



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DA ATIVIDADE DA ADENOSINA
DEAMINASE E DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV EM
LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES
MELITO TIPO 2**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luziane Potrich Bellé

Santa Maria, RS, Brasil, 2010

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA
ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE E DIPEPTIDIL
PEPTIDASE IV EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM
DIABETES MELITO TIPO 2**

por

LUZIANE POTRICH BELLÉ

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Beatriz Moretto

Santa Maria, Rs, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA
ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE E DIPEPTIDIL PEPTIDASE
IV EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELITO TIPO 2**

elaborada por
Luziane Potrich Bellé

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maria Beatriz Moretto, Dra. (UFSM)
(Presidente/orientador)

Cristina Wayne Nogueira, Dra. (UFSM)
(1º membro da banca)

Cláudia Funchal, Dra. (IPA)
(2º membro da banca)

Santa Maria, 10 de dezembro de 2010.

Dedico este trabalho ao meu pai, a minha mãe, e ao meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça da vida. Nos méritos de minhas conquistas há muito da Tua presença. Se venci, foi porque Tu estivestes comigo! Obrigado por este momento grandioso de luz única. Pelas belezas que deixei de ver, pelas palavras que me recusei a escutar e por tudo que vi, ouvi e senti. Pelas vezes que levantei, e por quando caí. Por tudo que acertei, e pelos momentos em que falhei. Obrigado pelos momentos de dúvida e pelos problemas solucionados. Porque Tu estiveste comigo nas horas frias e nas mais calorosas, nunca me deixando só. Agradeço principalmente pela liberdade de pensar, de desejar, de querer e de optar. De não ser nada, mas de poder ter me tornado em quem realmente sou...

Aos meus pais, Arcillo e Juleica, por terem me dado a vida e por terem me ensinado a vivê-la com dignidade. Obrigada por estarem ao meu lado durante toda essa caminhada me dando força, quando em mim já não havia, e por me animarem a seguir em frente quando a vontade era abdicar. A vocês, que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação, que se dedicaram e, muitas vezes, renunciaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por me educar da melhor força possível, por ensinarem a lutar pelos meus sonhos e por torcerem por mim. Vocês foram essenciais para que eu vencesse mais esta etapa da vida. **AMO MUITO VOCÊS!!!**

Ao meu irmão, Mateus, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pela força, carinho, paciência e dedicação. Obrigada por ser essa pessoa incrível, esse irmão divertido e maravilhoso e por cuidar de mim. Enfim... Obrigada por tudo!!! Te amo irmão!

A minha orientadora, Maria Beatriz, que além de orientadora se tornou uma grande amiga. A sabedoria, o conhecimento compartilhado, a experiência transmitida e a preocupação com a minha melhor formação. Sou grata a todos esses momentos que tive a oportunidade de vivenciar ao lado daquela que me dedicou o que possui de mais valioso: seu capital intelectual. Obrigada por escutar minhas idéias, por me ensinar a evoluir, por me conduzir ao caminho do sucesso, pela amizade que surge nessa trajetória, pelo conhecimento adquirido e confiança depositada em mim, e finalmente, o meu mais sincero agradecimento pela paciência, contribuição e sabedoria. Saibas que os momentos de nossa convivência ficarão gravados em meu coração.

A minha amiga, irmã, estagiária, sub-Luzi, braço direito, braço esquerdo, enfim... a Paulinha. A esta amiga tão especial que ficou ao meu lado durante todo este período. A estagiária que estava disponível 24 horas por dia pra me ajudar e até mesmo para me animar quando eu resolvia largar tudo. Àquela escravinha que ficava até as 22h no laboratório, ajudando nas intermináveis culturas de linfócito, e no fim ainda colocava fora as amostras controle achando que não serviam pra nada. Aquela amigona adorável e divertida, com a qual eu passei momentos inesquecíveis fora e dentro do laboratório. Amiga, você merece que eu escreva esta página toda pra você, mas como não sou muito boa nessas coisas, vou resumir: obrigada pela ajuda, pela amizade, pela lealdade e por ser essa pessoa admirável, essa amiga querida e especial, e essa irmãzona. Conta sempre comigo! Te amo muito e saiba que você é a melhor estagiária do mundo!!!

A Faidinha, que mesmo estando longe do laboratório há um ano, contribuiu para que esse, e tantos outros trabalhos fossem realizados. Nossa amizade nasceu e cresceu dentro do laboratório e com certeza continuará pra vida toda. Você é uma amiga irmã muito especial. Obrigada pelos dias de alegria, pela cumplicidade, pelas ajudas e muito obrigada pela sua amizade. Amo-te do fundo do meu coração!

A Flavinha, uma amiga tão especial, um presente da vida, que mesmo estando longe, me animou e me deu força pra continuar. Amiga, muito obrigada pelo incentivo, por ser essa pessoa adorável, e por fazer parte da minha vida. ADORO VOCÊ!!!

As minhas queridas amigas Mariele e Natália, pela amizade, apoio e incentivo. Muito obrigada!

Ao Régis, muito obrigada por todas as correções de inglês, pela “big” ajuda quando a Paula e eu resolvemos pintar o laboratório e por ter se tornado um amigo querido e admirável.

A Karine, muito obrigada por todos esses anos de convivência, pelos momentos alegres e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A Gabriela e a Lariane, muito obrigada pela ajuda na conclusão deste trabalho.

A Pricila, obrigadinha!!

Ao pessoal do departamento: Angela, Marinês, Rozane, Vivi, Marli, Samira, Tici, Adolfo e José Edson, obrigada pelo apoio e também pela amizade. Obrigada por fazerem parte de minha vida durante o período em que estive no DACT. Vocês são pessoas muito especiais!

Ao professor Rafael e alunos Sílvia, Etiane, Renata, José pela colaboração.

A Base Aérea de Santa Maria, pela disponibilidade e empenho em me auxiliar nas coletas.

A Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em especial a pessoa de Eloisa Sporleder, obrigada.

Meu especial agradecimento aos pacientes com diabetes melito tipo 2, pessoas essas, que contribuíram para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível. Obrigada!!!

Ao Centro de Ciências da Saúde, ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia e a UFSM, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

As professoras Cristina Nogueira, Cláudia Funchal e Sandra Beck por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

“Na origem de todas as grandes obras, houve fermentação de sonhos, projetos e aspirações. Houve uma dedicação apaixonada àquilo que não existia, para que chegasse a existir. Houve intuição de possibilidades inéditas que lançam-se furiosamente para o futuro. Não basta ter grandes desejos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras sem ter tido grandes desejos.”

- José Comblin –

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE E DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELITO TIPO 2

Autor: Luziane Potrich Bellé

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Beatriz Moretto

Local e Data da defesa: Santa Maria, 10 de dezembro de 2010.

O diabetes melito (DM) é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia em virtude de resposta defeituosa ou deficiente à secreção de insulina. O DM tipo 2 (DM 2) está associado com a ativação do sistema imune, no qual há uma inflamação de baixo grau mediada por citocinas. A dipeptidil peptidase IV (DPP-IV, CD26) é uma protease multifuncional e na superfície celular ela encontra-se ligada a adenosina deaminase (ADA). Ambas estão envolvidas na proliferação de linfócitos e na produção de citocinas inflamatórias. A *Vitis vinifera* é uma planta que tem sido estudada devido suas propriedades farmacológicas, dentre essas, por apresentar efeitos hipoglicêmiantes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores inflamatórios, a atividade da ADA e da DPP-IV em pacientes com DM 2, e verificar o efeito do extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera* (cv. Merlot) sobre a atividade da ADA e da DPP-IV em linfócitos expostos a diferentes concentrações de glicose, in vitro. Em linfócitos, no manuscrito I observamos uma diminuição na expressão do CD26, um aumento na atividade da ADA e da n-acetil- β -d-glicosaminidase (NAG) em pacientes com DM 2 em relação aos controles, enquanto que a atividade da gamaglutamil transferase (GGT) e da DPP-IV não se alterou. Também, a atividade da NAG linfocitária em pacientes com DM 2 mostrou-se positivamente relacionada com a atividade da ADA e negativamente com a expressão do CD26 e a atividade da GGT mostrou-se positivamente relacionada à circunferência abdominal e ao IMC. Já no manuscrito II, observamos um aumento na atividade da ADA quando os linfócitos forma expostos a 100mM de glicose e este aumento foi atenuado quando, expostos a glicose e extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera*. Em soro, no manuscrito I, observamos um aumento na atividade da ADA e também nos níveis de proteína C reativa (PCR) em pacientes com DM 2. Além disso, os níveis de PCR em diabéticos mostraram-se positivamente correlacionados com a circunferência abdominal e o índice de massa corporal (IMC) desses pacientes. A atividade da GGT e da DPP-IV não mostraram diferenças entre os grupos. No entanto, a atividade da DPP-IV sérica mostrou-se correlacionada com os níveis de hemoglobina glicada nos pacientes com DM 2. Conclui-se que, a glicose possa estimular a atividade da ADA ao mesmo tempo em que provoca uma redução da expressão do CD26 em linfócitos. Além disso, o extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera* é capaz de impedir a ativação da atividade da ADA em presença de glicose possivelmente devido suas propriedades hipoglicemiantes.

Palavras-chave: diabetes melito tipo 2; linfócitos; ADA; DPP-IV; *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

Dissertation of Master Degree
Post-Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

INFLAMMATORY BIOMARKERS, ADENOSINE DEAMINASE AND DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ACTIVITIES IN LYMPHOCYTES FROM TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Author: Luziane Potrich Bellé
Advisor: Prof^a. Dra. Maria Beatriz Moretto
Date and Place: Santa Maria, December, 10th, 2010.

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia due defective or deficient response to insulin secretion. Type 2 diabetes mellitus (Type 2 DM) is therefore associated with a general activation of the innate immune system, in which there is a chronic, cytokine-mediated state of low-grade inflammation. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) is a cell-surface protease that bind with Adenosine deaminase (ADA) and both enzymes act in the lymphocytes proliferation and cytokine production. *Vitis vinifera* is a plant that has been studied due its pharmacology effects including the hypoglycemic properties. Thus, the aim of this study is to evaluate some inflammatory biomarkers, the ADA and DPP-IV activities in type 2 DM and investigate the effects of aqueous grape seed extract from *Vitis vinifera* (cv. Merlot) (GSE) in the ADA and DPP-IV activities in lymphocytes submitted to different glucose concentrations, in vitro. In the manuscript I, in lymphocytes, we observed a decrease in CD26 expression, an increase in ADA and n-acetil- β -d-glucosaminidase (NAG) activities in type 2 DM patients when compared to controls, while the gamma-glutamyl tranferase (GGT) and DPP-IV activities did not show differences between the groups. Moreover, the NAG activity demonstrated a positive correlation with ADA activity and a negative, with CD26 expression. GGT activity was positively correlated with waist circumference and body mass index (BMI), in type 2 DM. In the manuscript II, we observed we observed an increase in ADA activity when lymphocytes were exposure to the high concentration (100mM) of glucose and GSE prevented this increase in ADA activity. In serum, in the manuscript I, we showed an increase in ADA activity and in C reactive protein (CRP) levels in type 2 DM. Furthermore, the levels of CRP in diabetics were positively correlated with waist circumference and BMI. The GGT and DPP-IV activities did not show alterations between the groups, but in type 2 DM the DPP-IV activity was positively correlated with glicated hemoglobin. We concluded that, glucose might stimulated the ADA activity in the same time that it cause decrease in CD26 expression, in lymphocytes. Moreover, GSE prevents the ADA activation in presence of glucose possible due its hypoglycemic properties.

Key-words: Type 2 diabetes mellitus; lymphocytes; ADA; DPP-IV; *Vitis vinifera*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS

FIGURA 1 – Estrutura e reação catalisada pela enzima ADA	18
FIGURA 2 – Estrutura da enzima DPP-IV.....	20
FIGURA 3 – Ligação da ADA com a DPP-IV.....	22
FIGURA 4 – Estrutura do GLP-1 e sítio de ação da DPP-IV.....	23

4. MANUSCRITO I

FIGURE 1 – Expressão do CD26.....	49
FIGURE 2 – Atividades enzimáticas.....	49
FIGURE 3 – Correlações de Pearson.....	50
TABLE 1 – Características Gerais dos participantes.....	51
TABLE 2 – Parâmetros Bioquímicos.....	52
TABLE 3 – Atividade da DPP-IV.....	52
TABLE 4 – Parâmetros clínicos.....	52

5. MANUSCRITO II

FIGURE 1 – Atividade da ADA.....	63
FIGURE 2 – Atividade da DPP-IV.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM - Diabetes melito
DM 1 - Diabetes melito tipo 1
DM 2 - Diabetes melito tipo 2
GIP - Polipeptídeo insulínico dependente de insulina
GLP-1 - glucagon like peptide-1
DPP-IV – Dipeptidil peptidase IV
ADA – Adenosina deaminase
ADA 1 – isoenzima adenosina deaminase 1
ADA 2 - isoenzima adenosina deaminase 2
GSE - extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera* (cv. Merlot)
LADA - Latent autoimmune diabetes in adults
HbA1c - hemoglobina glicada
GME - glicemia média estimada
GLUT-4 – transportador de glicose
LDL – lipoproteína de densidade baixa
FDA - Food and Drug Administration
PCR – Proteína C reativa
IL-1 – Interleucina 1
IL-1 β - Interleucina 1 β
IL-2 - Interleucina 2
IL-6 – Interleucina 6
IL-12 – Interleucina 12
TNF- α - fator de necrose tumoral - α
Ado – Adenosina
dAdo – Desoxiadenosina
Ig – inumoglobulinas
GGT - γ - Glutamyltransferase
GSH – glutathiona reduzida
NAG - N-acetil- β -d-glicosaminidase
usPCR – Proteína C reativa ultra sensível
IMC – Índice de massa corporal

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
APRESENTAÇÃO.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1. Objetivo Geral.....	05
2.2. Objetivos Específicos.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	06
3.1. Diabetes melito.....	07
3.1.1. Definição, características e epidemiologia.....	07
3.1.2. Classificação.....	08
3.1.3. Diagnóstico e controle glicêmico.....	09
3.1.4. Tratamento para o Diabetes melito tipo 2.....	10
3.1.5. Diabetes melito tipo 2, inflamação e ativação do sistema imune.....	15
3.2. Adenosina deaminase.....	17
3.2.1. Relação da ADA com o Diabetes melito tipo 2.....	19
3.3. Dipeptidil peptidase IV.....	19
3.3.1. Ligação com a ADA.....	21
3.3.2. Atividade peptidase.....	22
3.3.3. Ligação com a matriz extracelular.....	23
3.3.4. CD26 solúvel.....	23
3.3.5. Relação entre DPP-IV e Diabetes melito tipo 2.....	24
3.4. γ- Glutamyltransferase.....	25
3.4.1. Relação entre a GGT e o Diabetes melito tipo 2.....	25
3.5. N-acetil-β-d-glicosaminidase.....	26
3.6. Proteína C reativa.....	26
3.6.1. Relação da PCR com o processo inflamatório no DM 2.....	26

3.7. <i>Vitis vinifera</i> e seus efeitos no DM 2.....	27
4. MANUSCRITO I.....	28
5. MANUSCRITO II.....	53
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES.....	69
8. BIBLIOGRAFIA.....	71

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos, os quais encontram-se nos itens MANUSCRITO I e MANUSCRITO II. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas estão nos manuscritos I e II e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos contidos neste trabalho.

A BIBLIOGRAFIA refere-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellito (DM) é uma desordem metabólica crônica que afeta o metabolismo de carboidratos, de gorduras e proteínas (KISS et al., 2006) e é caracterizado por hiperglicemia em virtude de resposta defeituosa ou deficiente à secreção de insulina. Esta desordem compreende uma série de sintomas, tais como: sede e fome excessivas, fraqueza muscular, perda de peso (NEGRI, 2005).

As formas mais freqüentes de diabetes são o diabetes mellito tipo 1 (DM 1) onde ocorre destruição das células beta do pâncreas, usualmente por processo auto-imune, e o diabetes mellito tipo 2 (DM 2) que é caracterizado por distúrbios da ação e secreção da insulina. À longo prazo, o estado hiperglicêmico provoca uma série de complicações cardiovasculares, renais, neurológicas e oculares (MAHDI et al., 2003). A elevação crônica de nutrientes circulantes, tais como glicose e ácidos graxos livres, desempenham um papel importante na patogênese do DM 2, contribuindo para a indução do processo inflamatório observado em vários tecidos (DONATH et al., 2010). A existência deste processo de inflamação crônica no diabetes é baseada principalmente no aumento da liberação de citocinas inflamatórias, as quais desempenham um papel importante na regulação da resposta imune, inflamação e apoptose (VAN DEN OEVER et al., 2010).

O “efeito incretina” é designado pelo aumento da secreção de insulina provocado pela ação de hormônios secretados pelo trato gastrointestinal e este efeito depende da quantidade de glicose ingerida. Desta forma, os hormônios incretinas desempenham um papel importante na regulação dos níveis de glicose pós-prandial. Os dois hormônios incretinas mais importantes são o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) e o “glucagon like peptide-1” (GLP-1) (HOLST et al., 2009). Visto que no DM 2 há uma deficiência na ação ou secreção da insulina, e que os hormônios incretinas estão envolvidos na homeostase da glicose pós-prandial, pode haver defeitos na ação, secreção ou metabolismo destes hormônios.

A dipeptidil peptidase IV (DPP-IV; CD26) é uma glicoproteína multifuncional amplamente distribuída e expressa como um homodímero ligado de forma não cova-

lente na superfície das células em quase todos os tecidos. Na superfície celular, a DPP-IV liga-se a adenosina deaminase (ADA), enzima que é responsável pela degradação de nucleotídeos tóxicos as células, e desempenha um papel importante na ativação das células T (GINÉS et al., 2002). Além disso, ambas estão envolvidas na proliferação e produção de citocinas (GORRELL et al., 2001), e estas últimas possuem um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina e no DM 2 (KING, 2008).

A *Vitis vinifera* tem sido estudada devido ao seu amplo espectro de efeitos terapêuticos e farmacológicos. O extrato de várias partes da planta tem demonstrado propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, atividade antimicrobiana, assim como efeitos cardio, hepato e neuroprotetores (NASSIRI-ASL & HOSSEINZADEH, 2009). Além disso, sabe-se que apresenta efeitos hipoglicêmicos (ORHAN et al., 2006; HOGAN et al., 2010). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar biomarcadores inflamatórios, a atividade da ADA e da DPP-IV em pacientes com DM 2, e verificar o efeito do extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera* (cv. Merlot) sobre a atividade da ADA e da DPP-IV em linfócitos submetidos a diferentes concentrações de glicose, in vitro.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade e a expressão da DPP-IV e a atividade da ADA em linfócitos de pacientes com DM 2;

Verificar o efeito do extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera* (cv. Merlot) sobre a atividade da ADA e da DPP-IV em linfócitos submetidos a diferentes concentrações de glicose, in vitro.

2.2. Objetivos Específicos

Manuscrito I

1. Determinar a atividade da adenosina deaminase e da dipeptidil peptidase IV em linfócitos e em soro;
2. Determinar a expressão do CD26 em linfócitos;
3. Determinar a atividade da gamaglutamil transferase em linfócitos e em soro;
4. Determinar a atividade da N-acetil- β -d-glicosaminidase em linfócitos;
5. Verificar os níveis de proteína C reativa em soro

Manuscrito II

6. Verificar o efeito do extrato aquoso de sementes de *Vitis vinifera* (cv. Merlot) sobre a atividade da ADA e da DPP-IV em linfócitos submetidos a condições hiperglicêmicas, in vitro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Diabetes Melito

3.1.1. Definição, características e epidemiologia

O Diabetes melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por apresentar hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (CONSENSO BRASILEIRO DE DIABETES, 2002).

Os sintomas resultantes da intensa hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes com polifagia e visão borrada. Além disso, o comprometimento do crescimento e a susceptibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005). As conseqüências dessa doença, à longo prazo, resultam de alterações micro e macrovasculares, o que pode levar a complicações crônicas que incluem retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica, neuropatia autonômica, além de doenças aterotrombóticas (LYRA et al., 2009).

O DM é um problema de importância crescente em saúde pública. Sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas, sendo a sexta causa mais freqüente de internações (CONSENSO BRASILEIRO DE DIABETES, 2002). Estima-se que o número total de pessoas com diabetes deverá aumentar de 171 milhões em 2000 para 366 milhões no ano de 2030 (WILD et al., 2004). No Brasil, a prevalência do DM é de aproximadamente 7,6% entre indivíduos com 30-59 anos, chegando a atingir cerca de 20% da população acima dos 70 anos. Cerca de 50% dessas pessoas desconhecem o diagnóstico, e 25% da população diabética não fazem nenhum tipo de tratamento (CONSENSO BRASILEIRO DE DIABETES, 2002). Além disso, na região sul a incidência do diabetes chegou a 8,5% da população (OLIVEIRA et al., 2010).

A expectativa de vida diminui de 5 a 10 anos para adultos de meia idade com diabetes e a mortalidade por doenças coronarianas aumenta 2 à 4 vezes para os pacientes com diabetes em relação aos que não apresentam a doença. O diabetes

também é a principal causa de cegueira e falência renal entre adultos e pode causar danos nos nervos periféricos podendo levar a amputações das extremidades (KRUGER, 2008).

3.1.2. Classificação

De acordo com o as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2007), o DM pode ser classificado da seguinte forma:

3.1.2.1. Diabetes melito tipo 1 (DM 1)

O DM 1, forma presente em 5%-10% dos casos, é o resultado de uma destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. Na maioria dos casos essa destruição das células beta é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM 1. A taxa de destruição das células beta é variável, sendo em geral mais rápida entre as crianças. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA).

3.1.2.2. Diabetes melito do tipo 2 (DM 2)

O DM 2 é a forma presente em 90%-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade e, raramente ocorre o desenvolvimento de cetoacidose. O DM 2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos.

3.1.2.3. Diabetes gestacional

O DM gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir

após o parto. Abrange os casos de DM e de tolerância à glicose diminuída detectados na gravidez.

3.1.2.4. Outros tipos de DM

A categoria outros tipos de DM contém várias formas de DM decorrentes de defeitos genéticos associados com outras doenças ou com uso de fármacos diabetogênicos.

3.1.3. Diagnóstico e controle glicêmico

O diagnóstico do diabetes baseia-se fundamentalmente nas alterações da glicose plasmática de jejum ou após uma sobrecarga de glicose por via oral. Para que o diagnóstico seja estabelecido, os valores devem ser confirmados em um dia subsequente (GROSS et al., 2002).

Atualmente, são três os critérios aceitos para o diagnóstico do DM:

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual (realizada a qualquer hora do dia) acima de 200mg/dL;
- Glicemia de jejum acima de 126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia;
- Glicemia de 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose, maior que 200mg/dL (Diretrizes SDB, 2007).

Na prática clínica, o controle glicêmico é feito através da utilização dos testes de glicemia e dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c). Os testes de glicemia refletem o nível glicêmico atual e instantâneo no momento exato do teste, enquanto o teste de HbA1c reflete a glicemia média pregressa dos últimos dois a quatro meses. No entanto, desde o início de 2008, dois outros parâmetros de avaliação do controle glicêmico foram desenvolvidos. São eles: a glicemia média estimada (GME) e a variabilidade glicêmica, um importante fator que vem sendo considerado como um fator de risco isolado para as complicações do diabetes, independentemente dos valores elevados de glicemia média (Diretrizes SDB, 2008).

A medida dos níveis de HbA1c é o parâmetro de escolha para o controle glicêmico a longo prazo. A percentagem de HbA1c depende da concentração de

glicose no sangue, do tempo de duração da exposição da hemoglobina à glicose e do tempo de meia vida dos eritrócitos, que é de aproximadamente 120 dias. Quanto maior a concentração de glicose e maior o período de contato, maior a percentagem da HbA1c (GROSS et al., 2002). Estudos à longo prazo têm demonstrado o papel fundamental do controle glicêmico na redução das complicações diabéticas. Para cada 1% na redução dos níveis de HbA1c, há uma diminuição de 37% nas doenças microvasculares, 14% de infarto agudo no miocárdio, 12% em acidentes vascular cerebral e 43% na doença vascular periférica (UKPDS, 1998).

A avaliação da glicemia ao longo do dia é uma estratégia importante para se obter o melhor controle metabólico possível. Os testes de glicemia podem ser realizados através da prática de auto-monitorização domiciliar através da obtenção de sangue capilar e colocação em fitas reagentes acopladas a aparelhos que fornecem os resultados em poucos segundos (Diretrizes SBD, 2008).

3.1.4. Tratamento para o Diabetes melito tipo 2

Inicialmente, no estado de pré-diabetes, e início do diabetes, a terapia através do controle da alimentação e atividade física pode ajudar a retardar ou impedir a progressão da doença. Com a progressão da doença, se faz necessário o uso de medicamentos (KRUGER, 2008). No período inicial do DM 2, caracterizado por obesidade e resistência à insulina, a melhor indicação são medicamentos que não aumentam a secreção de insulina, mas que melhorem a sensibilidade à ação hepática e periférica (músculo e adipócitos) do hormônio. Na segunda fase, com diminuição da secreção de insulina, a melhor indicação é de um secretagogo de insulina em monoterapia ou em combinação com outra droga. Na terceira fase, com a progressão da perda da secreção da insulina, torna-se necessário associar insulina basal. Por fim, quando predomina a insulinopenia, o paciente deve receber tratamento com insulina (ZAGURY & ZAGURY, 2009).

3.1.4.1. Hipoglicemiantes Orais

3.1.4.1.1. Sulfoniluréias

O tratamento com sulfoniluréias permaneceu por muitas décadas como o principal tratamento farmacológico para o DM 2, devido a sua eficácia, efeitos colaterais limitados (principalmente associados a hipoglicemia) e baixo custo (DEL PRATO & PULIZZI, 2006).

A principal ação das sulfoniluréias consiste em aumentar a liberação de insulina do pâncreas através da ligação com um receptor de sulfoniluréia na superfície das células β (KATZUNG, 2005). As sulfoniluréias são classificadas de acordo com a potência e a época em que entraram no mercado. As de primeira geração são representadas pela Clorpropamida, já que a Tolbutamida e a Acetoexamida foram retiradas do mercado. As de segunda geração dividem-se em de ação curta (Glipizida) e de ação prolongada (Glibenclamida, Glimepirida e Gliclazida) (ZAGURY & ZAGURY, 2009).

Apesar da ampla utilização destas drogas, tem crescido na última década, preocupações com o seu uso devido ao risco de hipoglicemia, ganho de peso, exaustão das células β (DEL PRATO & PULIZZI, 2006).

3.1.4.1.2. Glinidas

As glinidas, juntamente com as sulfoniluréias, são do grupo dos secretagogos de insulina (TENTOLOURIS et al., 2007). Elas atuam através da ligação em receptores diferentes das sulfoniluréias na superfície das células β pancreáticas, desencadeando a secreção de insulina sem qualquer influência na síntese. (ZAGURY & ZAGURY, 2009).

As glinidas são caracterizadas por uma duração maior da ação, produzindo uma secreção prolongada de insulina (TENTOLOURIS et al., 2007). Elas constituem uma classe relativamente nova de fármacos secretagogos, sendo seu primeiro membro foi aprovado para uso clínico em 1998. Os representantes desta classe de medicamentos são a Repaglinida e a Nateglidina (KATZUNG, 2005). Ambas são

drogas seguras e a frequência de hipoglicemias graves é reduzida (JOVANOVIC et al., 2000).

3.1.4.1.3. Biguanidas

A classe das biguanidas ou derivados da guanidina tem como representantes a Metformina, a Fenformina e a Butformina. No entanto, as duas últimas foram retiradas do mercado. A Metformina é hoje indicada como terapia de primeira linha para o tratamento do DM 2 já ao diagnóstico (ZAGURY & ZAGURY, 2009).

A Metformina reduz a hiperglicemia através da redução da gliconeogênese hepática e melhora a sensibilidade à insulina por aumentar a captação e utilização de glicose por tecidos periféricos (KURUKULASURIYA & SOWERS, 2010). Além disso, ela inibe a lipólise, aumenta a produção esplâncnica de glicose, reduz o tempo de absorção gastrointestinal da glicose, ativa os receptores de insulina, aumenta a atividade da tirosina-quinase, a translocação dos transportadores GLUT-4, a atividade da enzima glicogênio-sintetase e a síntese de óxido nítrico via ativação da proteína-quinase AMP- induzida e reduz a produção de moléculas de adesão e a apoptose endotelial melhorando a função vascular endotelial (ZAGURY & ZAGURY, 2009).

A vantagem do uso da Metformina é que ela reduz ou previne o ganho de peso, reduz os triglicérides em até 25% e o colesterol total e o LDL em até 10%, além de a hipoglicemia ser um evento raro, pois a droga não estimula a secreção de insulina (LYRA et al., 2009). Ela geralmente é bem tolerada, sendo os efeitos adversos mais comuns, os gastrointestinais (NATHAN et al., 2009).

3.1.4.1.4. Tiazolidinedionas

As tiazolidinedionas atuam ao diminuir a resistência à insulina e sua ação primária consiste na regulação nuclear dos genes envolvidos no metabolismo da glicose, dos lipídeos e na diferenciação dos adipócitos (KATZUNG, 2005). Elas são moduladores dos receptores ativados da proliferação de peroxissoma e, aumentam a sensibilidade do músculo, gordura e fígado à insulina endógena e exógena. Elas apresentam um efeito duradouro sobre o controle glicêmico e os efeitos adversos

mais comuns são ganho de peso, retenção de líquidos com edema periférico, e duplicação do risco de doença cardíaca congestiva (NATHAN et al., 2009).

Os exemplares desta classe são a Rosiglitazona e a Pioglitazona.

3.1.4.1.5. Inibidores da alfa-glicosidase

Os inibidores da alfa-glicosidase suprimem os níveis de glicose através da redução da absorção de carboidratos pelo trato gastrointestinal (KURUKULASURIYA & SOWERS, 2010).

Os representantes desta classe de medicamentos são a Acarbose, o Miglitol e a Voglibose, inibidores potentes da glicoamilase, da α -amilase e da sacarina, no entanto, apenas a Acarbose é comercializada no Brasil. Os efeitos colaterais mais freqüentes são gastrointestinais e incluem desconforto abdominal, diarréia e flatulência (ZAGURY & ZAGURY, 2009).

3.1.4.2. Insulinoterapia

A terapêutica com insulina geralmente é utilizada no final do curso do DM 2, quando o controle glicêmico não é mantido apenas pelo uso de hipoglicemiantes orais (ZAGURY & ZAGURY, 2009). No entanto, recentemente, tem-se demonstrado que a utilização de terapia intensiva de insulina no início do desenvolvimento do DM 2 induz uma glicemia normal sustentada (RETNAKARAN & DRUCKER, 2008; WENG et al., 2008).

3.1.4.3. Agonistas do GLP-1 e Inibidores da DPP-IV

As duas classes mais recentes de medicamentos aprovados para o tratamento do DM 2 são os agonistas do receptor de GLP-1 e os inibidores da DPP-IV, os quais exercem seus efeitos através dos receptores para incretinas.

O Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) é um hormônio incretina liberado na circulação após uma refeição, pelas células L do epitélio da região do íleo e do cólon do intestino. Ele atua no músculo e no fígado aumentando a sensibilidade à insulina, e também no pâncreas, estimulando a secreção de insulina dependente de glicose

e, inibindo a secreção de glucagon. Além disso, o GLP-1 promove a proliferação das células β e inibe a apoptose (TRAPP & HISADOME, 2010), reduz a liberação hepática de glicose, retarda o esvaziamento gástrico, suprime a ingestão de alimentos (apetite) e auxilia na manutenção da função fisiológica pancreática (HINNEN et al., 2006).

Os incretinomiméticos são uma nova classe de agentes farmacológicos que mimetizam alguns efeitos das incretinas endógenas, visto que o GLP-1 não pode ser utilizado clinicamente, pois é rapidamente metabolizado pela enzima DPP-IV. Para isso, desenvolveram-se análogos resistentes a esta ação (TODD & BLOOM, 2007). A Exenatide-4 foi o primeiro fármaco incretinomimético aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico. No entanto, é utilizado por administração subcutânea. A Liraglutida é outro representante desta classe (DRUCKER et al., 2010). Estudos clínicos com Exenatide e Liraglutida demonstraram efeitos sustentados nos níveis de HbA1c, redução do peso corporal e melhora na função das células β em pacientes com DM 2 (HOLST et al., 2009).

O peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) é um hormônio incretina produzido pelas células K da mucosa intestinal em resposta a ingestão de gorduras, glicose e proteínas. Ele atua provocando a liberação de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas (PFEIFFER et al., 2010).

Ambos os hormônios incretinas, GIP e GLP-1, desempenham um papel importante na secreção da insulina pós-prandial e, desta forma, na tolerância da glicose. Os inibidores da DPP-IV são drogas orais que agem aumentando e prolongando a ação desses hormônios, impedindo a sua degradação, através da inibição competitiva da enzima DPP-IV. Vildagliptin e Sitagliptin são dois representantes desta classe, que foram aprovados para uso clínico. São compostos oralmente ativos, que inibem eficientemente a atividade da DPP-IV por mais de 16 horas, possibilitando seu uso apenas uma vez ao dia (AHRÉN, 2008). Ao contrário dos incretinomiméticos, os inibidores da DPP-IV não provocam redução de peso (HOLST et al., 2009).

Em estudo realizado com a Nateglinida (outro agente inibidor da DPP-IV), ela mostrou inibir a atividade da DPP-IV e preveniu a degradação enzimática do GLP-1 (DUFFY et al., 2007). Além disso, outros compostos tais como MCB3937 e análogos

da pirrolidina, têm demonstrado serem potentes inibidores da DPP-IV (OEFNER et al., 2007; MURUGESAN et al., 2010).

3.1.5. Diabetes melito tipo 2, inflamação e ativação do sistema imune

Os Linfócitos T, assim como os monócitos, não são sensíveis a insulina e não apresentam receptores para a mesma, em condições metabólicas normais. Em estado hiperglicêmico, eles são ativados e desenvolvem receptores de insulina, sendo, desta forma, capazes de metabolizar glicose (BUFFINGTON et al., 1986; STENTZ & KITABCHI, 2005). Além disso, a hiperglicemia estimula alterações nas subpopulações de linfócitos, com aumento na contagem das células CD3+ e CD4+ em pacientes com DM 2 e este aumento está associado com a ativação e proliferação dessas células (DWORACKA et al., 2007).

No DM 2 há alterações na morfologia e diminuição da massa mitocondrial em células mononucleares, contribuindo para a ativação da inflamação nestas células (WIDLANSKY et al., 2010). Além disso, foi observado que em células T de pacientes com DM 2 há alterações na expressão de genes relacionados com metabolismo de carboidratos, sinalização da insulina e inflamação, prejudicando, desta forma, a sinalização da insulina, o transporte e metabolismo de glicose, o metabolismo lipídico e a síntese protéica (STENTZ & KITABCHI, 2007).

A obesidade apresenta um papel importante na progressão do DM 2, visto que aumenta a resistência a insulina e prejudica a eficácia do tratamento (RAMLO-HALSTED & EDELMAN, 1999). A resistência a insulina desencadeada pela obesidade está associada com a infiltração de linfócitos no tecido adiposo visceral e, desta forma, os linfócitos desempenham um papel na iniciação e perpetuação da inflamação no tecido adiposo. (ZHANG & ZHANG, 2009). A ativação do tecido adiposo pode provocar a liberação de fatores inflamatórios que fundamentam o desenvolvimento da resistência à insulina. Além disso, uma proporção significativa de indivíduos com DM 2 apresentam sobrepeso ou são obesos. Desta forma, o aumento na liberação de metabólitos derivados de adipócitos, como lipídeos, ácidos graxos e citocinas inflamatórias em indivíduos obesos, estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da resistência à insulina. Também, a inflama-

ção crônica está associada com obesidade, resistência a insulina e DM 2 (KING, 2008; ZHANG & ZHANG, 2009).

Recentemente, proteínas de fase aguda, citocinas e marcadores inflamatórios tem sido implicados na patogênese do DM 2 (DIPENTA et al., 2007). Há evidências de que a inflamação ocorre ainda durante o período de intolerância a glicose, antes do diagnóstico de DM 2 (KING, 2008). Além disso, presença de marcadores inflamatórios circulantes são fatores preditores independentes do desenvolvimento de DM 2 no futuro (FERNÁNDEZ-REAL & PICKUP, 2008).

A primeira evidência de processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas no DM 2 surgiu a partir da observação de que a hiperglicemia induz apoptose das células β . Além disso, foi detectado um grande número de células do sistema imune em ilhotas pancreáticas de pacientes com DM 2 juntamente com níveis elevados de citocinas e quimiocinas (DONATH et al., 2009). A existência de inflamação crônica no DM 2 é baseada principalmente no aumento das concentrações plasmáticas de proteína C reativa (PCR), fibrinogênio, interleucina-6 (IL-6), IL-1 e fator de necrose tumoral - α (TNF- α). As citocinas da família do TNF- α desempenham um papel importante na regulação da resposta imune, inflamação e apoptose e o TNF- α pode induzir resistência à insulina (VAN DEN OEVER et al., 2010). Além disso, os adipócitos quando ativados, liberam níveis anormais de moléculas bioativas, resultado do recrutamento de monócitos para o tecido adiposo. Com a diferenciação dos monócitos em macrófagos, inicia a liberação de uma série de fatores inflamatórios tanto a nível de tecido adiposo, como sistemicamente desencadeando o quadro inflamatório observado no estado diabético (KING, 2008; ZHANG & ZHANG, 2009).

DONATH et al., 2010 demonstraram que a autoimunidade desempenha um papel no DM 2. Esta condição tem sido descrita como uma doença de fase aguda do sistema imune inato, o qual desencadeia uma resposta de fase aguda, em resposta a um estresse metabólico. Além disso, distúrbios de origem imunológica ocorrem a partir de disfunção das células T e, recentemente, estudos indicaram que no DM 2 a resposta imune inapropriada pode ser resultado de defeito na ação da insulina a qual é necessária para a função das células T (FRANKIE & ABBAS, 2003). Mais evidências de desordens no sistema imune no DM 2 dizem respeito as dislipidemias que, além de serem características no DM 2, são uma resposta de fase aguda tanto na doença aguda como crônica (FERNÁNDEZ-REAL & PICKUP, 2008).

A exposição de ilhotas humanas e linhagens de células β a altas concentrações de glicose, *in vitro*, aumentam a produção de fatores quimiotáticos biologicamente ativos (EHSES et al., 2007). Além disso, citocinas e quimiocinas são liberadas das ilhotas expostas a estresse metabólico. Estes eventos são associados a resposta inflamatória e no DM 2 estão associados com a infiltração de células do sistema imune nas ilhotas pancreáticas (EHSES et al., 2008). Desta forma, a inflamação é possivelmente o mecanismo que liga os fatores de susceptibilidade ao desenvolvimento do diabetes (hipoatividade, envelhecimento, estresse fisiológico e tabagismo) com as ações bioquímicas causadas pela imunidade inata ativada, resultando em resistência à insulina e DM tipo 2 (FERNÁNDEZ-REAL & PICKUP, 2008).

3.2. Adenosina Deaminase (ADA; Adenosina Aminohidrolase; EC 3.5.4.4)

A ADA é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas que catalisa a desaminação hidrolítica irreversível de adenosina (Ado) à inosina e 2'-desoxiadenosina (dAdo) em 2'-desoxinosina (IBIS et al., 2007; IWAKI-EGAWA et al., 2004; POSPISILOVA et al., 2007). (Figura 1(a) e (b))

Embora esteja amplamente distribuída nos tecidos humanos, tem sido sugerido um papel importante da ADA na maturação do sistema imunológico, pois a deficiência congênita dessa enzima está associada com a imunodeficiência combinada severa (HIRSCHHORN, 1990) na qual a função dos linfócitos T e B estão prejudicadas.

A atividade da ADA é dez vezes maior em células linfocíticas em relação aos eritrócitos e é maior em linfócitos T em relação aos B, variando durante a diferenciação de células T (PIRAS et al., 1978). Apesar de mais de 90% da ADA ser intracelular, ela pode ser encontrada na superfície de linfócitos B e T, na forma de ecto-enzima (GORRELL et al., 2001).

Em humanos, a atividade da ADA aparece em duas isoformas distintas, ADA1 e ADA2. A ADA1 constitui a maior parte da ADA intracelular, é encontrada em todas as células, especialmente em linfócitos. Além disso, é a isoforma que predomina no timo, duodeno, fígado e eritrócitos. A ADA 2 é a isoenzima que predomina em monócitos e macrófagos é a principal isoforma encontrada no plasma (VAN DER WEYDEN & KELLEY, 1976; IWAKI-EGAWA et al., 2004; CRISTALI et al., 2001).

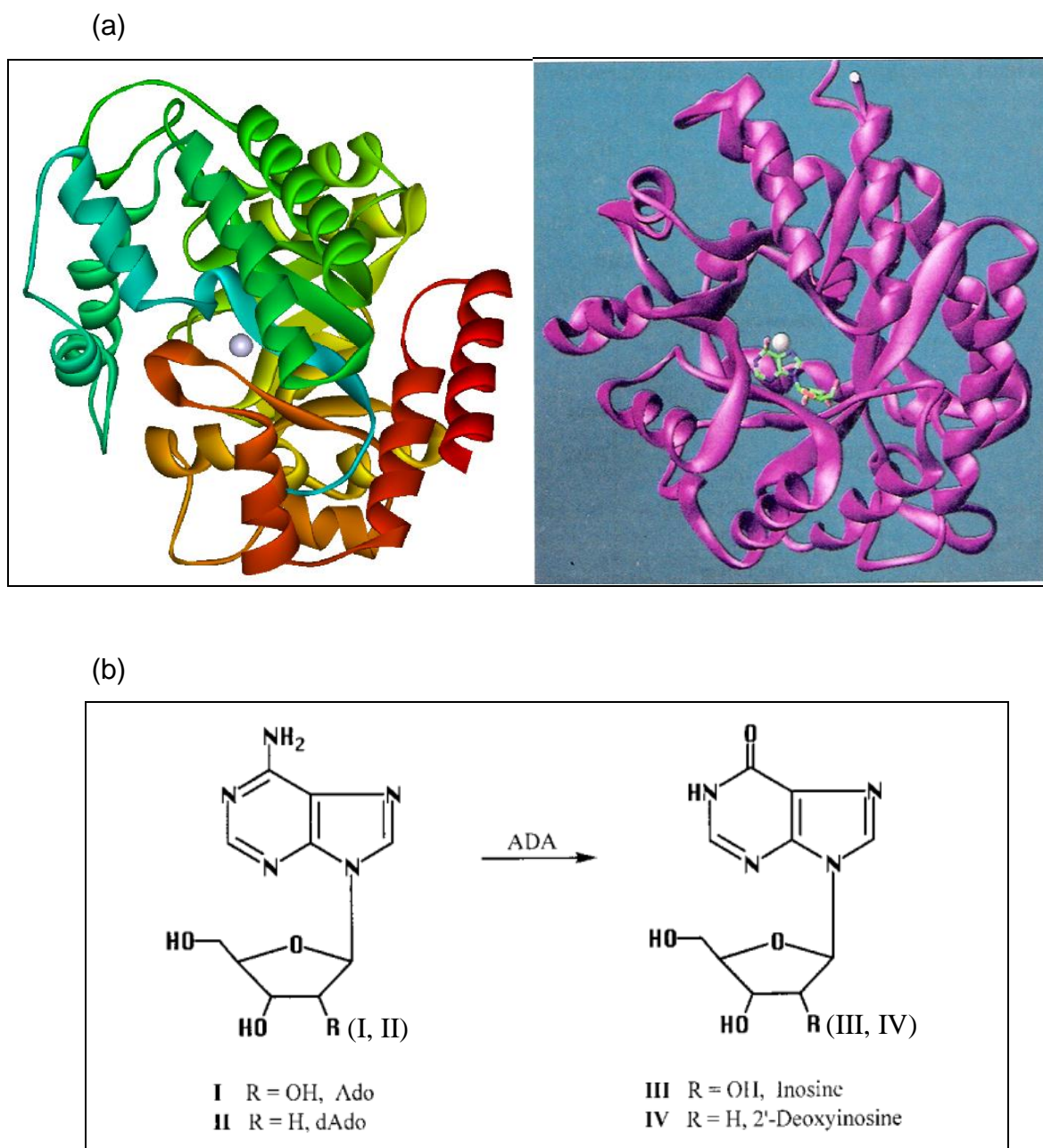


Figura 1. Representação da (a) estrutura da ADA; (b) da reação catalisada pela ADA. Ado - adenosina; dAdo - desoadenosina. (adaptado de CRISTALLI et al., 2001).

3.2.1. Relação da ADA com o Diabetes melito tipo 2

Em estudo realizado utilizando linfócitos T de ratos, foi observado que o transporte de nucleosídeos em linfócitos T é modulado pela glicose e pela insulina. A capacidade de transporte de nucleosídeos, nestas células, está diminuída em presença de altas concentrações de glicose e em ausência de insulina e está associada a diminuição dos níveis de adenosina intracelular. Desta forma, em condições que mimetizam as condições diabéticas como altas concentrações de glicose e ausência de insulina, ocorre diminuição na captação de adenosina por células T (SAKOWICZ et al., 2004) e, desta forma, aumenta a concentração de adenosina extracelular. A atividade da ADA pode se elevar uma vez que seus substratos se encontram em altas concentrações. De fato, a atividade da ADA encontra-se elevada no diabetes (PRAKASH et al., 2006; KURTUL et al., 2004) e em estudo realizado em nosso laboratório, observamos um aumento na atividade da ADA em soro de pacientes hiperglicêmicos e uma correlação positiva da atividade da ADA com os níveis de glicose plasmática (BOPP et al., 2009).

3.3. Dipeptidil Peptidase IV (DPP-IV; CD26; EC 3.4.14.5)

A DPP-IV é uma glicoproteína multifuncional tipo II de superfície celular e é membro da família das prolil oligopeptidases (ABBOTT et al., 2000). Ela apresenta 766 aminoácidos e está ancorada a bicamada lipídica por um único segmento hidrofóbico, sendo que apenas 6 aminoácidos compõe a região citoplasmática (DE MEESTER et al., 1999) (Figura 2). Atividade enzimática da DPP-IV foi encontrada em ratos, camundogos e em humanos nas células epiteliais do intestino, no rim, fígado, pulmão, timo, linfonodos, baço, próstata e em adipócitos, bem como em linfócitos e monócitos. Além disso, a DPP-IV pode também ser encontrada na forma solúvel na circulação, sendo resultado da clivagem proteolítica da forma encontrada na superfície celular (YAZBECK et al., 2009).

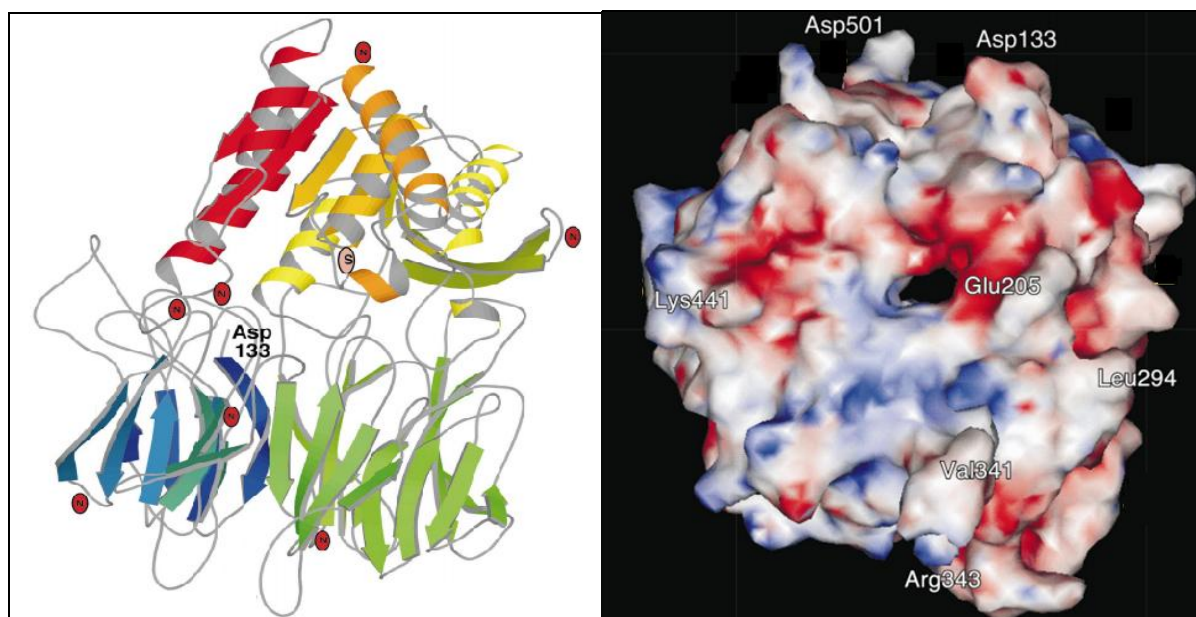


Figura 2. Representação da estrutura da DPP-IV (adaptado de GORRELL et al., 2001).

A DPP-IV também é conhecida como antígeno de superfície celular, CD26, e apresenta função co-estimulatória na resposta imune (GORRELL, 2005). Tanto a porcentagem de células que expressam CD26 como o número de moléculas por célula, estão aumentados após a ativação de células T (MARTIN et al., 1995). Além disso, o aumento na expressão de CD26 está associado com aumento na sensibilidade do antígeno, permitindo a manutenção das células T de memória (FALCIONI et al., 1996).

A DPP-IV é encontrada em todas as células T CD3+ ativadas (FOX et al., 1984), sua expressão nas células B é muito baixa (GORRELL et al., 1991) e apenas células CD4+ que coexpressam CD26 podem fornecer funções *helper* para ativar células T citotóxicas (DANG et al., 1990) e induzir a síntese de Imunoglobulinas (Ig) pelas células B (MORIMOTO & SCHLOSSMAN, 1998). As características co-estimulatórias do CD26 são aquelas que promovem um aumento nas respostas das células T a antígenos estranhos, iniciam sinais de transdução, aumentam a secreção de citocinas, aumentam a proliferação de linfócitos e induzem a diferenciação em células efetoras e promovem o aumento da função *helper* para células B e linfócitos T citotóxicos. Além disso, CD26 é um marcador para células produtoras de IL-2, e esta interleucina induz a proliferação de células T (GORRELL et al., 2001).

A CD26 na superfície das células apresenta as seguintes funções: ligação com a ADA, atividade peptidase e ligação com a matriz extracelular, sendo que essas funções podem influenciar a proliferação de células T e a quimiotaxia (GORRELL et al., 2001).

3.3.1. Ligação com a ADA

A associação da ADA com CD26 é específica e direta e esta ligação se dá com o domínio extracelular da CD26 (KAMEOKA et al., 1993). As atividades da ADA e do CD26 não são afetadas pela sua ligação, indicando que essa ligação é independente das funções catalíticas de ambas as enzimas (DE MEESTER et al., 1994; LUDWIG et al., 2004). Esta ligação ocorre apenas na superfície celular e não ocorre no interior das células, indicando que a ADA não é transportada pela CD26 através da membrana (DONG et al., 1996). Além disso, a função dessa ligação é posicionar a ADA na membrana plasmática e atuar como receptor para ADA na superfície celular (KAMEOKA et al., 1993) (Figura 3).

Devido ao fato da adenosina extracelular (substrato da ADA) inibir a proliferação das células T, a localização da ADA na superfície através da ligação com CD26, tem um papel importante na regulação da atividade imune reduzindo a concentração local de adenosina (DONG et al., 1996; DE MEESTER et al., 1999). Além disso, a associação da ADA com CD26 está envolvida na capacidade da CD26 promover proliferação de linfócitos e produção de citocinas (GORRELL et al., 2001).

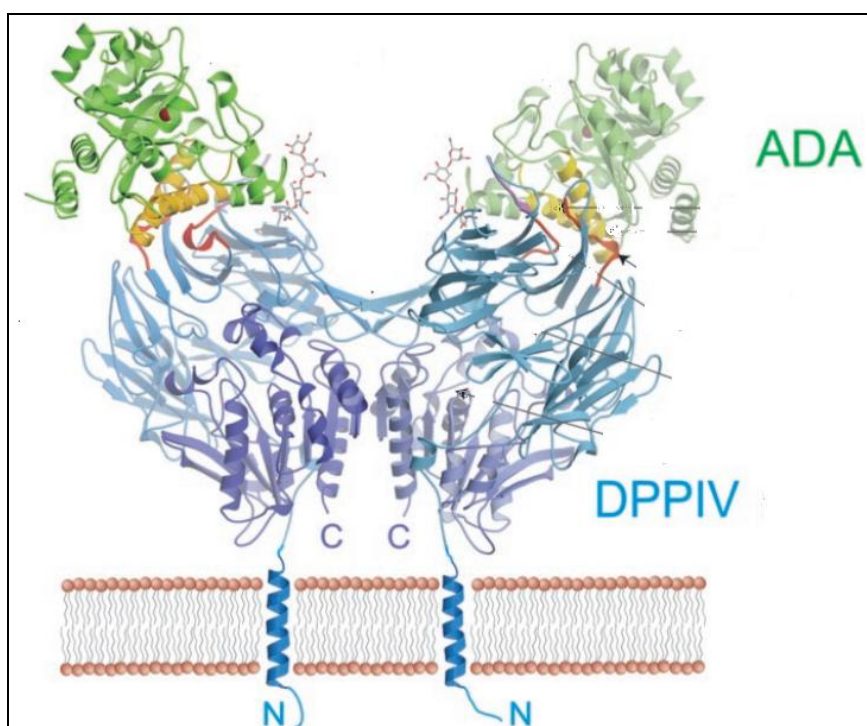


Figura 3. Representação da DPP-IV/CD26 ancorada a membrana plasmática e ligada a ADA. (adaptado de WEIHOFEN et al., 2004).

3.3.2. Atividade peptidase

Como *exo*-peptidase, a DPP-IV cliva dipeptídeos de polipeptídeos, tendo preferência por aqueles que apresentam um resíduo de prolina ou alanina na segunda posição da porção N-terminal (DE MEESTER et al., 2000) (Figura 4). Muitos peptídeos regulatórios apresentam essa sequência e sabe-se que várias quimiocinas, integrinas e neuropeptídeos são clivados por esta enzima (CORDERO et al., 2009). Dentre os substratos naturais da DPP-IV estão a substância P, a enterostatina, endomorfina 2, neuropeptídeo Y, peptídeo YY, GIP e GLP-1 (DE MEESTER et al., 1999). A clivagem destes peptídeos geralmente resulta na inativação da atividade biológica, contribuindo para os mecanismos regulatórios de muitos processos biológicos, visto que a DPP-IV é importante para digestão, controle da concentração da glicose sanguínea e desempenha um papel na migração de células T e monócitos (GORRELL et al., 2001).

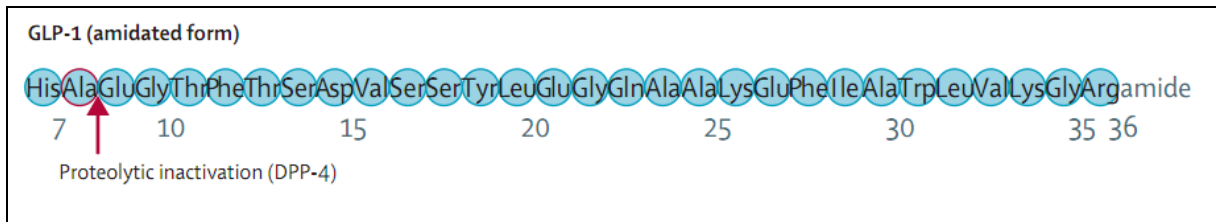


Figura 4. Demonstração do local de clivagem na estrutura do GLP-1, pela ação da enzima DPP-IV (adaptado de DRUCK & NAUCK, 2006).

3.3.3. Ligação com a matriz extracelular

A DPP-IV interage com proteínas da matriz extracelular tais como o colágeno e a fibronectina, mediando a interação entre célula e matriz extracelular (KOTACKOVÁ et al., 2009). Tem sido proposto que o CD26 atua como receptor funcional de colágeno (DE MEESTER et al., 1999) e PIAZZA et al. (1989) propuseram que a DPP-IV se liga a fibronectina e esta interação ocorre em um sítio diferente do domínio catalítico da enzima.

3.3.4. CD26 solúvel

A forma solúvel da CD26 pode ser encontrada no soro, fluido seminal, fluido pleural, bile e no rim (SHAROYAN et al., 2006) e apresenta uma considerável heterogeneidade com a forma transmembrana. Ela provém da clivagem proteolítica da CD26 presente na superfície de células que a expressam e que estejam em contato com o sangue. A CD26 solúvel também é encontrada no lúmen de grânulos secretórios do pâncreas exócrino. Desta forma, a CD26 pode ser liberada por autólise da proteína devido ao pH ácido encontrado dentro dos grânulos pancreáticos. Além disso, a forma solúvel de CD26 apresenta as seguintes funções biológicas: envolvimento no processo de ativação – desativação de algumas quimiocinas e no processo inflamatório e participa da inativação de substratos biologicamente ativos encontrados no sangue, como por exemplo, peptídeos regulatórios, fatores de crescimento ou hormônios (CORDERO et al., 2009).

3.3.5. Relação entre DPP-IV e Diabetes melito tipo 2

A DPP-IV tem sido alvo de intervenção farmacológica em pacientes com DM 2, visto que ela catalisa a inativação de vários hormônios e neuropeptídeos. PALA et al. (2003) demonstraram um aumento na atividade da DPP-IV em células endoteliais, quando expostas a altas concentrações de glicose, in vitro, e este efeito pode ter sido, em parte devido a modulação da expressão gênica pela glicose. Além disso, MANNUCCI et al. (2005) demonstraram que a hiperglicemia crônica, in vivo, leva a estimulação da atividade da DPP-IV, visto que observou uma correlação entre a variação da atividade da DPP-IV e os níveis de HbA1c e um aumento da atividade da mesma em pacientes com DM 2 que apresentavam níveis de HbA1c maiores que 8.5%. RYSKJAER et al. (2006), também observaram um aumento na atividade da DPP-IV em pacientes com DM 2, quando comparados com os sujeitos controle, e a relação entre glicemia e atividade da DPP-IV. No entanto, este aumento ocorre mesmo com valores de HbA1c menores que 8,5%.

Em modelo animal de indução de diabetes, também se pode verificar que há um aumento tanto na expressão gênica da DPP-IV nos tecidos, como na atividade da enzima circulante, além de estar relacionada com a glicemia. Estes resultados levam a crer que este aumento na atividade da DPP-IV circulante seja devido ao aumento na biossíntese da enzima e sua secreção pelas células endoteliais em altas concentrações de glicose (KIRINO et al., 2009).

A inibição específica da função peptidase da DPP-IV aumenta o tempo de meia-vida de hormônios incretinas e o aumento do tempo de ação destes hormônios pode ser utilizado para reduzir os níveis de glicose em pacientes com DM 2 (DRUCKER, 2003; AHRÉN, 2008). Além disso, evidências clínicas demonstram que inibidores da DPP-IV diminuem os níveis de glicose em pacientes com DM 2 (AHRÉN et al. 2002, D'ALESSIO et al., 2009).

3.4. γ - Glutamiltransferase (GGT; EC 2.3.2.2)

A GGT é uma proteína amplamente distribuída nos tecidos e órgãos e é encontrada nos túbulos contorcidos proximais dos rins, no corpo ciliar do olho, vesículas seminais, vilosidades do intestino delgado, no fígado, pâncreas e glândulas mamárias (LIEBERMAN et al., 1995). Além disso, ela é uma enzima encontrada na superfície de células linfóides e epiteliais (NOVOGRODSKY et al., 1976) e seu sítio ativo é extracelular. A GGT catalisa a clivagem da glutatona reduzida (GSH), transformando-a em cisteinilglicina e γ -glutamil (LIEBERMAN et al., 1995) e limita a produção de espécies reativas em células T, em resposta ao estresse oxidativo (CARLISLE et al., 2003).

3.4.1. Relação entre a GGT e o Diabetes melito tipo 2

Recentemente, estudos têm demonstrado uma associação entre os níveis de GGT com a incidência do DM 2. As alterações da GGT apresentam forte associação com marcadores de resistência à insulina e com índices de obesidade (ANDRÉ et al., 2006; GAUTIER et al., 2010; ZHANG et al., 2010). De fato, a GGT sérica é um bom fator preditor de DM 2 independente da presença de estresse oxidativo ou inflamação sistêmica (WEN et al., 2010). Além disso, a GGT e a adiponectina podem mediar os efeitos da adiposidade visceral encontrada no DM 2 (LEE et al., 2009).

No entanto, GRABER et al. (1999) demonstraram uma diminuição na atividade da GGT em células mononucleares de pacientes diabéticos.

3.2. N-acetil- β -d-glicosaminidase (NAG; EC 3.2.1.30)

A NAG é uma hidrolase ácida lisossômica, responsável pela hidrólise da ligação glicosídica beta-1-3 entre a N-acetilgalactosamina e a galactose. A NAG apresenta quatro isoenzimas, sendo as mais importantes as isoformas A (presente no compartimento intralisossomal solúvel) e B (ligada à membrana lisossomal). Ambas as isoformas A e B encontram-se no sangue e nos tecidos. (BAZZI et al., 2002).

O aumento na liberação de hidrolases ácidas tem sido encontrado em um grande número de doenças inflamatórias crônicas (GANGULY et al., 1978) e estudos tem demonstrado que a NAG pode ser um bom marcador de inflamação (IQBAL et al., 2008). Além disso, FARVID et al. (2007) sugeriram que a atividade da NAG está associada com a glicemia em diabéticos, e níveis aumentados da excreção urinária de NAG em pacientes diabéticos estão associados com complicações micro e macrovasculares (HONG et al., 2000).

3.3. Proteína C reativa (PCR)

A PCR é uma proteína plasmática da família das proteínas Pentraxin e é composta por 5 subunidades ligadas de forma não covalente (MORTENSEN, 2001; CASAS et al., 2008), Ela é uma proteína de fase aguda não específica e é sintetizada pelos hepatócitos sob estimulação de IL-6, IL-1 β e TNF- α (CASTELL et al., 1990; CASAS et al., 2008), podendo se elevar cerca de 1000 vezes durante uma resposta de fase aguda (MORTENSEN, 2001; CASAS et al., 2008).

A PCR é tradicionalmente descrita como uma molécula pró-inflamatória devido a sua habilidade de ativar a cascata do complemento e mediar a fagocitose. No entanto, seu papel é mais complexo, visto que regula muitas respostas inflamatórias, e ativa a produção de citocinas por monócitos (MORTENSEN, 2001).

3.3.1. Relação da PCR com o processo inflamatório no DM 2

O DM 2 é uma doença que apresenta um quadro de inflamação crônica de baixo grau e sabe-se que altas concentrações de PCR são um fator de risco para o desenvolvimento de DM 2 (WEN et al., 2010; YEO et al., 2010). Também em pacientes com DM 2, a PCR é um preditor de morte e doença cardiovascular. Desta forma, tem sido sugerido que a PCR não é apenas um marcador de inflamação, mas também fator preditor para o desenvolvimento do DM (DANDONA, 2008). Além disso, foi observado uma correlação positiva entre a glicose de jejum e os níveis de usPCR em pacientes com DM 2 sugerindo que a hiperglicemia leva ao aumento da atividade inflamatória no diabetes (KAEFER et al., 2010).

3.4. *Vitis vinifera* e seus efeitos no DM 2

A videira *Vitis vinifera* é originária do sul da Europa e Ásia Ocidental e hoje é cultivada em várias regiões do mundo. Os compostos ativos presentes nessa variedade de videira são os flavonóides, polifenóis, antocianinas e o resveratrol. O extrato das sementes da uva possui propriedades antioxidantes, cardio e hepatoproteoras, efeitos anti-câncer, reduz a peroxidação lipídica devido ao envelhecimento e os danos provocados por hipóxia-isquemia no cérebro de ratos (NASSIRI-ASL & HOSSEINZADEH, 2009). Além disso, o extrato de proantocianidinas encontradas nas sementes de *Vitis vinifera* evitou alterações em proteínas hepáticas envolvidas no estresse oxidativo, em danos devido a glicosilação e no metabolismo de aminoácidos após dano provocado pelo diabetes em ratos (LI et al., 2008).

Recentemente, um estudo utilizando ratos diabéticos, mostrou que o extrato das folhas de *Vitis vinifera* apresenta atividade anti-diabética e parece exercer seus efeitos através da estimulação direta da secreção de insulina ou retardo na absorção de glicose (ORHAN et al., 2006). Além disso, o resveratrol é capaz de se ligar aos receptores de sulfoniluréias, promovendo a secreção de insulina pelas células β (HAMBROCK et al., 2007), a quercetina (flavonóide encontrado na uva) previne a perda de massa das células β , e certos componentes presentes na uva reduzem as complicações provocadas pelo estado inflamatório no DM 2 (ZUNINO, 2009).

4. MANUSCRITO I

4. MANUSCRITO I

Expression of CD26 in type 2 diabetes mellitus and its association with inflammatory biomarkers

Manuscrito submetido para publicação na Revista Cell Biochemical and Biophysics

Luziane Potrich Bellé^a; Paula Eliete Rodrigues Bitencourt^a; Karine Santos de Bona^b;
Régis Adriel Zanette^a; Rafael Noal Moresco^b; Maria Beatriz Moretto^{a,b}

^a Postgraduate Program in Pharmacology

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Science

Health Science Centre

Federal University of Santa Maria (UFSM)

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

Corresponding author:

Maria Beatriz Moretto

beatriz@smail.ufsm.br

Fax: +55 - 3220 8018

ABSTRACT

Immune response and inflammation were suggested to play certain roles in the development and complications of type 2 diabetes mellitus (type 2 DM). Thus, we investigate the CD26 expression in lymphocytes; the dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), adenosine deaminase (ADA) and γ -glutamyltransferase (GGT) activities in lymphocytes and serum; N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity in lymphocytes and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels in serum of type 2 DM patients and control subjects. We observed a decrease in CD26 expression and an increase in ADA activity in type 2 DM. Although we did not observe differences in DPP-IV activity, serum DPP-IV activity from type 2 DM patients showed a positive correlation with glycated hemoglobin levels. We observed an increase in NAG activity in type 2 DM which positively correlated with ADA activity in lymphocytes and negatively with CD26 expression. Serum and lymphocyte GGT activities were not altered in type 2 DM, although both results correlated positively with body mass index and waist circumference. The hsCRP levels was also elevated in these patients. The levels of adenosine are influenced by the hyperglycemic conditions and are likely to be mediated by CD26 expression and ADA activity, which are associated with the inflammatory state in type 2 DM.

Keywords: CD26; adenosine deaminase; type 2 diabetes mellitus; inflammation; lymphocytes

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (type 2 DM) is one of the world's most important diseases and it is well established that it is caused by a combination of insulin resistance at skeletal muscle, liver and adipose tissues and impaired insulin secretion from the pancreatic islets [1]. Chronic elevation of circulating glucose level may play a role in the induction of inflammatory processes, observed within various tissues, thus initiating islet inflammation [2]. Moreover, in this hyperglycemic condition, insulin resistance and pancreatic β -cell failure might be caused by inflammatory components [3]. Type 2 DM is therefore associated with a general activation of the innate immune system, in which there is a chronic, cytokine-mediated state of low-grade inflammation [4]. Hyperglycemic conditions irreversibly alter T-cells [5], and abnormality high levels of apoptosis are observed in these cells [6]. Therefore, inflammation has been implicated as an important etiological factor in the development of both insulin resistance and type 2 DM [7].

CD26 (dipeptidyl peptidase IV; DPP-IV; adenosine deaminase binding protein; ADAbp; EC 3.4.14.5) is a multifunctional type II cell surface glycoprotein widely expressed on T, B and natural killer (NK) cells [8, 9] as well as on epithelial, endothelial and acinar cells of a variety of tissues [10, 11]. Only low levels of CD26 are found on resting lymphocytes, its expression being strongly up-regulated following activation. In addition to the integral membrane form, a soluble form of CD26 occurs in serum [12]. The soluble form present in serum is produced by proteolytic cleavage at a conserved site close to the membrane, fully preserving the structure of its catalytic site [13]. DPP-IV plays the key role in modification, processing and/or inactivation of peptides, e.g. peptide hormones, various chemokines, neuropeptides and growth factors [14]. Moreover, DPP-IV has been proposed as a target for pharmacological intervention in patients with type 2 DM. In fact, the direct inhibition of DPP-IV activity has also emerged as a new strategy for the treatment of type 2 DM, presumably via the subsequent increase in endogenous incretins [15, 16].

Another important role for CD26 is that it interacts at the cell surface with extracellular adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4), an enzyme responsible for regulating the levels of extracellular adenosine (Ado) or deoxyadenosine (dAdo), which are toxic to lymphocytes [17]. As extracellular Ado inhibits T-cell proliferation in a dose-dependent manner, it is likely that this inhibition is relieved by the localization of ecto-ADA to the cell surface by binding to CD26 [12]. An association of ecto-ADA with CD26 suggests that this enzyme may be directly involved in T-cell activation through interaction with CD26 [18]. Furthermore, it is known that ADA activity is elevated in diabetes [19], and recently we observed that ADA is increased in hyperglycemic subjects and correlates positively with glucose levels [20], suggesting that hyperglycemia could promote an activation of DPP-IV-ADA complex, and a consequent increase in ADA activity.

Recently, Pala et al. (2003) [21] demonstrated in an in vitro study that DPP-IV activity and mRNA expression were enhanced by exposure of human glomerular endothelial cells to high glucose. Further studies demonstrated that DPP-IV activity was either increased [22, 23] or decreased [24, 25] in diabetic patients. DPP-IV and ADA, two T-cell-associated enzymes, are known to have a possible interaction and play essential roles in immune system functioning. On the other hand, diabetes has been shown to be accompanied with some immune-inflammatory alterations [26, 27].

The enzyme γ -glutamyltransferase (GGT; EC 2.3.2.2) is found on many cell types, in secretory or absorptive tissues and in resting and activated human mononuclear cells [28]. Cell surface expression of GGT increases markedly with T-cell activation [29], and some studies have demonstrated that serum GGT has a role in predicting type 2 DM [30, 31]. As an inflammatory condition, excessive C-reactive protein (CRP) production is observed in type 2 DM [32], and higher serum GGT levels are strongly and positively associated with higher CRP concentrations [33]. Furthermore, N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG; EC 3.2.1.30), a lysosomal proteolytic enzyme present in high levels in activated macrophages [34], has been proposed to play a role in the pathogenesis of chronic inflammation [35].

Currently, no data is available about the CD26 expression and DPP-IV, ADA and NAG activities in lymphocytes of type 2 DM patients. In this regard, in order to make a contribution to the understanding of the ongoing immune disturbances in diabetes, the aims of this study were to investigate the CD26 expression on the

surface of lymphocytes and to evaluate the DPP-IV and ADA activities in these cells. Moreover, GGT and NAG activities in lymphocytes and hsCRP levels in serum were assessed in type 2 DM patients and compared with control subjects. In addition, routine biochemical analyses were performed in all participants.

Materials and methods

Chemicals

Adenosine was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ficoll–Histopaque, Gly-Pro- ρ -nitroanilide, ρ -toluenesulfonate and ρ -nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Conjugated monoclonal antibodies were obtained from BD Biosciences (San Diego, CA). Commercial kits were purchased from Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brazil) and Biotécnica (Varginha, MG, Brazil). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard sources.

Study population

This study was carried out with 32 fasting type 2 DM patients (10 males and 22 females) attended at the University Hospital of Santa Maria and 23 fasting control subjects (6 males and 17 females). The general characteristics of the participants are shown in Table 1. All subjects were interviewed and gave written informed consent to participate in this study. The research has been carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association and has been approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria under protocol number 23081.004068-76. Anthropometric measurements with emphasis to clinical markers of adiposity were obtained. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (in kg) by height (in m²). Waist circumference (cm) was measured in average distance between the last rib and iliac crest, around the navel. Exclusion criteria included smokers, alcoholic, pregnant women, patients with

neoplastic diseases, patients using insulin, DPP-IV inhibitors or chemotherapeutic drugs.

Biochemical analyses

Blood samples were centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C and the serum was stored at -80 °C for posterior determinations. For glucose assay the samples were collected in tubes containing sodium-fluoride. Plasma glucose was measured using glucose oxidase method. Serum triglycerides, total and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, creatinine and urea were measured using commercial kits. The levels of hsCRP and HbA1c were measured by immunoturbidimetric method on Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer.

Isolation of lymphocytes from human blood

Lymphocytes were isolated from human blood collected in Vacutainer tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) containing lithium-heparin and separated on Ficoll–Histopaque density gradients, as described by Böyum (1968) [36]. Cell number and viability were determined by trypan blue exclusion. Final cell suspension was performed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and cell concentration was adjusted to 10⁶ cells/mL. At about 3 x 10⁵ cells/mL were used for each analysis.

Flow cytometry analysis of CD26

An aliquot of 100µL of lymphocyte suspension (nine type 2 DM patients and 12 control subjects) was incubated with the appropriate volume of phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody (anti-CD26) for 20 min, at 4 °C, in the dark. The cell suspension was fixed in 1% paraformaldehyde. Samples were analyzed after 24 h by FACS Calibur flow cytometer using Cell quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA). In order to confirm the identity of T-cells, isothiocyanate (FITC)-anti-CD3 and PE-anti-CD26 were used to mark some control samples (six non-participants of this study), since CD26 is also found on all activated normal human CD3+ T-cells [37], and the expression of CD26 on B-cells is very low [38]. Moreover, anti-CD26 does not

bind with the DPP-IV-like protein on monocytes surface [39]. The values were expressed as percentage of total cells and at least 10,000 gated events were counted in the previously defined lymphocyte gate.

ADA activity assay

ADA activities were measured spectrophotometrically in serum and in lymphocyte suspension by the method of Giusti (1974) [40], with minor modifications as described by Abdalla et al. (2010) [41].

DPP-IV activity assay

Serum DPP-IV activity was determined according to Jarmolowska et al. (2007) [42], with some modifications. Briefly, serum was added to the reaction mixture containing 0.3M Gly/NaOH buffer (pH 8.7) and 1mM of Gly-Pro ρ -nitroanilide ρ -toluenesulfonate. After 30 min of incubation at 37 °C, the reaction was quenched by adding chilled 1 M acetate buffer (pH 4.2). Absorbance was measure at 405 nm and 3 mM of ρ -nitroanilide was used as standard. The values were expressed in U/L.

Lymphocyte DPP-IV activity was determined as described by Schön et al. (1984) [43]. Approximately 3×10^5 cells/mL were incubated with 0.6 mM of Gly-Pro ρ -nitroanilide ρ -toluenesulfonate for 120 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 1 M of acetate buffer (pH 4.5) Absorbance was measured at 390 nm and 0.5 mM of ρ -nitroanilide was used as standard. The values were expressed in U/L.

NAG activity assay

The NAG activity in lymphocyte suspension was determined as described by Xavier et al. (2010) [44], with some modifications. Briefly, 3×10^5 cells/mL were centrifuged (3000 x g; 10 min) at 4 °C, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 and then centrifuged again. Samples of the resulting supernatant were incubated with ρ -nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide (pH 4.5) for 10 min at 37 °C and the reaction was quenched by the addition of glycine buffer (pH 10.6). The extent of

hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. ρ -nitrophenol was used as standard. The values were expressed in $\mu\text{mol/L}$.

GGT activity assay

Serum and lymphocyte GGT activities were measured using commercial kits.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's *t* test for independent samples. Correlation was evaluated by Pearson's test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses. All data were expressed as mean \pm SEM.

Results

Biochemical parameters

A significant increase in the fasting plasma glucose, HbA1c levels and serum triglycerides of type 2 DM patients was observed when compared with control subjects. No significant differences were observed in the levels of HDL, LDL and total cholesterol, serum urea and creatinine between the groups (Tables 1 and 2).

CD26 expression

There was no difference in the CD26 expression when we used PE-anti-CD26+ alone or in combination with FITC-anti-CD3+ to label the cells (data not shown), which demonstrate that all CD3+ T-cells express CD26 on their surface. Therefore, we observed a decrease in CD26 expression in lymphocytes of type 2 DM patients when compared to controls (all samples were labeled only with PE-anti-CD26+) (Fig.1).

ADA activity

An increase in ADA activity was observed both in serum (Table 2) and in lymphocyte suspension (Fig. 2A) in type 2 DM patients when compared to control subjects.

DPP-IV activity

No differences in DPP-IV activity were observed between type 2 DM patients and control subjects in both serum and lymphocytes (Table 2; Fig. 2B). However, serum DPP-IV activity in type 2 DM patients showed a positive correlation with HbA1c levels (Fig. 3A; $r=0.3696$; $P < 0.05$), and despite the cut off for HbA1c levels of 7% recommended by American Diabetes Association, we observed an increase in serum DPP-IV activity in patients with $HbA1c \geq 7.2\%$ ($n=17$), when compared with those with less than 7.2% ($n=15$) (Table 3).

NAG activity

Lymphocyte NAG activity was increased in type 2 DM patients when compared to control subjects (Fig. 2C). Moreover, we found a negative correlation between CD26 expression and lymphocyte NAG activity (Fig. 3B; $r=-0.7133$; $P < 0.05$) and a positive correlation with lymphocyte ADA activity (Fig. 3C; $r=0.4272$; $P < 0.05$) in type 2 DM patients.

GGT activity

There were no differences between both serum and lymphocyte GGT activities in type 2 DM patients and control subjects (Table 2; Fig. 2D). Moreover, lymphocyte GGT activity in type 2 DM patients correlated positively with BMI (Fig. 3D; $r=0.5309$; $P < 0.01$) and waist circumference (Fig. 3E; $r=0.5627$; $P < 0.01$).

hsCRP levels

Serum hsCRP levels were increased in type 2 DM patients when compared with control subjects (Table 2). Moreover, when compared with the duration of diagnosed diabetes, we observed that patients with more than 5 years of disease have decreased hsCRP levels (Table 4). We also observed a positive correlation between hsCRP levels and BMI (Fig. 3F; $r=0.6738$; $P < 0.0001$) and waist circumference (Fig. 3G; $r=0.4714$; $P < 0.05$) in type 2 DM patients.

Discussion

CD26 expression and ADA and DPP-IV activities in lymphocytes

It is known that in type 2 DM there is a low-grade systemic inflammation and this state is accompanied by the activation of T-cells and macrophages [4]. Additionally, in vitro studies have confirmed the role of hyperglycemia in activating human T-lymphocytes [5]. In fact, the hyperglycemic state of type 2 DM is known to trigger the production of multiple proinflammatory cytokines, induce cytotoxic and helper T-cell proliferation and activate immune responses in T-cells and monocytes [26].

In our study, we observed a decrease in CD26 expression in lymphocytes of type 2 DM patients (Fig. 1), although DPP-IV activity was not altered when compared with control subjects (Fig. 2B). Furthermore, ADA activity was higher in the lymphocytes of type 2 DM patients (Fig. 2A). Recently, Matteucci et al. (2010) [45] demonstrated that the fluorescence intensity of CD26 expression on CD8+ lymphocytes revealed a decrease in type 1 DM. Decreased CD26 expression was also found in T lymphocytes of patients with inflammatory diseases [46, 47]. The mechanism underlying T-cell dysfunction has been attributed to the accumulation of toxic purine substrates and metabolites, which interferes with T-cell activation and proliferation [18]. The sequestration of local Ado by ecto-ADA may ensure efficient

early activation events in T-cell response [48]. ADA bound to CD26 has an enzymatic role in protecting T-cells from an Ado-mediated inhibition of proliferation [12]. Thus, the high ADA activity showed in our study may be a compensatory mechanism to degrade the toxic Ado. In fact, Ado acts at the cell surface to produce down-regulation of the DPP-IV protein and these effects persist after the Ado degradation [49]. Moreover, the reduction of CD26 expression might be related to the ADA binding and to the extracellular matrix binding [12], which can influence T-cell proliferation and chemotaxis, since the increase in ADA activity may reflect this modulation. Moreover, CD26-ecto-ADA regulation does not always correlate for both proteins. In fact, the presence of ADA molecules which does not colocalize with CD26 is observed in all activation conditions, and recent results showed that Ado receptor A_{2B} could be largely responsible for the ADA presence on CD26-lymphocytes [50]. As CD26, being an ADA binding protein (ADAbp), functions as a receptor for ADA on lymphocytes, it is likely to contribute to the mechanism of the CD26 complex. Conversely, as we did not observe costimulatory activity (low CD26 expression), it is possible to suggest that this would be due to the normal DPP-IV activity observed in type 2 DM patients, since the costimulatory activity of the CD26 antigen requires DPP-IV enzymatic activity in DPP-IV-transfected Jurkat T-cell lines [51].

Inosine, a product of Ado degradation by ADA, at high concentrations, has been shown to inhibit inflammatory cytokine production [52] and decrease the production of TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-12 in monocytic cell lines [53]. Therefore, the reduction of CD26 expression might be explained by the reduction in interleukin production mediated by high levels of Ado, since IL-12 up-regulates the expression of CD26 at the cell surface [50]. Meanwhile, chronic elevation of circulating glucose contributes to the induction of inflammatory process and IL-1 β production [26]. Takasawa et al. (2010) [54] showed that proinflammatory cytokines such as TNF- α or IL-1 β reduced the expression of CD26 in microvascular endothelial cells, and Busso et al. (2005) [55] found a negative association between CD26 and inflammation. Yazbeck et al. (2009) [56] demonstrated that DPP-IV inhibitors possess anti-inflammatory properties, and Schmiedl et al. (2010) [57] reported anti-inflammatory effects mediated by CD26 deficiency in rats. Consequently, the reduction of CD26

expression is also likely to be a compensatory mechanism to exert anti-inflammatory effects.

Serum ADA and DPP-IV activities

We observed an increase in ADA activity in serum of type 2 DM patients in comparison to the control subjects (Table 2). It is known that ADA activity is elevated in diabetic [58, 19] and hyperglycemic subjects [20]. Moreover, increased amounts of Ado are formed in several tissues of diabetic rats [59]. Our findings suggest that ADA activity may play a role in glycemic control and can be elevated due to the high concentrations of Ado, which increase sensitivity to insulin [58].

No difference in serum DPP-IV activity was found between control subjects and type 2 DM patients (Table 2), but long-term exposure to changes in glycemia can alter DPP-IV activity, as indicated by the positive correlation between changes in HbA1c levels and serum DPP-IV activity (Fig. 3A). Mannucci et al. (2005) [22] reported that significant elevations in DPP-IV activity first become apparent when HbA1c levels increase above 8.5%. We found a significant elevation in DPP-IV activity in type 2 DM patients when HbA1c levels were higher than 7.2%, showing that DPP-IV activity is likely to be elevated with HbA1c levels from this value (Table 3). Our results are in accordance with Ryskjaer et al. (2006) [23], who reported an elevation of DPP-IV activity in type 2 DM patients with HbA1c levels below 8.5%.

NAG and GGT activities and hsCRP levels

Several studies showed alteration in GGT activity and its association with type 2 DM [30, 31], but we did not observe differences in serum and lymphocyte GGT activity among the studied groups (Table 2; Fig. 2D). However, lymphocyte GGT activity positively correlated with waist circumference and BMI (Fig. 3D, E). Therefore, GGT activity is likely to play a role only to predict type 2 DM, where the values tend to normalize after the disease development, but continue associated with obesity and abdominal adiposity.

Moreover, we observed that hsCRP levels were higher in type 2 DM patients when compared to control subjects (Table 2), and correlated positively with waist

circumference and BMI (Fig. 3F, G). CRP, an acute phase reactant, widely used as a marker of cardiovascular disease, has been suggested to have a direct proinflammatory effect, and our results confirm the association with inflammation and obesity in type 2 DM.

We also observed an increased NAG activity in lymphocytes from type 2 DM when compared with control subjects (Fig. 2C). In fact, the release of acid hydrolases has been shown in a number of inflammatory processes [60, 44]. We hypothesized that NAG activity might be a marker of inflammatory condition in type 2 DM. The positive correlation with ADA activity in lymphocytes (Fig. 3C) reinforces this hypothesis, whereas the negative correlation with CD26 expression (Fig. 3B) confirms the inverse relationship between CD26 and inflammation cited above.

In conclusion, this is the first report showing that the CD26 expression is reduced in type 2 DM subjects when compared with the controls, at the same time that ADA activity is increased in lymphocytes. The levels of Ado suffered from the effects of glycemic conditions in serum and lymphocytes. In addition, the alterations and correlations of the inflammation biomarkers observed in the diabetic group demonstrated that obesity and inflammatory processes are closely implicated in diabetes pathogenesis. The other significant point was the correlation observed between NAG and ADA activity, as well as between lymphocyte GGT activity with waist circumference and BMI, which could contribute to indicate the inflammatory condition in these patients. Therefore, the present data can at least in part contribute to the comprehension of the biochemical mechanisms involved with the processes occurring in type 2 DM.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants, Biotécnica (Varginha, MG, Brazil) for providing biochemical reagents and Eloisa Sporleder (Laboratório de Imunologia of Santa Casa de Misericórdia of Porto Alegre, RS, Brazil). The first author also wishes to thank CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship.

References

1. Stumvoll, M., Goldstein, B.J., van Haeften, T.W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365,1333-1346.
2. Donath, M.Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Halban, P.A., Ehses, J.A. (2010). Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol Metab*, 21, 261-267.
3. Mandrup-Poulsen, T., Pickersgill, L., Donath, M.Y. (2010). Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 6, 158-166.
4. Fernández-Real, J.M., Pickup, J.C. (2008). Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 10-16.
5. Stentz, F.B., Kitabchi, A.E. (2005). Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.*, 335, 491-495.
6. Giordano, C., Stassi, G., Todaro, M., De Maria, R., Richiusa, P., Scorsone, A., Giordano, M., Galluzzo, A. (1995). Low bcl-2 expression and increased spontaneous apoptosis in T-lymphocytes from newly-diagnosed IDDM patients. *Diabetologia*, 38, 953-958.
7. Greenfield, J.R., Campbell, L.V. (2006). Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'? *Curr Diabetes Rev*, 2, 195-211.
8. Bühling, F., Junker, U., Reinhold, D., Neubert, K., Jäger, L., Ansorge, S. (1995). Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol Lett*, 4, 47-51.
9. Fleischer, B., Sturm, E., De-Vries, J.E., Spits, H. (1988). Triggering of cytotoxic T lymphocytes and NK cells via the T_H103 pathway is dependent on the expression of the T cell receptor/CD3 complex. *J Immunol*, 141, 1103-1107.
10. Dinjens, W.N., ten-Kate, J., van-der-Linden, E.P., Wijnen, J.T., Khan, P.M., Bosman, F.T. (1989). Distribution of adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in human tissues. *J Histochem Cytochem*, 37, 1869-1875.
11. McCaughan, G.W., Wickson, J.E., Creswick, P.F., Gorrell, M.D. (1990) Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence. *Hepatology*, 11, 534-544.
12. Gorrell, M.D., Gysbers, V., McCaughan, G.W. (2001). CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 54, 249-264.

13. Pereira, D.A., Gomes, L., El-Cheikh, M.C., Borojevic, R. (2003). Dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity in the hematopoietic system: differences between the membrane-anchored and the released enzyme activity. *Braz J Med Biol Res*, 36, 567-578.
14. Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*, 85, 9-24.
15. Drucker, D.J. (2003). Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*, 12, 87-100.
16. Green, B.D., Gault, V.A., O'harte, F.P., Flatt, P.R. (2004). Structurally modified analogues of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) as future antidiabetic agents. *Curr Pharm Des*, 10, 3651-3662.
17. Dong, R.P., Kameoka, J., Hegen, M., Tanaka, T., Xu, Y., Schlossman, S.F., Morimoto, C. (1996). Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J Immunol*, 156, 1349-1355.
18. Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S.F., Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*, 261, 466-469.
19. Prakash, M.S., Chennaiah, S., Murthy, Y.S.R., Anjaiah, E., Ananda Rao, S., Suresh, C. (2006). Altered Adenosine Deaminase Activity in Type 2 Diabetes Mellitus. *J IACM*, 7, 114-117.
20. Bopp, A., De Bona, K.S., Bellé, L.P., Moresco, R.N., Moretto, M.B. (2009). *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundam Clin Pharmacol*, 23, 501-507.
21. Pala, L., Mannucci, E., Pezzatini, A., Ciani, S., Sardi, J., Raimondi, L., Ognibene, A., Cappadona, A., Vannelli, B.G., Rotella, C.M. (2003). Dipeptidyl peptidase-IV expression and activity in human glomerular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 28-31.
22. Mannucci, E., Pala, L., Ciani, S., Bardini, G., Pezzatini, A., Sposato, I., Cremasco, F., Ognibene, A., Rotella, C.M. (2005). Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 48, 1168-1172.
23. Ryskjaer, J., Deacon, C.F., Carr, R.D., Krarup, T., Madsbad, S., Holst, J., Vilsbøll, T. (2006). 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*, 155, 485-493.
24. McKillop, A.M., Duffy, N.A., Lindsay, J.R., O'Harte, F.P., Bell, P.M., Flatt, P.R. (2008). Decreased dipeptidyl peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1(7-36)amide degradation in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract*, 79, 79-85.

-
25. Meneilly, G.S., Demuth, H.U., McIntosh, C.H., Pederson, R.A. (2000). Effect of ageing and diabetes on glucose-dependent insulinotropic polypeptide and dipeptidyl peptidase IV responses to oral glucose. *Diabet Med*, 17, 346-350.
26. Donath, M.Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Ehse, J.A. (2009). Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)*, 24, 325-331.
27. King, G.L. (2008). The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*, 79, 1527-1534.
28. Grisk, O., Küster, U., Ansorge, S. (1993). The activity of gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GT) in populations of mononuclear cells from human peripheral blood. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 374, 287-290.
29. Henson, S.E., Nichols, T.C., Holers, V.M., Karp, D.R. (1999). The ectoenzyme gamma-glutamyl transpeptidase regulates antiproliferative effects of S-nitrosoglutathione on human T and B lymphocytes. *J Immunol*, 163, 1845-1852.
30. André, P., Balkau, B., Born, C., Charles, M.A., Eschwège, E., D.E.S.I.R. study group. (2006). Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. *Diabetologia*, 49, 2599-2603.
31. Wen, J., Liang, Y., Wang, F., Sun, L., Guo, Y., Duan, X., Liu, X., Wong, T.Y., Lu, X., Wang, N. (2010). C-reactive protein, gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes in a Chinese population. *Clin Chim Acta*, 411, 198-203.
32. Zinman, B., Hanley, A.J., Harris, S.B., Kwan, J., Fantus, I.G. (1999). Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 272-278.
33. Lee, D.H., Jacobs, D.R. Jr. (2005). Association between serum gamma-glutamyltransferase and C-reactive protein. *Atherosclerosis*, 178, 327-330.
34. Campos, P.P., Bakhle, Y.S., Andrade, S.P. (2008). Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. *Wound Repair Regen*, 16, 416-424.
35. Reiner, R.G., Tanner, A.R., Keyhani, A.H., Wright, R. (1981). A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clin Exp Immunol*, 43, 376-380.
36. Böyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest*, 97, 77-89.
37. Fox, D.A., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Acuto, O., Poole, C., Palley, L., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L. (1984). Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. *J Immunol*, 133, 1250-1256.

-
38. Gorrell, M.D., Wickson, J., McCaughan, G.W. (1991). Expression of the rat CD26 antigen (dipeptidyl peptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes. *Cell Immunol*, *134*, 205-215.
39. Wrenger, S., Faust, J., Friedrich, D., Hoffmann, T., Hartig, R., Lendeckel, U., Kähne, T., Thielitz, A., Neubert, K., Reinhold, D. (2006). Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function. *J Leukoc Biol*, *80*, 621-629.
40. Giusti, G. (1974). Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HV (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, NY, 1974, 1092–1099.
41. Abdalla, F.H., Bellé, L.P., De Bona, K.S., Bitencourt, P.E., Pigatto, A.S., Moretto, M.B. (2010). *Allium sativum* L. extract prevents methyl mercury-induced cytotoxicity in peripheral blood leukocytes (LS). *Food Chem Toxicol*, *48*, 417-421.
42. Jarmołowska, B., Bielikowicz, K., Iwan, M., Sidor, K., Kostyra, E., Kaczmarski, M. (2007). Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides*, *28*, 678-682.
43. Schön, E., Demuth, H.U., Barth, A., Ansorge, S. (1984). Dipeptidyl peptidase IV of human lymphocytes. Evidence for specific hydrolysis of glycyproline p-nitroanilide in T-lymphocytes. *Biochem J*, *223*, 255-258.
44. Xavier, D.O., Amaral, L.S., Gomes, M.A., Rocha, M.A., Campos, P.R., Cota, B.D., Tafuri, L.S., Paiva, A.M., Silva, J.H., Andrade, S.P., Belo, A.V. (2010). Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother*, *64*, 220-225.
45. Matteucci, E., Ghimenti, M., Consani, C., Di Beo, S., Giampietro, O. (2010). About CD26 CD8 lymphocytes in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol*, *71*, 123-124.
46. Bock, O., Kreiselmeyer, I., Mrowietz, U. (2001). Expression of dipeptidyl-peptidase IV (CD26) on CD8+ T cells is significantly decreased in patients with psoriasis vulgaris and atopic dermatitis. *Exp Dermatol*, *10*, 414-419.
47. Wong, P.T., Wong, C.K., Tam, L.S., Li, E.K., Chen, D.P., Lam, C.W. (2009). Decreased expression of T lymphocyte co-stimulatory molecule CD26 on invariant natural killer T cells in systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest*, *38*, 350-364.
48. Jeanfavre, D.D., Woska, J.R. Jr., Pargellis, C.A., Kennedy, C.A., Prendergast, J., Stearns, C., Reilly, P.L., Barton, R.W., Bormann, B.J. (1996). Effect of deoxycoformycin and Val-boroPro on the associated catalytic activities of lymphocyte CD26 and ecto-adenosine deaminase. *Biochem Pharmacol*, *52*, 1757-1765.

-
49. Tan, E.Y., Mujoomdar, M., Blay, J. (2004). Adenosine down-regulates the surface expression of dipeptidyl peptidase IV on HT-29 human colorectal carcinoma cells: implications for cancer cell behavior. *Am J Pathol*, 165, 319-330.
50. Cordero, O.J., Salgado, F.J., Fernández-Alonso, C.M., Herrera, C., Lluís, C., Franco, R., Nogueira, M. (2001). Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 70, 920-930.
51. Tanaka, T., Kameoka, J., Yaron, A., Schlossman, S.F., Morimoto, C. (1993). The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4586-4590.
52. Hasco, G., Kuhel, D.G., Nemeth, Z.H., Mabley, J.G., Stachlewitz, R.F., Virag, L., Lohinai, Z., Southan, G.J., Salzman, A.L., Szabo, C. (2000). Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*, 164, 1013–1019.
53. Desrosiers, M.D., Cembrola, K.M., Fakir, M.J., Stephens, L.A., Jama, F.M., Shameli, A., Mehal, W.Z., Santamaria, P., Shi, Y. (2007) Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol*, 179, 1884-1892.
54. Takasawa, W., Ohnuma, K., Hatano, R., Endo, Y., Dang, N.H., Morimoto, C. (2010). Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates microvascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* [Epub ahead of print]
55. Busso, N., Wagtmann, N., Herling, C., Chobaz-Péclat, V., Bischof-Delaloye, A., So, A., Grouzmann, E. (2005). Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Pathol*, 166, 433-442.
56. Yazbeck, R., Howarth, G.S., Abbott, C.A. (2009). Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci*, 30, 600-607.
57. Schmiedl, A., Krainski, J., Schwichtenhövel, F., Schade, J., Klemann, C., Raber, K.A., Zscheppang, K., Beekmann, T., Acevedo, C., Glaab, T., Wedekind, D., Pabst, R., von Hörsten, S., Stephan, M. (2010). Reduced airway inflammation in CD26/DPP4-deficient F344 rats is associated with altered recruitment patterns of regulatory T cells and expression of pulmonary surfactant proteins. *Clin Exp Allergy* [Epub ahead of print]
58. Kurtul, N., Pence, S., Akarsu, E., Kocoglu, H., Aksoy, Y., Aksoy, H. (2004). Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 47, 33-35.
59. Pawelczyk, T., Podgorska, M., Sakowicz, M. (2003). The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. *Mol Pharmacol*, 63, 81-88.

60. Ganguly, N.K., Kingham, J.G., Lloyd, B., Lloyd, R.S., Price, C.P., Triger, D.R., Wright, R. (1978). Acid hydrolases in monocytes from patients with inflammatory bowel disease, chronic liver disease, and rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1, 1073-1075.

Legends

Fig. 1. Expression of CD26 in lymphocytes of type 2 DM patients and control subjects. Data are presented as mean \pm SEM. Asterisk represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$).

Fig. 2. Lymphocyte enzymes of type 2 DM patients and control subjects. (A) ADA activity; (B) DPP-IV activity; (C) NAG activity; (D) GGT activity. Data are expressed as mean \pm SEM. Asterisk represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$).

Fig. 3. Pearson's correlations between (A) serum DPP-IV and HbA1c levels; (B) CD26 expression and NAG activity in lymphocytes; (C) ADA activity and NAG activity in lymphocytes; (D) GGT activity in lymphocytes and BMI; (E) GGT in lymphocytes and waist circumference; (F) serum hsCRP levels and BMI; (G) serum hsCRP levels and waist circumference.

Figure 1.

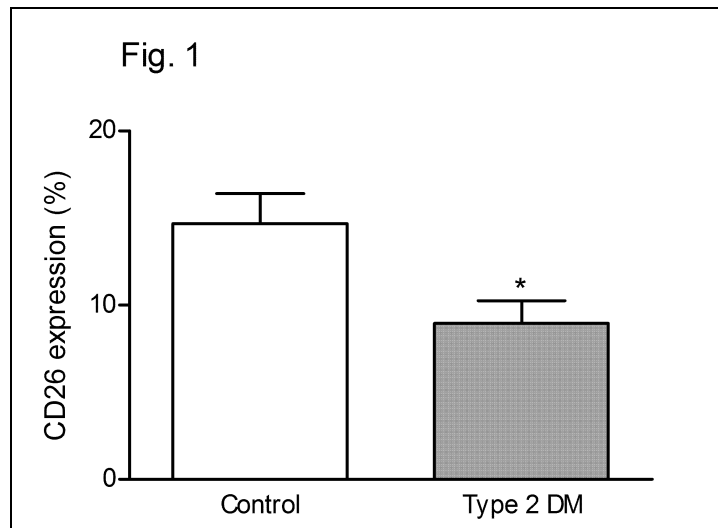


Figure 2.

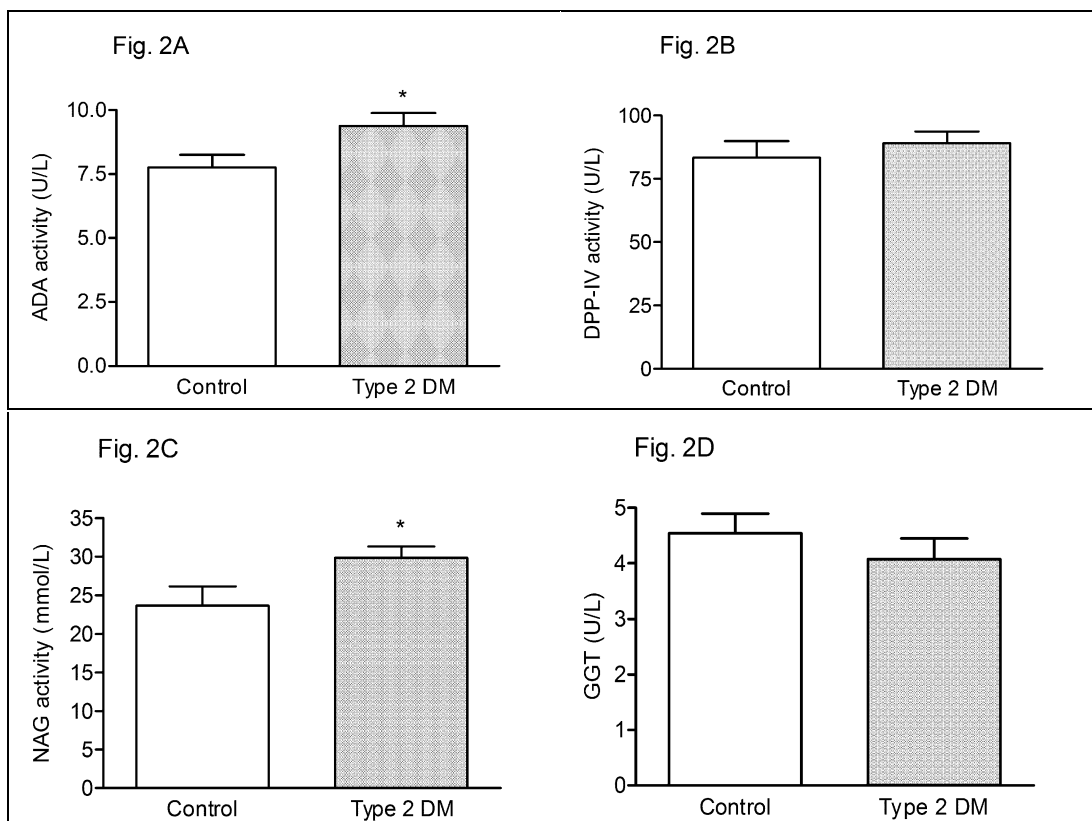


Figure 3.

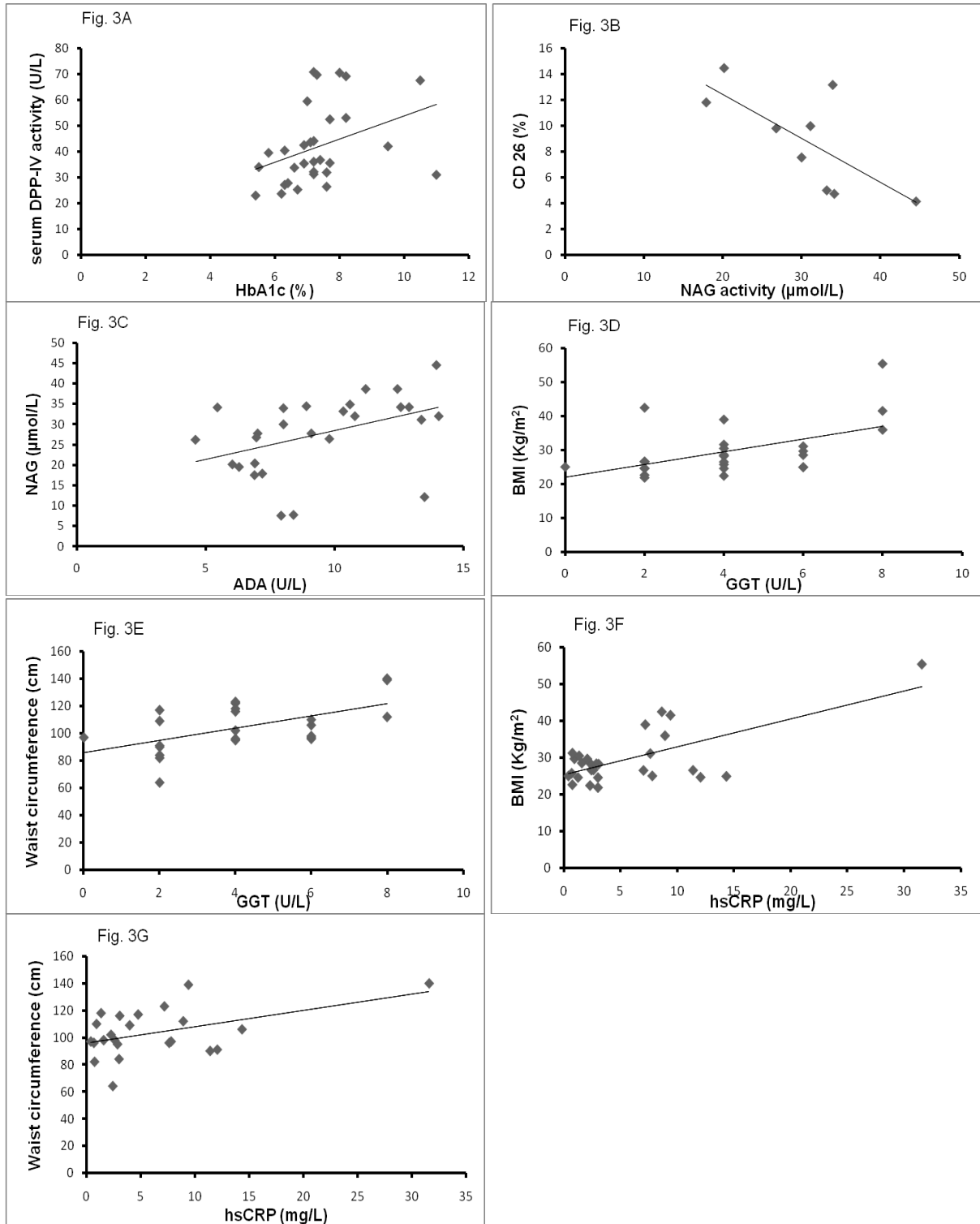


Table 1

General characteristics of the participants.

	Control subjects	Type 2 DM
N	23	32
Age (years)	49.05±2.35	60.39±2.04**
BMI (Kg/m²)		
Male	26.71±1.27	30.04±1.83
Female	24.05±0.70	29.35±1.74*
Waist circumference (cm)		
Male	110.50±2.26	104.30±6.97
Female	92.47±2.32	104.80±3.89
Fasting plasma glucose (mg/dL)	83.57±1.87	163.20±13.27***
HbA1c (%)	5.00±0.17	7.36±0.22***
Duration of diagnosed type 2 DM		
≤ 5 years		n=16
6 to 15 years		n=16
Medication		
Oral hypoglycemic agents (%)		93.75
Antihypertensive agents (%)		59.37
Lipid-lowering agents (%)		18.75
For heart complications (%)		18.75

Results are expressed as mean ±SEM; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.0001 vs. control subjects

Table 2

Serum biochemical parameters.

	Control subjects	Type 2 DM
Triglycerides (mg/dL)	96.57±10.80	142.20±9.83**
Total cholesterol (mg/dL)	197.50±8.51	208.70±10.76
HDL cholesterol (mg/dL)	53.86±3.04	47.67±1.86
LDL cholesterol (mg/dL)	117.30±8.07	129.6±10.19
Urea (mg/dL)	28.55±1.68	32.16±1.82
Creatinine (mg/dL)	0.75±0.02	0.81±0.03
GGT (U/L)	11.52±1.31	12.17±1.31
hsCRP (mg/L)	2.119±0.34	4.708±0.71**
Adenosine deaminase (U/L)	8.711±0.71	12.86±0.84**
Dipeptidyl Peptidase-IV (U/L)	42.50±2.89	42.58±2.81

The values are expressed as mean ± SEM; * P < 0.01 vs. control subjects.

Table 3

Serum and lymphocytes DPP-IV activity in type 2 DM.

	HbA1c < 7.2%	HbA1c ≥ 7.2%
Serum	34.91±2.85	47.01±4.02*
Lymphocytes	87.06±6.49	92.65±6.74

Values are expressed as mean ± SEM; *P < 0.05 vs. HbA1c < 7.2% group.

Table 4

Clinical parameters according time of diagnosed type 2 DM.

	≤ 5 years	> 5 years
BMI (Kg/m²)	29.40±1.45	29.76±2.20
Waist circumference (cm)	101.10±4.21	108.40±5.53
HbA1c (%)	6.9±0.24	7.79±0.34*
Serum		
usCRP (mg/L)	6.23±1.07	2.65±0.57**
ADA (U/L)	12.47±1.31	13.28±1.07
DPP-IV (U/L)	41.96±3.98	43.25±4.11
GGT (U/L)	11.94±1.56	12.17±2.47
Lymphocytes		
ADA (U/L)	8.86±0.75	9.59±0.73
DPP-IV (U/L)	84.54±5.69	94.02±7.26
GGT (U/L)	4.00±0.59	4.13±0.49
NAG (µmol/L)	26.98±1.70	29.81±2.27

Values are expressed as mean±SEM; *P < 0.05; ** P < 0.01 vs. ≤ 5 years group.

5. MANUSCRITO II

5. MANUSCRITO II

***Vitis vinifera* (grape seed extract) ameliorates adenosine deaminase activity in hyperglycemic lymphocytes in vitro**

Bellé LP^a, Bitencourt PER^a, Scola G^c, Salvador M^c, Moretto, MB^a

^a Postgraduate Program in Pharmacology

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences

Health Sciences Center

Federal University of Santa Maria (UFSM)

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

^c Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

Correspondent author:

Maria Beatriz Moretto

Beatriz@smail.ufsm.br

Fax: +55 - 3220 8018

Abstract

The consumption of grape or grape products can provide health benefits in a number of pathologies such as diabetes. The aim of this study was to evaluate the in vitro effects of *Vitis vinifera* (cv. Merlot) seed extract (300µg/mL) on adenosine deaminase (ADA) and dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) activities of lymphocytes subjected to different concentrations of glucose (5, 30, 50 and 100mM). We observed an increase in ADA activity when lymphocytes were exposed to the highest concentration of glucose (100mM). No alteration in DPP-IV activity was observed. The grape seed was able to prevent the increase in ADA activity. Therefore, the results indicate that *V. vinifera* seed extract has hypoglycemic properties when tested in vitro.

Keywords: lymphocytes, hyperglycemia, grape seed extract, adenosine deaminase, dipeptidyl peptidase IV.

Introduction

Adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4), an enzyme involved in purine metabolism, is present in the cell surface (ecto-ADA) and cytoplasm of many cell types. In peripheral mononuclear blood cells, the main function of ADA is to regulate the levels of extracellular adenosine, which are toxic to lymphocytes (Dong et al., 1996). Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; CD26; adenosine deaminase binding protein; ADAbp; EC 3.4.14.5) is a cell surface glycoprotein expressed on different cell types, including lymphocytes. As an exopeptidase, it cleaves dipeptides from polypeptides (e.g., chemokines, neuropeptides and hormones), and appears to play a key role in a number of aspects of lymphocyte function, including immunoregulation (Gorrell et al., 2001). ADA and DPP-IV bind to lymphocytes and exert costimulatory effects mediating T cell activation (Kameoka et al., 1993).

Grapes are known to be a natural source of notable bioactive compounds in particular antioxidants with potential health properties and disease protective qualities. Moreover, it is known that grape extracts have anti-hyperglycemic effects (Orhan et al., 2006; Hogan et al., 2010). Nevertheless, to our knowledge there is no data about the effects of grape extracts on hyperglycemic lymphocytes. To address this issue, the objectives of this study were to evaluate, *in vitro*, ADA and DPP-IV activities in lymphocytes subjected to hyperglycemic conditions and to test the possible beneficial effects of the aqueous grape seed extract (GSE) of *Vitis vinifera* (cv. Merlot) in this system.

Materials and Methods

Chemicals

Adenosine was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ficoll–Histopaque and Gly-Pro *p*-nitroanilide *p*-toluenesulfonate were obtained from Sigma Chemical Co.

(St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

Grape seed extract

Seeds from winery wastes of *V. vinifera* (cv. Merlot) were removed from the vinification tanks five days after the beginning of fermentation in January 2006. The variety was cultivated in the northeast region of Serra Gaucha, state of Rio Grande do Sul, Brazil. Voucher specimen was identified by the herbarium of the University of Caxias do Sul, Brazil (HUCS32455). The GSE and the phenolic content were performed according to Scola et al. (2010).

Isolation of lymphocytes from human blood

Lymphocytes were isolated from human donors (n=8) between 20-30 years old. Blood was collected in Vacutainer tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) containing lithium heparin and separated on Ficoll–Histopaque density gradients, as described by Böyum (1968). Cell number and viability were determined by trypan blue exclusion. Final cell suspension was performed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and cell concentration was adjusted to 10^6 cells/mL. Lymphocytes (3×10^5 cells/mL) were incubated for 3 h with fresh glucose at the concentrations of 5, 30, 50 and 100mM and/or 300 μ g/mL of *V. vinifera* seed extract. Afterwards, lymphocytes were washed with PBS and used for the enzymatic assays.

ADA activity assay

ADA activity was estimated spectrophotometrically by the method of Giusti (1974). Lymphocytes were added to the reaction mixture containing substrate (21mM of adenosine) and the reaction was carried out for 60 min at 37°C. The reaction was stopped and the absorbance was measured at 620nm. Ammonium sulphate (75 μ M) was used as ammonium standard and the values were expressed in U/L.

DPP-IV activity assay

DPP-IV activity was determined as described by Schön et al. (1984). Lymphocytes were incubated with 0.6 mM of Gly-Pro ρ -nitroanilide ρ -toluenesulfonate for 120 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 1 M of acetate buffer (pH 4.5) Absorbance was measured at 390nm and 0.5mM of ρ -nitroanilide was used as standard. The values were expressed in U/L.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test when the F value was significant ($P < 0.05$). All analyses were carried out in an IBM compatible PC using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

Results and Discussion

An increase in ADA activity was observed when lymphocytes were exposed to glucose, and the enzymatic activity was statistically significant ($P < 0.01$) at the concentration of 100mM when compared to 5mM (Fig. 1). This increase in ADA activity is likely to be a compensatory mechanism to degrade adenosine, which plays an important role in the regulation of many metabolic processes, including hyperglycemia. Recently, Kocbuch et al. (2009) observed that adenosine levels were significantly higher in human T and B lymphocytes subjected to high glucose concentrations. Moreover, high glucose promotes the maturation of monocytes and augments their capacity to stimulate T cell proliferation and IL-2 and IL-12 secretion (Yao et al., 2006). In this context, both cytokines up-regulate ADA at the cell surface and also regulate the translocation of intracellular ADA enzyme toward the cell surface (Cordero et al., 2001).

Of particular significance in our results is that GSE avoided the increase of ADA activity in hyperglycemic lymphocytes (Fig. 1). This effect is probably related to oxidative stress, because there is a correlation between increased ADA activity and reactive species generation (Köse et al., 2001). Furthermore, Stanković et al. (2008)

observed that GSE may be effective in the prevention of oxidative damage. To our knowledge, this is the first study that demonstrates the benefic effect of aqueous GSE. Proanthocyanidins (a compound of GSE) is known to exhibit antioxidant, anti-inflammatory and immune-stimulating activities (Salah et al., 1995; Rice-Evans et al., 1996) and could be, at least in part, responsible for the effects observed in the present study.

On the other hand, no alteration was observed in DPP-IV activity of lymphocytes exposed to glucose and/or GSE (Fig. 2). In a previous study developed by our group, no alteration in lymphocyte DPP-IV activity of type 2 diabetic patients was observed (data not published). However, Pala et al. (2003) showed an increase of endothelial DPP-IV activity in high glucose concentrations suggesting that the effect of hyperglycemia on DPP-IV activity appears to be due, at least partly, by modulation of enzyme mRNA expression. Although the glucose concentrations used in our study were very high, the absence of alterations in DPP-IV activity was attributed to the short time of exposure.

In conclusion, high glucose concentrations in a short time are able to increase lymphocyte ADA activity, whereas DPP-IV activity remained unaltered. In addition to the antioxidant, anti-inflammatory and immune-stimulating properties of GSE, *V. vinifera* seed extract was able to prevent the increase in ADA activity.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Biotécnica (Varginha, MG, Brazil). The first author thanks CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship.

References

- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand J Clin Lab Invest.* 97:77–89, 1968.
- Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 58: 1723-1747, 2009.
- Dong RP, Kameoka J, Hege M, Tanaka T, Schlossman SF, Morimoto C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in the immune response. *J. Immunol.* 156:1349-1355, 1996.
- Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HV (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, NY, 1092–1099, 1974.
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol.*54:249-264, 2001.
- Hogan S, Zhang L, Li J, Sun S, Canning C, Zhou K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutr Metab (Lond).* 7:71, 2010.
- Kälvegren H, Fridfeldt J, Bengtsson T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *Eur J Cell Biol.* 89:462-467, 2010.
- Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Scholossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science.* 261:466-469, 1993.
- Kocbuch K, Sakowicz-Burkiewicz M, Grden M, Szutowicz A, Pawelczyk T. Effect of insulin and glucose on adenosine metabolizing enzymes in human B lymphocytes. *Acta Biochim Pol.* 56:439-446, 2009.
- Köse K, Yazici C, Aşşioğlu O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behçet's disease. *Clin Biochem.* 34:125-129, 2001.
- Ludwig K, Fan H, Dobers J, Berger M, Reutter W, Böttcher C. 3D structure of the CD26-ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:223-229, 2004.

Orhan N, Aslan M, Orhan DD, Ergun F, Yeşilada E. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 108:280-286, 2006.

Pala L, Mannucci E, Pezzatini A, Ciani S, Sardi J, Raimondi L, Ognibene A, Cappadona A, Vannelli BG, Rotella CM. Dipeptidyl peptidase-IV expression and activity in human glomerular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 310:28-31, 2003.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. BStructure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20:933–956, 1996.

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 322: 339–346, 1995.

Schön E, Demuth HU, Barth A, Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV of human lymphocytes. Evidence for specific hydrolysis of glycylproline p-nitroanilide in T-lymphocytes. *Biochem J.* 223:255-258, 1984.

Scola G, Conte D, Spada P W D, Dani C, Vanderlinde R, Funchal C, Salvador M. Flavan-3-ol Compounds from Wine Wastes with in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity. *Nutrients.* 2:1048-1059, 2010.

Stanković M, Tesević V, Vajs V, Todorović N, Milosavljević S, Godevac D. Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence. *Planta Med.* 74:730-735, 2008.

Yao K, Ge JB, Sun AJ, Hong XW, Shi HY, Huang RC, Jia QZ, Wang KQ, Zhong CP, Cao XT, Zou YZ. Effects and mechanism of hyperglycemia on development and maturation and immune function of human monocyte derived dendritic cells. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 34:60-64, 2006.

Yu T, Jhun BS, Yoon Y. High-Glucose Stimulation Increases Reactive Oxygen Species Production Through the Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission. *Antioxid Redox Signal.* 2010.

Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2653-2658, 2006.

Legends

Figure1. In vitro effect of glucose and/or GSE on ADA activity in lymphocytes. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8). * p<0.01 compared with 5mM of glucose and # p<0.05 compared with 100mM of glucose.

Figure 2. In vitro effect of glucose and/or GSE on DPP-IV activity in lymphocytes. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8). No significant differences were seen among the groups.

Figure 1

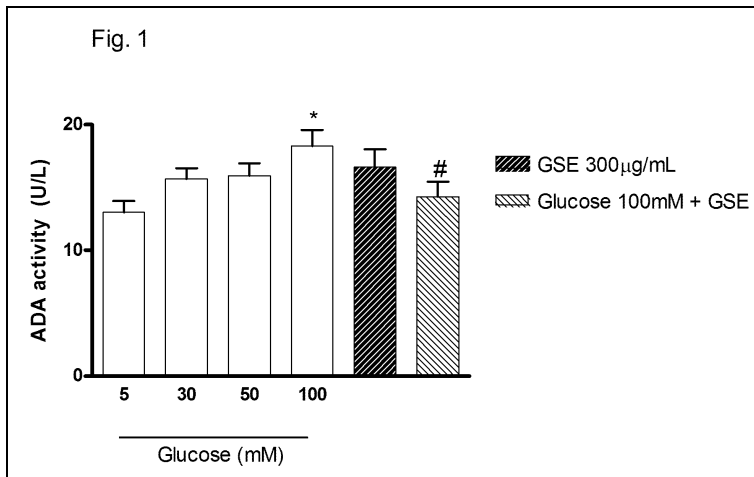
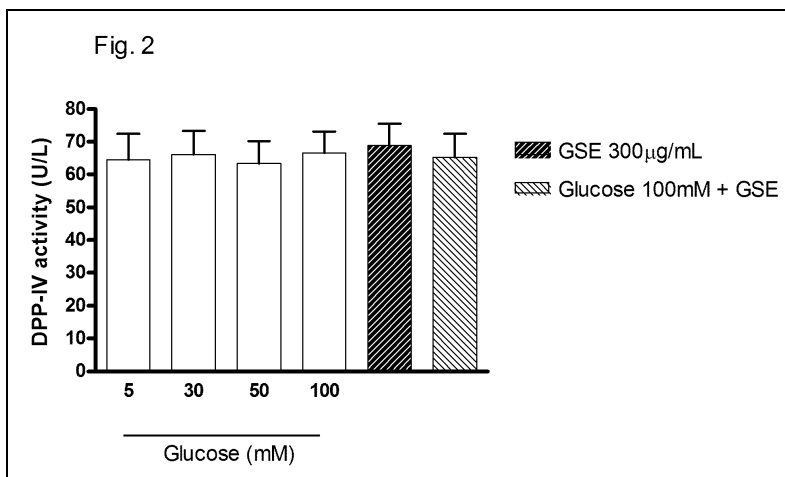


Figure 2



6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Observamos um aumento na atividade da ADA em linfócitos e soro de pacientes com DM 2 (manuscrito I) e em linfócitos expostos a alta concentração de glicose, *in vitro* (manuscrito II).

Em relação ao manuscrito I, KOCBUCH et al. (2009) observou um aumento nos níveis de adenosina em um meio onde linfócitos foram cultivados em altas concentrações de glicose. Além disso, grandes quantidades de adenosina são formadas em tecidos de ratos diabéticos (PAWELCZYK et al., 2003). Desta forma, a atividade da ADA pode estar elevada a fim de degradar a adenosina em excesso produzida durante condições hiperglicêmicas.

Uma resposta imune inapropriada pode ser resultado de defeito na ação da insulina, sendo que esta última é necessária para a função das células T (FRANKIE & ABBAS, 2003). Um grande número de células do sistema imune são encontradas em ilhotas pancreáticas de pacientes com DM 2 (DONATH et al., 2009) e sabe-se que estas células produzem grandes quantidades de citocinas inflamatória em condições hiperglicêmicas (KING, 2008; FERNÁNDEZ-REAL & PICKUP, 2008). A ADA desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação de linfócitos (HOVI et al., 1976; FRANCO et al., 2007). Desta forma, o aumento da atividade ADA em linfócitos, pode ser devido às alterações na proliferação e diferenciação dessas células em condições hiperglicêmicas. Por outro lado, altas concentrações de glicose estimulam a proliferação de células T e a secreção de IL-2 e IL-12 (YAO et al., 2006), e estas interleucinas super-regulam a ADA na superfície das células (CORDERO et al., 2001). Assim, pode-se sugerir que altas concentrações de glicose estimulam a atividade da ADA.

Observamos uma diminuição na expressão do CD26 em linfócitos de pacientes com DM 2 enquanto que a atividade da DPP-IV em linfócitos desses mesmos pacientes não se alterou. A atividade inalterada da DPP-IV também foi observada quando linfócitos foram submetidos a diferentes concentrações de glicose, *in vitro*. Em condições hiperglicêmicas, a grande quantidade de adenosina

formada (KOCBUCH et al., 2009; PAWELCZYK et al., 2003) atua na superfície celular produzindo uma infra regulação na proteína DPP-IV, e estes efeitos persistem após a degradação da adenosina (TAN et al., 2004). Desta forma, os níveis elevados de adenosina no estado hiperglicêmico, levaram a uma diminuição da expressão do CD26, o que persiste mesmo após elevação da ADA.

Recentemente, MATTEUCCI et al. (2010) demonstraram uma diminuição na intensidade de fluorescência para a expressão do CD26 em pacientes com DM 1. Além disso, a ativação de células T leva a um decréscimo da expressão de CD26, via internalização do CD26 (DANG et al., 1990). Por outro lado, a diminuição na expressão do CD26 em pacientes com DM 2 pode ser devido a não alteração na atividade da DPP-IV, visto que para que ocorra atividade co-estimulatória do antígeno CD26, é necessária a atividade da DPP-IV (TANAKA et al., 1993).

A grande quantidade de glicose circulante contribui para a indução do processo inflamatório e para a produção de IL-1 β (DONATH et al., 2009). Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , reduzem a expressão do CD26 em células do endotélio microvascular (TAKASAWA et al., 2010) e foi encontrado uma associação negativa entre CD26 e inflamação (BUSSO et al., 2005). YAZBECK et al. (2009) observaram que inibidores da DPP-IV possuem propriedades anti-inflamatórias e SCHMIEDL et al. (2010) demonstrou efeitos anti-inflamatórios mediados pela deficiência de CD26 em ratos. Desta forma, a redução da expressão de CD26 em linfócitos de pacientes com DM 2 pode ser uma forma de compensação para conter o processo inflamatório provocado pelo excesso de glicose.

Apesar de, em nosso estudo, a atividade da DPP-IV sérica não estar alterada em pacientes com DM 2, observamos que a exposição a longo prazo a mudanças na glicemia podem alterar a atividade da DPP-IV, pois vimos uma correlação positiva entre atividade da DPP-IV sérica e níveis de HbA1c em pacientes com DM 2 e este aumento foi observado especialmente em pacientes que apresentaram níveis de HbA1c acima de 7,2%. Embora alguns pesquisadores tenham demonstrado que elevações na atividade da DPP-IV ocorrem apenas em pacientes com níveis de HbA1c acima de 8,5% (MANNUCCI et al., 2005), nossos resultados corroboram com os resultados observados por RYSKJAER et al. (2006), os quais demonstraram que há elevação na atividade da DPP-IV em pacientes com DM 2 que apresentam níveis de HbA1c abaixo de 8,5%.

Estudos têm demonstrado que há uma associação entre o aumento nos níveis de GGT e desenvolvimento do DM 2 (ANDRÉ et al., 2006; WEN et al., 2010). De fato, a GGT tem demonstrado associação com resistência à insulina (MARTINS et al., 2010), com a redução da função das células β pancreáticas (BIANCHI et al., 2010) e é um fator de risco para o desenvolvimento do DM 2 (FUJITA et al., 2010; ZHANG et al., 2010). No entanto, em nosso estudo, não observamos diferença na atividade da GGT sérica e de linfócitos em pacientes com DM 2 em relação aos controles, mas a atividade da GGT em linfócitos de pacientes com DM 2 está positivamente correlacionada com a circunferência abdominal e o índice de massa corporal (IMC), demonstrando sua estreita relação com a adiposidade abdominal nesses pacientes.

Outro importante fator de predisposição ao desenvolvimento do DM 2 é a PCR (LEE et al., 2009). Em nosso estudo, observamos um aumento na concentração de usPCR no soro dos pacientes com DM 2 em relação aos controles. E, ao mesmo tempo, houve uma correlação positiva dos níveis de usPCR com a circunferência abdominal e o IMC dos pacientes com DM 2, confirmando a associação da inflamação e obesidade com DM 2.

Tem sido relatado que ocorre a liberação de hidrolases ácidas durante os processos inflamatórios (GANGULY et al., 1978; XAVIER et al., 2010). De fato, nós observamos um aumento na atividade da NAG em linfócitos de pacientes com DM 2 em relação aos controles. Houve também, uma correlação positiva com a atividade da ADA nos linfócitos desses mesmos pacientes e uma correlação negativa com a expressão do CD26. Desta forma, acreditamos que a NAG possa ser um marcador do estado inflamatório encontrado no DM 2, visto que a atividade ADA encontra-se elevada em processos inflamatórios e conforme citado acima, há uma associação negativa entre CD26 e inflamação.

Em relação ao manuscrito II, recentemente tem-se verificado os benefícios da *Vitis vinifera* e de seus componentes para o tratamento do DM 2 (ZUZINO, 2009). Neste estudo, observamos que o extrato de sementes de *Vitis vinifera* (cv. Merlot) (GSE) impede a elevação da atividade da ADA em linfócitos expostos a glicose, in vitro. Como há uma estreita relação entre a atividade da ADA e a liberação de espécies reativas de oxigênio (KÄLVEGREN et al., 2010; KÖSE et al., 2001) e o extrato de *Vitis vinifera* demonstrou ter efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes

(ORHAN et al., 2006), é possível sugerir que o GSE seja capaz de proteger os linfócitos do efeito provocado pelas condições hiperglicêmicas.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Manuscrito I

1. A hiperglicemia pode ter estimulado a atividade da ADA e a diminuição da expressão da atividade do CD26 em linfócitos de pacientes com DM 2, possivelmente devido a um aumento nos níveis de adenosina extracelular, ou ainda, pela estimulação da produção de citocinas que atuam sobre o complexo ADA-CD26;
2. A obesidade e o processo inflamatório estão estreitamente relacionados com a patogênese do DM 2, visto que os marcadores de inflamação encontraram-se elevados em pacientes com DM 2 e correlacionados com medidas de obesidade.

Manuscrito II

1. Altas concentrações de glicose estimulam a produção de espécies reativas, as quais estão relacionadas com o aumento da atividade da ADA em linfócitos;
2. O GSE impede a elevação da atividade da ADA em linfócitos hiperglicêmicos, in vitro, possivelmente devido as suas propriedades antioxidantes.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, C.A. et al. Post-proline-cleaving peptidases having DP IV like enzyme activity. Post-proline peptidases. **Adv Exp Med Biol**, v. 477, p. 103-109, 2000.

AHRÉN, B. et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 869-875, 2002.

AHRÉN, B.O. Novel combination treatment of type 2 diabetes DPP-4 inhibition + metformin. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, p. 383–394, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 28, p. 539-553, 2005.

ANDRÉ, P. et al. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. **Diabetologia**, v. 49, p. 2599-2603, 2006.

BAZZI, C. et al. Urinary N-acetyl-b-D-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor outcome in primary glomerulonephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 1890-1896, 2002.

BIANCHI, C. et al. Serum gamma-glutamyltransferase levels are related to insulin sensitivity and secretion in subjects with abnormal glucose regulation. **Diabetes Metab Res Rev**, v.26, p. 181-186, 2010.

BOPP, A. et al. Syzygium cumini inhibits adenosine activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 501-507, 2009.

BUFFINGTON, C.K. et al. Phytohemagglutinin (PHA) activated human T-lymphocytes: insulin binding in T-lymphocytes, **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 134, p. 412-419, 1986.

BUSSO, N. et al. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. **Am J Pathol**, v. 166, p. 433-442, 2005.

CARLISLE, M.L.; KING, M.R.; KARP, D.R. Gamma-glutamyl transpeptidase activity alters the T cell response to oxidative stress and Fas-induced apoptosis. **Int Immunol**, v. 15, p. 17-27, 2003.

CASAS, J.P. et al. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. **J Intern Med**, v. 264, p. 295-314, 2008.

CASTELL, J.V. et al. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. **Hepatology**, v. 12, p. 1179-1186, 1990.

CORDERO, O.J. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **J Leukoc Biol**, v. 70, p. 920-930, 2001.

CORDERO, O.J.; SALGADO, F.J.; NOGUEIRA, M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. **Cancer Immunol Immunother**, v. 58, p. 1723-1747, 2009.

CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **Med Res Rev**, v. 21, p. 105-128, 2001.

D'ALESSIO, D.A. et al. Treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves fasting islet-cell function in subjects with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, p. 81-88, 2009.

DANDONA, P. Effects of antidiabetic and antihyperlipidemic agents on C-reactive protein. **Mayo Clin Proc**, v. 83, p. 333-342, 2008.

DANG, N.H. et al. Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation. **J. Immunol**, v. 145, p. 3963-3971, 1990.

DE MEESTER, I. et al. Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. **Eur. J. Immunol**, v. 24, p. 566-570, 1994.

DE MEESTER, I. et al. CD26, let it cut or cut it down. **Immunol Today**, v. 20, p. 367-375, 1999.

DE MEESTER, I. et al. Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 477, p. 67-87, 2000.

DEL PRATO, S.; PULIZZI, N. The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 55, p. S20-27, 2006.

DIPENTA, J.M.; GREEN-JOHNSON, J.M.; MURPHY, R.J. Type 2 diabetes mellitus, resistance training, and innate immunity: is there a common link? **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, p. 1025-1035, 2007.

DONATH, M.Y. et al. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 325-331, 2009.

DONATH, M.Y. et al. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, p. 261-267, 2010.

DONG, R.P. et al. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. **J Immunol**, v. 156, p. 1349-1355, 1996.

DRUCKER, D.J. Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 12, p. 87-100, 2003.

DRUCKER, D.J.; NAUCK, M.A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, p. 1696-1705, 2006.

DRUCKER, D.J. et al. Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits. **Diabetes Care**, v. 33, p. 428-433, 2010.

DWORACKA, M. et al. Pro-atherogenic alterations in T-lymphocyte subpopulations related to acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients. **Circ J**, v. 71, p. 962-967, 2007.

DUFFY, N.A. et al. Effects of antidiabetic drugs on dipeptidyl peptidase IV activity: nateglinide is an inhibitor of DPP IV and augments the antidiabetic activity of glucagon-like peptide-1. **Eur J Pharmacol**, v. 568, p. 278-286, 2007.

EHSES, J.A. et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 2356-2370, 2007.

EHSES, J.A. et al. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. **Biochem Soc Trans**, v. 36, p. 340-342, 2008.

FALCIONI, F. et al. Influence of CD26 and integrins on the antigen sensitivity of human memory T cells. **Hum Immunol**, v. 50, p. 79-90, 1996.

FARVID, M.S. et al. Association of glomerular and tubular dysfunction with glycaemic control, lipid, lipoprotein, apolipoprotein and antioxidant status in type 2 diabetes mellitus. **Singapore Med J**, v. 48, p. 840-846, 2007.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M.; PICKUP, J.C. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, v. 19, p. 10-16, 2008.

FOX, D.A. et al. Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. **J Immunol**, v. 133, p. 1250-1256, 1984.

FRANCO, R. et al. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. **Crit Rev Immunol**, v. 27, p. 495-509, 2007.

FRANKIE, B.; ABBAS, E. Activated T-lymphocytes in type2 diabetes: Implications from in vitro studies. **Curr Drug Targets**, v. 4, p. 493-503, 2003.

FUJITA, M.; UENO, K.; HATA, A. Association of gamma-glutamyltransferase with incidence of type 2 diabetes in Japan. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 235, p.335-341, 2010.

GANGULY, N.K. et al. Acid hydrolases in monocytes from patients with inflammatory bowel disease, chronic liver disease, and rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 1, p. 1073-1075, 1978.

GAUTIER, A. et al. Risk factors for incident type 2 diabetes in individuals with a BMI of <27 kg/m²: the role of gamma-glutamyltransferase. Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). **Diabetologia**, v. 53, p. 247-253, 2010.

GINÉS, S. et al. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. **Biochem. J**, v. 361, p. 203-209, 2002.

GORRELL, M.D.; WICKSON, J.; MCCAUGHAN, G.W. Expression of the rat CD26 antigen (dipeptidyl peptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes. **Cell Immunol**, v. 134, p. 205-215, 1991.

GORRELL, M.D.; GYSBERS, V.; MCCAUGHAN, G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 54, p. 249-264, 2001.

GORRELL, M.D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 108, p. 277-292, 2005.

GRABER, R. et al. Apoptosis and oxidative status in peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients. **Apoptosis**, v. 4, p. 263-270, 1999.

GROSS, J.L. et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, p. 16-26, 2002.

HAMBROCK, A. et al. Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. **J. Biol. Chem**, v. 282, p. 3347-3356, 2007.

HINNEN, D. et al. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes. **J Am Board Fam Med**, v. 19, p. 612-620, 2006.

HIRSCHHORN, R. Adenosine deaminase deficiency. **Immunodeficiency Rev**, v. 2, p. 175-198, 1990.

HOGAN, S. et al. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. **Nutr Metab (Lond)**, v. 7, p. 71, 2010.

HOLST, J.J.; VILSBØLL, T.; DEACON, C.F. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. **Mol Cell Endocrinol**, v. 297, p. 127-136, 2009.

HONG, C.Y.; CHIA, K.S.; LING, S.L. Urinary protein excretion in Type 2 diabetes with complications. **J Diabetes Complications**, v. 14, p. 259-265, 2000.

HOVI, T. et al. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. **Clin Exp Immunol**, v. 23, p. 395-403, 1976.

IBIŞ, M. et al. Serum Adenosine Deaminase Levels in Pancreatic Diseases. **Pancreatology**, v. 7, p. 526-530, 2007.

IWAKI-EGAWA, S.I.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 137, p. 247-254, 2004.

IQBAL, M.P. et al. N-acetyl-B-D-glucosaminidase and inflammatory response after cardiopulmonary bypass. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 18, p. 74-77, 2008.

JOVANOVIĆ, L. et al. Repaglinide in type 2 diabetes: a 24-week, fixed-dose efficacy and safety study. **J Clin Pharmacol**, v. 40, p. 49-57, 2000.

KAEFER, M. et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Clin Biochem**, v. 43, p. 450-454, 2010.

KÄLVEGREN, H.; FRIDFELDT, J.; BENGTSSON, T. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. **Eur J Cell Biol**, v. 89, p. 462-467. 2010.

KAMEOKA, J. et al. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. **Science**, v. 261, p. 466-469, 1993.

KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 9 ed., 2005.

KING, G.L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **J Periodontol**, v. 79, p. 1527-1534, 2008.

KISS, A.C.I. et al. Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por Streptozotocin. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, p. 24-30, 2006.

KIRINO, Y. et al. Interrelationship of dipeptidyl peptidase IV (DPP4) with the development of diabetes, dyslipidaemia and nephropathy: a streptozotocin-induced model using wild-type and DPP4-deficient rats. **J Endocrinol**, v. 200, p. 53-61, 2009.

KOCHBUCH, K. et al. Effect of insulin and glucose on adenosine metabolizing enzymes in human B lymphocytes. **Acta Biochim Pol**, v. 56, p. 439-446, 2009.

KÖSE, K.; YAZICI, C.; AŞŞIOĞLU, O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behçet's disease. **Clin Biochem**, v. 34, p. 125-129, 2001.

KOTACKOVÁ, L.; BALÁZIOVÁ, E.; SEDO, A. Expression pattern of dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues in cancer. **Folia Biol (Praha)**, v. 55, p. 77-84, 2009.

KRUGER, D.F.; Exploring the Pharmacotherapeutic Options for Treating Type 2 Diabetes. **Diabetes Educ**, v. 34, p. 60-65, 2008.

KURTUL, N. et al. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 47, p. 33-35, 2004.

KURUKULASURIYA, L.R.; SOWERS, J.R. Therapies for type 2 diabetes: lowering HbA1c and associated cardiovascular risk factors. **Cardiovasc Diabetol**, v. 9, p. 45, 2010.

LEE, C.C. et al. Association of C-reactive protein with type 2 diabetes: prospective analysis and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 52, p. 1040-1047, 2009.

LI, B.Y. et al. Back-regulation of six oxidative stress proteins with grape seed proanthocyanidin extracts in rat diabetic nephropathy. **J Cell Biochem**, v. 104, p. 668–679, 2008.

LIEBERMAN, M.W. et al. Gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? **Am J Pathol**, v. 147, p. 1175-1185, 1995.

LUDWIG, K. et al. 3D structure of the CD26–ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, p. 223–229, 2004.

LYRA, R.; CAVALCANTI, N.; MAZZA, F. Diabetes mellitus: perguntas e respostas. Itapevi, SP. **A. Araújo Silva Farmacêutica**, 2009. 536 p.

MAHDI, A.A. et al. Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and Antioxidant status in diabetic rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 18, p. 8-15, 2003.

MANNUCCI, E. et al. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 48, p. 1168-1172, 2005.

MATTEUCCI, E. et al. About CD26 CD8 lymphocytes in type 1 diabetes mellitus. **Scand J Immunol**, v. 71, p. 123-124, 2010.

MARTIN, M. et al. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T Cells triggered by the TCR-CD3 complex ± possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. **J Immunol**, v.155, p. 4630-4643, 1995.

MARTINS, M.C. et al. Association of gamma glutamyltransferase, metabolic syndrome and cardiovascular risk. **Acta Med Port**, v.23, p. 579-588, 2010.

MORIMOTO, C.; SCHLOSSMAN, S.F. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. **Immunol Rev**, v. 161, p. 55-70, 1998.

MORTENSEN, R.F. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. **Immunol Res**, v. 24, p. 163-176, 2001.

MURUGESAN, V. et al. CoMFA and CoMSIA of diverse pyrrolidine analogues as dipeptidyl peptidase IV inhibitors: active site requirements. **Mol Divers**, 2010.

NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. **Phytother Res**, v. 23, p. 1197-1204, 2009.

NATHAN, D.M. et al. American Diabetes Association; European Association for Study of Diabetes. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 193-203, 2009.

NEGRI, G.; Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 121-142, 2005.

NOVOGRODSKY, A.; TATE, S.S.; MEISTER, A. gamma-Glutamyl transpeptidase, a lymphoid cell-surface marker: relationship to blastogenesis, differentiation, and neoplasia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, p. 2414-2418, 1976.

OEFFNER, C. et al. Structural studies of a bifunctional inhibitor of neprilysin and DPP-IV. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 63, p. 975-981, 2007.

OLIVEIRA, A.F.; VALENTE, J.G.; LEITE, I.C. Fração da carga global do diabetes mellitus atribuível ao excesso de peso e à obesidade no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, 2010.

ORHAN, N. et al. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 108, p. 280-286, 2006.

PALA, L. et al. Dipeptidyl peptidase-IV expression and activity in human glomerular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, p. 28-31, 2003.

PAWELCZYK, T.; PODGORSKA, M.; SAKOWICZ, M. The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. **Mol Pharmacol**, v. 63, p. 81-88, 2003.

PFEIFFER, A.F. et al. Role of the gut Peptide glucose-induced insulinomimetic Peptide in energy balance. **Results Probl Cell Differ**, v. 52, p. 183-188, 2010.

PIAZZA, G.A. et al. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. **Biochem J**, v. 262, p. 327-334, 1989.

PIRAS, M.A. et al. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. **Br Med J**, v. 2, p. 1751-1752, 1978.

POSPISILOVA, S.; FREBORT, Y. Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 151, p. 3-10, 2007.

PRAKASH, M.S. et al. Altered Adenosine Deaminase Activity in Type 2 Diabetes Mellitus. **JACM**, v. 7, p. 114-117, 2006.

RAMLO-HALSTED, B.A.; EDELMAN, S.V. The natural history of type 2 diabetes: implications for clinical practice. **Diabetes**, v. 26, p. 771-789, 1999.

RETNAKARAN, R.; DRUCKER, D.J. Intensive insulin therapy in newly diagnosed type 2 diabetes. **Lancet**, v. 371, p. 1725-1726, 2008.

RYSKJAER, 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**, v. 155, p. 485-493, 2006.

SAKOWICZ, M.; SZUTOWICZ, A.; PAWELCZYK, T. Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes. **Biochem Pharmacol**, v. 68, p. 1309-1320, 2004.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochim Pol**, v. 53, p. 539-46, 2006.

SCHMIEDL, A. et al. Reduced airway inflammation in CD26/DPP4-deficient F344 rats is associated with altered recruitment patterns of regulatory T cells and expression of pulmonary surfactant proteins. **Clin Exp Allergy**, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso brasileiro de diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito do tipo 2. - Rio de Janeiro, **Diagraphic**, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008.

STENTZ, F.B.; KITABCHI, A.E. Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 335, p. 491-495, 2005.

STENTZ, F.B.; KITABCHI, A.E. Transcriptome and proteome expressions involved in insulin resistance in muscle and activated T-lymphocytes of patients with type 2 diabetes. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 5, p. 216-235, 2007.

TAKASAWA, W. et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates microvascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, 2010.

TAN, E.Y.; MUJOOMDAR, M.; BLAY, J. Adenosine down-regulates the surface expression of dipeptidyl peptidase IV on HT-29 human colorectal carcinoma cells: implications for cancer cell behavior. **Am J Pathol**, v. 165, p. 319-330, 2004.

TANAKA, T. et al. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, p. 4586-4590, 1993.

TENTOLOURIS, N.; VOULGARI, C.; KATSILAMBROS, N. A review of nateglinide in the management of patients with type 2 diabetes. **Vasc Health Risk Manag**, v. 3, p. 797-807, 2007.

TODD, J.F.; BLOOM, S.R. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. **Diabet Med**, v. 24, p. 223-232, 2007.

TRAPP, S.; HISADOME, K. Glucagon-like peptide 1 and the brain: Central actions-central sources? **Auton Neurosci**, 2010.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v. 352, p. 837-853, 1998.

VAN DEN OEVER, I.A. et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 792393, 2010.

VAN DER WEYDEN, M.B.; KELLEY, W.N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **J Biol Chem**, v. 251, p. 5448-5456, 1976.

WEIHOFEN, W.A. et al. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. **J Biol Chem**, v. 279, p. 43330-43335, 2004.

WENG, J. et al. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial. **Lancet**, v. 371, p. 1753-1760, 2008.

WEN, J. et al. C-reactive protein, gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes in a Chinese population. **Clin Chim Acta**, v. 411, p. 198-203, 2010.

WIDLANSKY, M.E. et al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. **Transl Res**, v. 156, p. 15-25, 2010.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

XAVIER, D.O. et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Biomed Pharmacother**, v. 64, p. 220-225, 2010.

YAO, K. et al. Effects and mechanism of hyperglycemia on development and maturation and immune function of human monocyte derived dendritic cells. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, v. 34, p. 60-64, 2006.

YEO, E.S. et al. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and C-reactive protein (CRP) are positively associated with the risk of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes. **Yonsei Med J**, v. 51, p. 519-525, 2010.

ZAGURY, L.; ZAGURY, R.L. Tratamento atual do diabetes mellitus. Itapevi – SP. **A. Araújo Silva Farmacêutica**, 2009. 522 p.

YAZBECK, R.; HOWARTH, G.S.; ABBOTT, C.A. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, p. 600-607, 2009.

ZHANG, H.; ZHANG, C. Regulation of Microvascular Function by Adipose Tissue in Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence of an Adipose-Vascular Loop. **Am J Biomed Sci**, v. 1, p. 133-142, 2009.

ZHANG, Y. et al. Positive correlations of liver enzymes with metabolic syndrome including insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. **Endocrine**, v. 38, p. 181-187, 2010.

ZUNINO, S. Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. **J Nutr**, v. 139, p. 1794S-800S, 2009.