Este documento foi elaborado de acordo com o acordo de Helsinki”

**EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DE CURTO-PRAZO DO GALVUS (VILDAGLIPTINA) SOBRE AS FUNÇÕES ENDOTELIAL E MICROVASCULAR, INFLAMAÇÃO DE BAIXO-GRAU E ESTRESSE OXIDATIVO EM OBESAS DIABÉTICAS RECÉM-DIAGNOSTICADAS: PAPEL DOS PEPTÍDEOS INTESTINAIS DURANTE A LIPEMIA PÓS-PRANDIAL.**

**Local do estudo:**

Laboratório de Pesquisa Clínica e Experimental em Biologia Vascular (BioVasc)  
UERJ - Pavilhão Reitor Haroldo Lisboa da Cunha, Rua São Francisco Xavier, 524 / 104 –  
térreo

- CEP: 20550-013 Rio de Janeiro - RJ

Telefone: (021) 2334-0703

**Investigadores: Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar, Eliete Bouskela, Amelio Godoy Mattos, Maria**

**das Graças Coelho de Souza, Alessandra Schiappacassa, Priscila Alves Maranhão, Maria Aparecida Faria de Oliveira.**

O (a) Pesquisador (a).....me convidou a participar deste projeto de pesquisa. Eu fui informado(a) que sou livre para aceitar ou não participar. Eu afirmo que fui informado e entendi todos os itens descritos abaixo:

**1. INFORMAÇÃO SOBRE A MEDICAÇÃO UTILIZADA DO ESTUDO**

A metformina e a vildagliptina são drogas liberadas para uso em humanos pelo Ministério da Saúde para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2. A metformina reduz os níveis da glicose (açúcar) no sangue através de diversos mecanismos, sendo o principal a melhora da ação do hormônio insulina nos tecidos. Este hormônio é o principal responsável pelo metabolismo do açúcar no sangue. A vildagliptina é um medicamento que melhora da secreção da insulina. Ela age inibindo uma enzima, a dipeptidilpeptidase- 4 (DPP-4) o que faz com que outro hormônio, o GLP-1, fique mais tempo circulando no sangue e isso acaba por melhorar a secreção da insulina.

**2. JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO E OBJETIVOS**

Atualmente, há um excesso do consumo de alimentos gordurosos. Estes alimentos além de engordarem, causam em diabéticos alterações na circulação sanguínea, mais especificamente nos vasos sanguíneos por onde o sangue passa. Os medicamentos que serão empregados neste estudo podem ou não ter algum efeito nos vasos sanguíneos quando um diabético come alimentos gordurosos. E nosso objetivo é avaliar estes efeitos.

**3. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO E SUAS CONSEQUÊNCIAS**

A metformina 850mg/comprimido será administrada na hora do almoço e do jantar por 30 dias. A vildagliptina 50mg/comprimido será administrada às 10 horas e às 18 horas por 30 dias. Você irá receber apenas um destes remédios, e a seleção de qual irá utilizar será ao acaso. A duração

total da sua participação no estudo é de aproximadamente 04 semanas num total de 04 visitas médicas. Você também será submetida a exames físicos e testes complementares descritos abaixo:

**Visita de pré-seleção (período de 15 dias prévios ao início do estudo):** durante esta consulta, o estudo será explicado e você assinará um termo de consentimento confirmando a sua participação. Será submetida a um exame físico (avaliação do peso, altura, circunferência abdominal e pressão sanguínea). Receberá um pedido de exame de sangue.

Somente após o resultado deste exame saberemos se você participará ou não do projeto. Você receberá contato telefônico assim que os exames estiverem prontos para agendarmos sua nova consulta.

**Consulta de inclusão (dia 0):** Suas dúvidas serão novamente esclarecidas e se preencher todos os critérios necessários para sua participação no estudo, você será agendada para a visita

**Visita para exames (dia 1):** Para esta visita você deverá chegar ao BioVasc em jejum de 8 horas. Será coletada uma amostra de urina. Você ficará em repouso em uma sala climatizada, deitada, para realizar o exame da pletismografia. Serão colocados dispositivos no seu braço, semelhantes a um aparelho de pressão, com a finalidade de avaliarmos a sua circulação sanguínea. NA segunda parte do exame você fará uso de nitroglicerina em spray sublingual. Este remédio causa uma dilatação leve dos vasos sanguíneos e não apresenta qualquer tipo de risco para sua saúde. Entretanto, algumas pessoas podem ter transitoriamente dor de cabeça, tonteiras, zumbido e pressão baixa.

Após este procedimento, **UM CATETER VENOSO SERÁ INSERIDO EM SEU BRAÇO, PODENDO CAUSAR DESCONFORTO, MAS COM O ÚNICO OBJETIVO** de manter a veia para as coletas de sangue. Assim, **VOCÊ SERÁ SUBMETIDA A APENAS UMA PICADA DE AGULHA.** Neste momento, você também

irá realizar a videocapilaroscopia, um exame indolor, no qual visualizamos seus vasos sanguíneos do dedo através de um microscópio. **VOCÊ NÃO PODERÁ CORTAR AS CUTÍCULAS DO DEDO DA MÃO ESQUERDA (DEDO DA ALIANÇA DE CASAMENTO) POR TRÊS SEMANAS ANTES DO EXAME.**

Ao mesmo tempo, outro exame (laser-Doppler fluxometria) também será realizado, onde um adesivo é colado no seu punho para avaliar a circulação da pele. Após esses exames, você receberá uma refeição gordurosa composta por 1 copo de leite integral com achocolatado, 1 *croissant* com manteiga, 5 fatias de salame e 3 de queijo cheddar. Através daquele cateter em sua veia serão coletadas novas amostras de sangue aos 30, 60, 120 e 180 minutos e a videocapilaroscopia será refeita. Aos 180 minutos, mais uma amostra de urina será coletada. Antes de sua partida, você receberá orientações médicas para o uso do medicamento para o diabetes.

**Visita Intermediária (dia 15):** Nesta visita, será realizada uma consulta médica para avaliação do uso correto da medicação e de efeitos colaterais.

**Visita final e fim do tratamento (dia 30):** Você será reavaliada através dos mesmos métodos da visita do dia 01. Ao término deste exame, você será encaminhada para o ambulatório de obesidade da Policlínica Piquet Carneiro.

#### **4. RISCOS POTENCIAIS, INFORMAÇÕES IMPORTANTES, SEGURANÇA E BENEFÍCIOS**

A metformina é usada há muitos anos para tratar diabéticos. Entre seus principais efeitos colaterais estão a ocorrência de diarreia, náuseas, dores abdominais e flatulência.

Porém, se o aumento da dose da medicação é realizado gradualmente, esses efeitos quase não ocorrem. Enquanto a vildagliptina pode ocasionalmente causar desconforto gastrointestinal, tonturas, dor de cabeça, constipação e inchaço em mãos, tornozelo ou pés.

Você deve evitar engravidar durante todo o período de estudo, utilizando contraceptivos (como a camisinha). Essa questão deve ser discutida com seu parceiro. O médico deverá mantê-la informada de qualquer notícia nova referente ao medicamento que você está usando, que afete a sua segurança. Você deverá tomar o remédio do jeito certo. Tire todas as suas dúvidas com o médico e siga as instruções dadas pelos investigadores. Você também não deve tomar outro remédio durante o tratamento, exceto o prescrito pelo médico. Caso tome, você deverá informar ao médico do estudo que usou um novo remédio.

O objetivo dessas recomendações é proteger você. Se você não respeitar essas instruções, poderá ser excluída do estudo. Se for para o seu próprio bem o médico poderá excluí-la do estudo. Além disso, os membros investigadores podem interromper a pesquisa a qualquer momento. Para seu próprio benefício físico, você deverá ser submetido a um exame físico no final do estudo. A segurança deste estudo é oferecida por atendimento gratuito no **Hospital Universitário Pedro Ernesto e na Policlínica Piquet Carneiro**. Além disso, você receberá um seguro de saúde vigente pelo tempo que você estiver participando do estudo.

Este estudo será feito de acordo com princípios estabelecidos por meio de declarações de Helsinki e EMENDAS (2000), e de acordo com as Boas Práticas Clínicas (ICH/E6). Este protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição. A confidencialidade do estudo é justificada pelo fato que o seu código de paciente (suas duas iniciais e um número sequencial) irá aparecer em todos os documentos escritos durante o estudo. Todas as informações serão processadas por um computador e poderão ser checada por autoridades de saúde, de acordo com as leis. Você pode recusar-se a participar do estudo e mesmo que decida participar, você pode desistir de continuar no estudo sem dar mais explicações. Este fato não irá afetar o tratamento e nem a relação médico e paciente. Entretanto,  **você deve comunicar sua decisão à equipe do estudo.**

**SE VOCÊ TIVER QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO, PERGUNTE AO SEU MÉDICO MAIS EXPLICAÇÕES.**

**O PACIENTE ACIMA MENCIONADO RECEBEU TODAS AS INFORMAÇÕES SOBRE O ESTUDO.**

**DATA:** \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura (**INVESTIGADOR**): \_\_\_\_\_

Assinatura (**PACIENTE**): \_\_\_\_\_

Nome (letra de forma): \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Tel. \_\_\_\_\_

Assinatura (**TESTEMUNHA**): \_\_\_\_\_

Nome (letra de forma): \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Tel. \_\_\_\_\_

## ANEXO C – Divulgação do projeto

**PROJETO GRATUITO OFERECIDO PELA UERJ.**  
**Se você é mulher, tem entre 19-50 anos,  
está obesa, urinando muito e com muita sede,  
VOCÊ PODE ESTAR COM DIABETES!**

**PROJETO DE PESQUISA**



Ou se você já é diabética e obesa,  
mas está sem tratamento,

**Marque uma consulta conosco!**

Atendimentos médicos e nutricional  
são oferecidos gratuitamente.

**Contatos: 2334-0703 (Eliza)**  
**e-mail: [projetonut@gmail.com](mailto:projetonut@gmail.com)**

Projeto de Pesquisa COPER-UERJ nº 014/2013 BioVasclUERJ