Acaris Benetti dos Santos

A inibição da dipeptidil peptidase-4 melhora proteinúria tubular e glomerular e protege contra a redução da expressão de megalina e podocina na doença renal experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profª Drª Adriana Castello Costa Girardi

São Paulo

2019

Acaris Benetti dos Santos

A inibição da dipeptidil peptidase-4 melhora proteinúria tubular e glomerular e protege contra a redução da expressão de megalina e podocina na doença renal experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profª Drª Adriana Castello Costa Girardi

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Acaris Benetti dos
A inibição da dipeptidil peptidase-4 melhora proteinúria tubular e glomerular e protege contra a redução da expressão de megalina e podocina na doença renal experimental / Acaris Benetti dos Santos. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1.Dipeptidil peptidase 4 2.Biomarcadores 3.Insuficiência renal crônica 4.Inibidores da dipeptidil peptidase IV 5.Nefrectomia

USP/FM/DBD-252/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profª. Dra. Adriana Castello Costa Girardi pela paciência durante esses anos.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, por fornecer um ambiente de excelência para que eu desenvolvesse meus experimentos e aprendesse desde a iniciação científica ao mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À banca examinadora titular e suplente pelo aceite do convite e contribuição neste processo de aprendizado.

Agradeço aos meus amigos do LGCM pelos ensinamentos e parceria.

À minha mãe Claudia Maria Benetti, ao meu pai Marco Antonio dos Santos e a minha irmã Carmen Benetti dos Santos.

Um obrigado à minha companheira Flávia Martins pelo apoio e paciência.

Obrigado a todos aqueles que de alguma forma me motivaram, incentivaram e me ajudaram a permanecer em minha jornada.

“A coisa mais bonita que
podemos experimentar é
o misterioso.”

Albert Einstein

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor:

Referências: *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Manuscrito: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO 11

1.1. A Doença Renal Crônica 11

1.2. A proteinúria na Doença Renal Crônica 12

1.2.1. Barreira de Filtração Glomerular 14

1.2.1.1. Nefrina 17

1.2.1.2. Podocina 18

1.2.2. Mecanismo de Endocitose Mediada por Receptores 19

1.2.2.1. Cubilina 22

1.2.2.2. Megalina 23

1.3. Inibidores da DPP4 23

1.4. Modelo experimental de Doença Renal Crônica independente de hiperglicemia – A Nefrectomia 5/6 27

2. OBJETIVOS 30

3. MATERIAIS E MÉTODO 31

3.1. Modelo Nefrectomia 5/6 31

3.1.1. Grupos experimentais 32

3.1.2. Desenho experimental 33

3.2. Acompanhamento do peso corpóreo e do ganho de peso 34

3.3. Aferição indireta da pressão arterial caudal 34

3.4. Avaliação da função renal 35

3.5. Preparação de homogenato de rim 36

3.6. Determinação da concentração de proteínas 37

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 37

3.8. Immunoblotting 38

3.9. Coloração do gel SDS-PAGE com nitrato de prata 40

3.10. Ureia sérica 40

3.11. Mensuração de glicemia em jejum 41

3.12. Determinação da atividade catalítica da DPP4 41

3.13. Análise estatística 42

4. RESULTADOS 43

4.1.1. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre os parâmetros de peso corpóreo e função renal. 43

4.1.2. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre parâmetros de sódio e pressão arterial. 44

4.1.3. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a creatinina, ureia e glicose plasmáticas. 46

4.1.4. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a excreção de proteínas totais. 48

4.1.5. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a expressão proteica de componentes da BFG e do mecanismo de endocitose em túbulo proximal em ratos nefrectomizados. 50

4.1.6. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a excreção urinária da DPP4. 54

4.1.7. Avaliação da correlação entre atividade de DPP4 urinária e parâmetros de creatinina plasmática, excreção de proteínas totais e pressão arterial caudal nos ratos nefrectomizados tratados com veículo. 56

5. DISCUSSÃO 58

6. CONCLUSÃO 63

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

8. ANEXOS 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANP: Peptídeo Natriurético Atrial

ARG358: Arginina 358

BNP: Peptídeo Natriurético Cerebral

BFG: Barreira de Filtração Glomerular

BP-2000: Blood Pressure Analysis System

CD2AP: Proteína Associada a CD2

DPP4: Dipeptidil Peptidase 4

DRC: Doença Renal Crônica

ECL: Enhanced Chemiluminescence

EP: Endossoma Precoce

ET: Endossoma Tardio

FNIII: Fibronectina Tipo 3

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GIP: Polipeptídeo Inibidor Gástrico

GLP-1: Peptídeo-1 Semelhante ao Glucagon

GLU205: Glutamato205

GLU206: Glutamato206

HOAT3: Isoforma 3 do Trocador Aniônico Orgânico Humano

HRP: Horseradish Peroxidase

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

MBG: Membrana Basal Glomerular

MCP-1: Proteína Quimiotática de Monócitos

NX: Nefrectomia

PBS: Tampão Fosfato Salino

PHB: Proibitina

PHE357: Fenilalanina 357

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PVDF: Fluoreto de Polivinilideno

RBP-4: Retinol Binding Protein-4

RFG: Ritmo de Filtração Glomerular

SDF-1α: Fator 1 Alfa Derivado do Estroma

SDS: Dodecil:Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo Dodecil-Sulfato de Sódio

SER209: Serina 209

SHAM: Rato Falso Operado

TRS: Terapia Renal Substitutiva

TGF-β: Fator de Transformação do Crescimento Beta

TNF-α: Fatores de Necrose Tumoral Alfa

TYR662: Tirosina 662

VR: Vesículas de Reciclagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da severidade da DRC de acordo com o RFG e com os níveis de albuminúria. 13

Figura 2. Modelo teórico da depuração de diferentes cargas de dextranas em função do tamanho do raio da proteína. 15

Figura 3. Barreira de Filtração Glomerular. 17

Figura 4. Representação das estruturas da podocina (cima) e da nefrina (baixo). 19

Figura 5. Manuseio renal da albumina. 21

Figura 6. Molécula do composto de fosfato de sitagliptina e sua interação com a DPP4. 26

Figura 7. Imagens da cirurgia da nefrectomia 5/6. 32

Figura 8. Desenho experimental com sequência temporal, em dias, do estudo e os procedimentos adotados. 34

Figura 9. Avaliação dos parâmetros de sódio e pressão arterial caudal. 45

Figura 10. Avaliação da creatinina, ureia plasmáticas e glicemia. 47

Figura 11. Avaliação da excreção de proteínas totais. 49

Figura 12. Avaliação temporal, em dias após a cirurgia, de biomarcadores de lesão glomerular e tubular renal. 51

Figura 13. Avaliação dos componentes relacionados à BFG. 52

Figura 14. Avaliação dos componentes relacionados ao mecanismo de endocitose em túbulo proximal renal. 53

Figura 15. Avaliação da atividade enzimática e expressão proteica da DPP4 em soro, urina e tecido renal. 55

Figura 16. Correlação entre a atividade da DPP4 urinária e a creatinina plasmática, excreção de proteínas urinárias e pressão arterial caudal dos ratos nefrectomizados tratados com veículo. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos principais inibidores da DPP4 atualmente utilizados para o tratamento da DM2 no Brasil. 25

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados. 39

Tabela 3. Parâmetros de peso corpóreo e de função renal dos ratos nefrectomizados tratados com sitagliptina ou veículo. 44

RESUMO

Santos AB. *A inibição da dipeptidil peptidase-4 melhora proteinúria tubular e glomerular e protege contra a redução da expressão de megalina e podocina na doença renal experimental* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Evidências clínicas e experimentais sugerem que os inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP4) conferem renoproteção não relacionada com os seus efeitos no controle glicêmico. Este estudo investigou os mecanismos subjacentes ao efeito antiproteinúrico da inibição da DPP4 em ratos submetidos à ablação renal e testou a hipótese de que a atividade urinária da DPP4 se correlaciona com a progressão da Doença Renal Crônica (DRC). Os experimentos foram conduzidos em ratos Wistar machos submetidos à nefrectomia 5/6 (Nx) ou operação simulada (Sham), seguido de oito semanas de tratamento com o inibidor de DPP4, sitagliptina (IDPPIV) ou veículo. Proteinúria aumentou progressivamente em ratos Nx durante todo o período de observação. Este aumento foi notavelmente mitigado pela sitagliptina. Níveis mais elevados de proteinúria em ratos Nx foram acompanhados por maior excreção urinária de retinol binding protein 4 (RBP4), um marcador de proteinúria tubular, bem como níveis mais elevados de podocina, um marcador de proteinúria glomerular. Os níveis de RBP4 e podocina não foram detectados na urina de ratos Nx + IDPP4. Proteinúria tubular e glomerular foram associadas com a redução da expressão de megalina e podocina no córtex renal de ratos Nx. O tratamento com sitagliptina impediu parcialmente esta diminuição. Curiosamente, tanto a atividade urinária de DPP4 quanto a abundância desta enzima aumentaram progressivamente nos ratos Nx. Além disso, a atividade da DPP4 urinária foi correlacionada positivamente com níveis mais elevados de creatinina plasmática, proteinúria e pressão arterial. Coletivamente, esses resultados sugerem que a inibição da DPP4 melhora a proteinúria tubular e glomerular e atenua a redução da expressão de megalina e podocina em ratos com DRC. Além disso, esses achados sugerem que a atividade da DPP4 urinária pode servir como um biomarcador para a progressão da doença renal. **Comitê de ética: 003/16**

Descritores: Dipeptidil peptidase 4; Biomarcadores; Insuficiência renal crônica; Inibidores da dipeptidil peptidase IV; Nefrectomia.

ABSTRACT

Santos AB. *Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves tubular and glomerular proteinuria and protects against reduced expression of megalin and podocin in experimental renal disease* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Clinical and experimental evidence suggest that dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors confer renoprotection that is unrelated with their effects on glycemic control. This study investigated the mechanisms underlying the antiproteinuric effect of DPP4 inhibition in 5/6 renal ablation rats and tested the hypothesis that urinary activity of DPP4 correlates with CKD progression. Experiments were conducted in male Wistar rats who underwent 5/6 nephrectomy (Nx) or sham operation, followed by eight weeks treatment with the DPP4 inhibitor, sitagliptin (IDPP4) or vehicle. Proteinuria increased progressively in Nx rats throughout the observation period. This increase was remarkably mitigated by sitagliptin. Higher levels of proteinuria in Nx rats were accompanied by higher urinary excretion of Retinol binding protein 4 (RBP4), a marker of tubular proteinuria, as well as higher urinary levels of podocin, a marker of glomerular proteinuria. The levels of RBP4 and podocin were undetected in the urine of Nx + IDPP4 rats. Tubular and glomerular proteinuria were associated with reduced expression of megalin and podocin in the renal cortex of Nx rats. Sitagliptin treatment partially prevented this decrease. Interestingly, both urinary DPP4 activity and abundance increased progressively in the of Nx rats. Additionally, urinary DPP4 activity was correlated with higher levels of serum levels of creatinine, proteinuria and blood pressure. Collectively, these results suggest that DPP4 inhibition ameliorates both tubular and glomerular proteinuria and attenuates the reduction of megalin and podocin expression in CKD rats. Furthermore, these findings suggest that urinary DPP4 activity may serve as a biomarker of renal disease and progression.

Descriptors: Dipeptidyl peptidase 4; Biomarkers; Renal insufficiency, chronic; Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitors; Nephrectomy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença Renal Crônica

A doença renal crônica (DRC) é definida como lesão renal devido a alterações estruturais ou funcionais do rim estabelecidas por três meses ou mais, com consequente perda progressiva e irreversível da função renal, glomerular, tubular e endócrina (1). Atualmente, estima-se que mais de 122 mil pacientes estão em tratamento dialítico no Brasil com incidência média anual de 6,3% casos nos últimos cinco anos (2). A cada ano, observa-se o aumento das taxas de incidência e prevalência de pacientes em terapia renal substitutiva, o gasto com o programa de diálise e transplante renal no Brasil ultrapassa o valor de 1,4 bilhão de reais ao ano (2).

A DRC é uma doença silenciosa nos estágios iniciais, podendo ser deflagrada por diversos fatores. No Brasil, as principais causas de DRC são hipertensão arterial (HA) seguida de diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). Além destas etiologias, pode-se destacar também glomerulonefrites, doenças autoimunes, obesidade, câncer e o próprio envelhecimento que leva à injúria renal sustentada, redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e, por fim, à falência funcional do rim (3–10).

Independentemente da etiologia da DRC no paciente, a doença se desenvolve a partir do acometimento de uma parcela dos néfrons por lesões nos vasos sanguíneos, glomérulos, túbulos, interstício renal ou no trato urinário inferior. Os néfrons remanescentes hipertrofiam-se a fim de manter a filtração glomerular com consequente aumento do fluxo plasmático e da pressão intraglomerular. Durante um período de vários anos, estas mudanças

adaptativas podem levar à lesão adicional dos néfrons restantes, em especial aos glomérulos. Acredita-se que pelo aumento crônico da pressão e da distensão dos glomérulos e das arteríolas, ocorra lesão e esclerose destes vasos, com redução ainda maior da função renal e mais alterações adaptativas nos néfrons remanescentes, em um círculo vicioso lentamente progressivo e resultante na terapia renal substitutiva.

1.2. A proteinúria na Doença Renal Crônica

Na DRC, tanto a porção glomerular quanto a tubular são danificadas conforme a progressão da doença e este dano promove a passagem exacerbada de proteínas pelo túbulo até serem excretadas na urina (proteinúria). Acredita-se que os eventos hemodinâmicos de hipertensão e hiperfiltração glomerular causam vazamento de macromoléculas do glomérulo para o túbulo, principalmente de albumina, resultando em danos ao néfron. O excesso de proteínas na urina pode indicar ações pró-inflamatórias e pró-fibróticas que contribuem diretamente com o dano tubular crônico (11), além de estarem associadas a outros fatores de risco comuns na população, como diabetes e doenças cardiovasculares.

Tanto o RFG, bem como a albuminúria, são importantes marcadores da DRC que indicam o nível de severidade clínica da doença e o risco cardiovascular associado nestes pacientes. Segundo o guia prático para DRC, elaborado pela *National Kidney Foundation,* o paciente acometido pela doença necessariamente deve ter o RFG menor do que 60 mL/min/1,73 m² ou maior do que 60 mL/min/1,73 m² se associado com algum outro marcador de dano renal, como por exemplo, excreção maior do que 30 mg de albumina por dia mantida por um período superior ou igual a 3 meses (1). Além destes, a creatinina

sérica e a cistatina C também são importantes preditores para identificação da doença. Porém, os marcadores utilizados hoje em dia falham na identificação precoce da DRC sendo importantes somente em estágios mais avançados da doença, além de alguns gerarem certo desconforto para os pacientes. Sendo assim, a descoberta de novos biomarcadores não invasivos e que auxiliem na identificação de estágios anteriores é de muita importância.

Na figura 1, estão representados os estágios da doença tendo como referência o RFG associado com a albuminúria. Quanto mais escuro o tom de cinza maior a necessidade de transplante renal e maior o risco de desenvolvimento de morte por eventos cardiovasculares.

Figura 1. Estágios da severidade da DRC de acordo com o RFG e com os níveis de albuminúria.

				Estágio de acordo com albuminúria (mg/24horas)		
				A1	**A2**	**A3**
				≤30	**30–300**	**>300**
Estágio de acordo com o RFG (ml/min/1,73m²)	**1**	Normal ou alto RFG	**≥90**			
	2	Suave queda do RFG	**60-89**			
	3a	Queda suave a moderada do RFG	**45-59**			
	3b	Queda moderada a severa do RFG	**30-44**			
	4	Severa queda do RFG	**15-29**			
	5	Falha renal	**≤15**			

Fonte: *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), 2012(1).

A albumina é sintetizada no fígado e é a proteína plasmática mais abundante. Seu peso molecular é de aproximadamente 65 kDa e esta desempenha funções fundamentais para a homeostase, como a manutenção

da pressão oncótica, volume sanguíneo e o transporte de várias substâncias como ácidos graxos, hormônios e vitaminas (12,13). Em indivíduos sem DRC, diariamente são filtrados de 170 mg a 9 g de albumina pelos glomérulos por dia (14). Entretanto, a quantidade excretada dessa proteína é menor do que 30 mg. Isso ocorre por que o rim consegue impedir a perda de maior parte dessas moléculas através da Barreira de Filtração Glomerular (BFG), e da reabsorção de proteínas em túbulo proximal por meio do mecanismo de endocitose mediada por receptores. Já em indivíduos com comprometimento da função renal, ocorre maior excreção urinária de albumina, resultante de dano tanto na BFG como no mecanismo de endocitose de proteínas em túbulo proximal.

1.2.1. Barreira de Filtração Glomerular

Na filtração glomerular, micro e macromoléculas oriundas da arteríola aferente passarão por alças capilares que compõe a cápsula de Bowman. A pressão gerada pelo fluxo sanguíneo fará com que essas moléculas passem por um processo de seleção dependente do seu tamanho e de sua carga. A primeira barreira de seleção são as células endoteliais dos capilares glomerulares. Estas células são fenestradas e devido à presença do glicocálice, composto de glicoproteínas carregadas negativamente (glicosaminoglicanas e proteoglicanas) é considerado por muitos cientistas uma das estruturas de seleção por repelir moléculas com cargas negativas, permitindo apenas a passagem de moléculas com carga positiva. (15–19). Macromoléculas e moléculas aniônicas continuarão retidas nos capilares e seguirão o fluxo sanguíneo pela arteríola eferente que sai da cápsula de Bowman pelo polo vascular.

A próxima seleção de partículas filtradas pelo glomérulo dependerá de

três estruturas que compõem a membrana basal glomerular (MBG). A primeira porção é denominada lâmina rara interna, capaz de evitar a passagem de partículas de até 300 kDa (20). A barreira intermediária, conhecida como lâmina densa, consegue impedir que moléculas de até 150 kDa ultrapassem para a última barreira, a lâmina rara externa, mais adjacente à base dos podócitos, com capacidade de reter proteínas e outros solutos de tamanho semelhante ao da albumina (20). Diversos trabalhos mostram que a MBG é capaz de impedir a eliminação de solutos levando em consideração a sua carga (21–23). Porém, essa propriedade seletiva em relação às cargas iônicas permanece em discussão (24,25), já que a influência da carga elétrica e do tamanho molecular pode afetar a depuração de partículas pelo glomérulo como demonstrado na Figura 2.

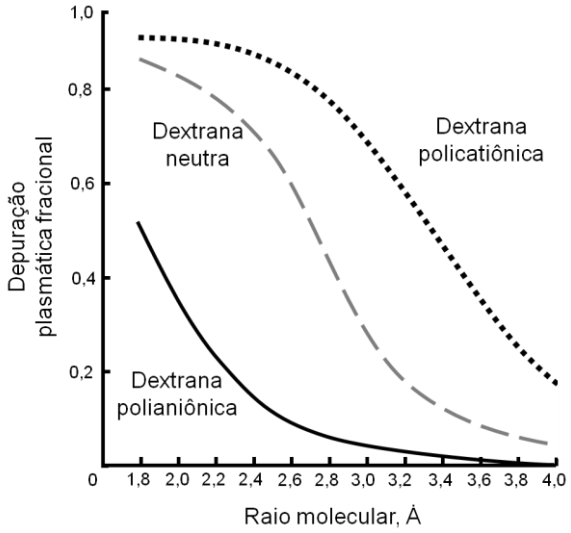

Figura 2. Modelo teórico da depuração de diferentes cargas de dextranas em função do tamanho do raio da proteína. Quanto maior o raio da proteína ou mais negativa for a molécula, mais dificil será sua passagem pela BFG. Adaptado de Deen et al., 1980 (22).

Para poderem passar para o espaço de Bowman e seguir para a primeira porção do túbulo proximal renal, as proteínas ainda devem atravessar a fenda diafragmática formada por junções celulares especializadas (em forma

de zíper) capazes de evitar a passagem de proteínas maiores de 40 kDa (26,27). Essas junções são compostas principalmente por uma proteína transmembrana denominada nefrina, que possui uma cauda citoplasmática conectada à outra proteína transmembrana, a podocina, e juntas, formam um complexo mantido nos processos podocitários revestindo a MBG (28,29) (Figura 3). Tanto a membrana voltada para o espaço de Bowman, quanto a porção em contato com a fenda diafragmática também são cobertas pelo glicocálice atribuindo assim carga negativa aos podócitos (30–32).

Em condições patológicas como a hipertensão, observa-se que proteínas presentes nas arteríolas aferentes são forçadas a passar pela BFG, levando à microlesões nesse segmento, como também ao espessamento da MBG e expansão mesangial. Se essa condição for mantida cronicamente, haverá a degradação desse segmento, levando à glomeruloesclerose.

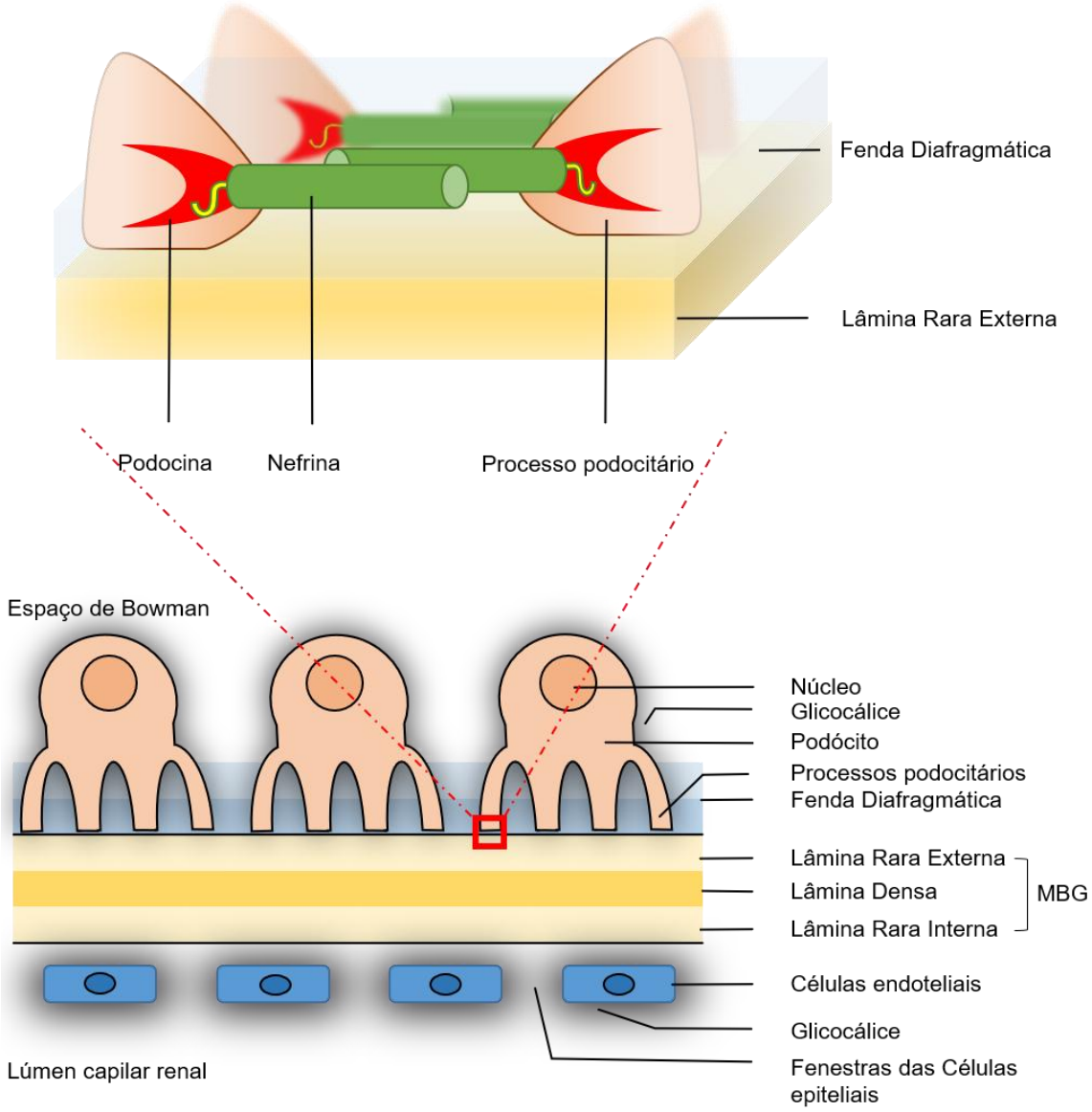

Figura 3. Barreira de Filtração Glomerular. As proteínas presentes nos processos podais, nefrina e podocina estão em evidência na região superior da imagem. A filtração de moléculas ocorre a partir do endotélio capilar até o espaço urinário da cápsula de Bowman. A passagem direta da albumina para o interstício resultante de alterações patológicas e glomerulares tem sido proposta como via de progressão da doença renal crônica. MBG = Membrana Basal Glomerular. Adaptado de Farquhar, 2006, Kawachi, 2006 e Tryggvason, 2006 (33–35).

1.2.1.1. Nefrina

A nefrina é uma proteína de peso molecular aproximado de 180 kDa e foi a primeira proteína glomerular descoberta a partir de estudos realizados em pacientes com Síndrome Nefrótica Congênita do tipo Finlandês, uma doença

autossômica recessiva marcada pela mutação no gene *Nephs1*, levando a grave proteinúria e morte por complicações renais associadas com disfunção glomerular (36,37).

A Figura 4 representa esta proteína destacando uma curta região C-terminal intracelular e um longo domínio N-terminal extracelular (38). A porção extracelular permanece fixa na membrana por toda a base dos processos podocitários e interage com outras proteínas como a NEPH1 e NEPH2 (39,40), além de outras nefrinas adjacentes oriundas de processos podocitários próximos formando uma interdigitação em forma de zíper (38). Diferentes estudos ressaltam que a fosforilação do domínio intracelular da nefrina também tem potencial para modular sua interação com a podocina, além de manter a organização do citoesqueleto, a polaridade e a sobrevivência do podócito (27,41–44).

1.2.1.2. Podocina

A podocina é uma molécula de 42 kDa com 383 aminoácidos formando um grampo (Figura 4) e é codificada a partir do gene *Nephs2.* Mutações neste sítio também originam síndromes nefróticas de grande e deletéria repercussão clínica. Um estudo com camundongos *knockout* para podocina mostrou elevada proteinúria logo após o nascimento e morte nas primeiras 5 semanas de vida (43).

A podocina está localizada na membrana do processo podocitário no local de inserção da fenda diafragmática (44). Esta proteína interage não somente com a nefrina, mas também com a proteína associada ao CD2 (CD2AP), que apresenta função fundamental para a manutenção do podócito e da BFG (45). Alterações em qualquer um desses componentes pode originar

proteinúria de origem glomerular, levando à uma maior passagem de albumina e proteínas de alto peso molecular através da BFG (46).

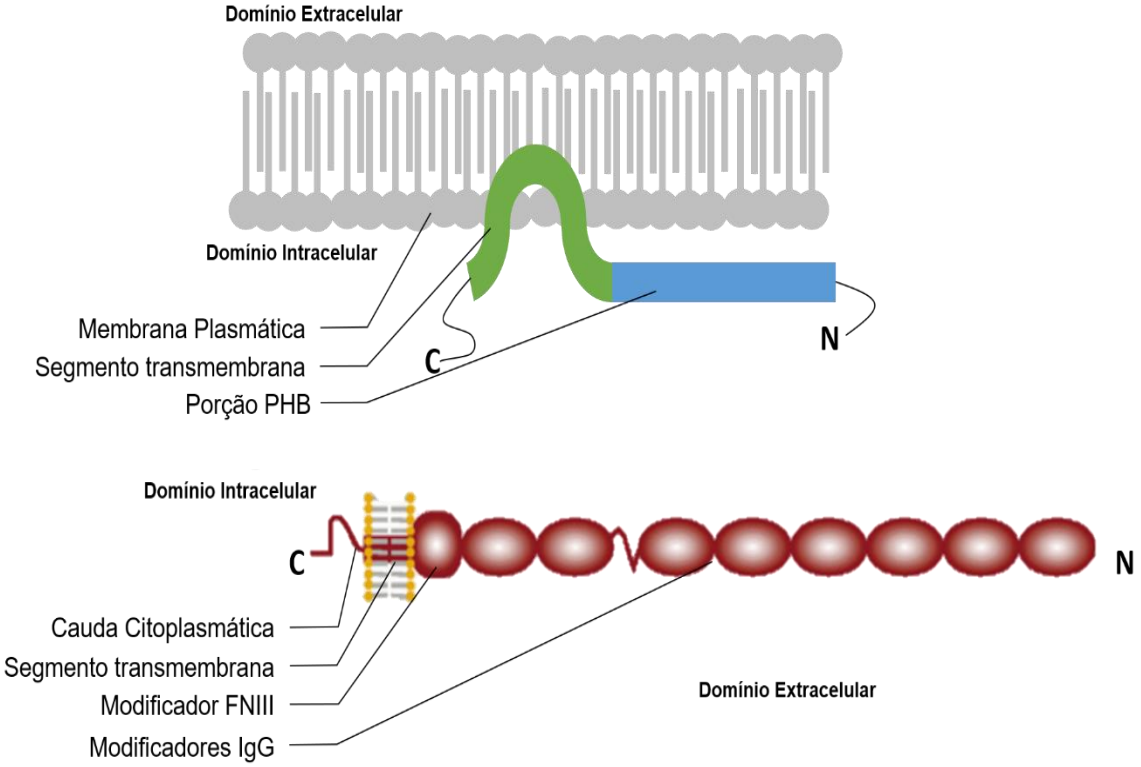

Figura 4. Representação das estruturas da podocina (cima) e da nefrina (baixo). A podocina possui uma estrutura de grampo com as duas caudas N e C terminal voltadas para o domínio intracelular, uma porção transmembrana e uma porção homóloga à proibitina (PHB). A nefrina possui uma cauda C-terminal voltada para o domínio intracelular, uma porção transmembrana, e no domínio extracelular, uma porção semelhante à fibronectina tipo III (FNIII) e 8 porções semelhantes à IgG conectadas à cauda N-terminal. Adaptado de Pattraka, 2007 (38).

1.2.2. Mecanismo de Endocitose Mediada por Receptores

Após o processo de filtração realizado no glomérulo, as proteínas seguem para o espaço urinário e se deslocam para a primeira porção do túbulo proximal renal. Diversas proteínas de baixo peso molecular deverão atravessar toda a extensão do túbulo, dirigindo-se para as porções finais junto ao ultrafiltrado para serem excretadas. Em condições fisiológicas, menos de 1%

das moléculas de albumina e outras proteínas maiores filtradas pela BFG estarão presentes na urina, por serem reabsorvidas quase por completo no segmento tubular proximal pelos mecanismos de endocitose.

Na membrana apical das células epiteliais presentes no túbulo proximal renal, estão presentes receptores endocíticos que são internalizados ao entrarem em contato com proteínas. Esses receptores estão altamente expressos em microdomínios ricos em clatrina e também presentes em baixos níveis nas microvilosidades dessas células (47,48). As vesículas internalizadas contendo o complexo receptor/albumina são transferidas ao endossoma precoce de pH levemente ácido (aproximadamente 6,5), para que ocorra a separação do receptor e da sua respectiva proteína internalizada. Os receptores retornam então, para a membrana plasmática através de vesículas de reciclagem, enquanto a albumina é transportada para o endossoma tardio, para se fundir a um lisossomo, e ser degradada. Por fim, o conteúdo degradado será liberado no interior da célula ou retornará para a corrente sanguínea em direção à circulação sistêmica através da membrana basolateral.

Alguns grupos de pesquisa apontam que a reabsorção de albumina pelas células tubulares pode ser muito superior àquela estimada (49). Esses estudos se baseiam na limitação da capacidade da célula em degradar as proteínas antes de devolvê-las para a corrente sanguínea, propondo que estas células sejam capazes de realizar a maior parte da reabsorção tubular através da passagem direta da albumina intacta da membrana apical para a basolateral (50,51).

Em ambos os casos, a endocitose da albumina requer necessariamente

um complexo macromolecular que inclui, principalmente, a presença dos receptores megalina e cubilina (Figura 5).

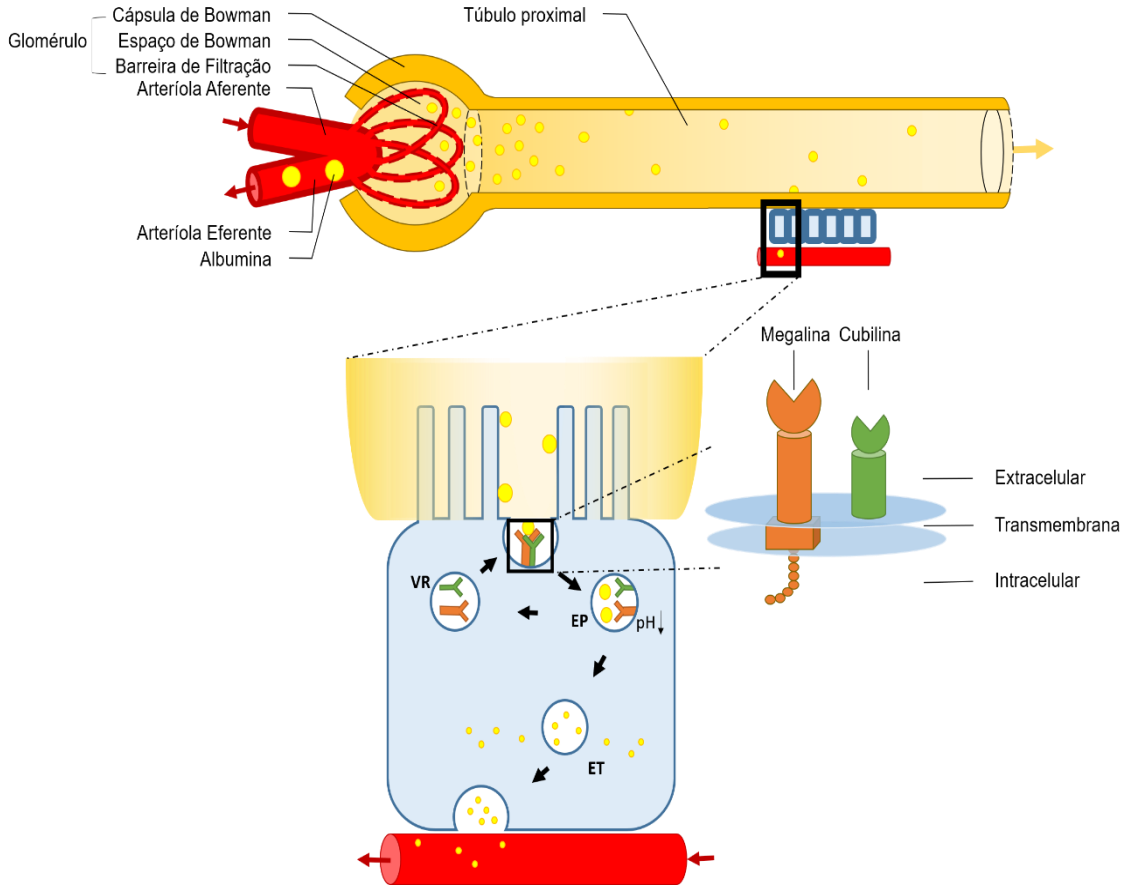

Figura 5. Manuseio renal da albumina. Macromoléculas não conseguem passar pela BFG, enquanto que moléculas de baixa massa molecular e de cargas menos negativas atravessam o glomérulo facilmente, chegando ao túbulo proximal onde são captadas por receptores megalina (laranja) e cubilina (verde). A internalização por endocitose é seguida pelo transporte para o Endossoma Precoce (EP), onde ocorre a dissociação do complexo receptor/albumina em pH ácido. Os receptores endocíticos retornam para a membrana apical por vesículas de reciclagem (VR), ao passo que ocorre a degradação da albumina no Endossoma Tardio (ET), regressando para a corrente sanguínea pela membrana basolateral, ou sendo liberado no interior da célula. As setas vermelhas indicam o sentido do sangue, enquanto que a amarela indica o sentido da urina. Adaptado de Moestrup & Verroust, 2001 (52).

Em condições patológicas, onde há o extravasamento de macromoléculas para o túbulo, o mecanismo endocítico aumentará ao máximo

seu trabalho, na tentativa de captar esse excesso de proteínas até que este maquinário esteja totalmente sobrecarregado. O excesso de proteínas presentes nos segmentos subjacentes provocará a estimulação de citocinas e quimiocinas inflamatórias. Este estímulo recrutará macrófagos para o local e estas células produzirão quimiocinas como a proteína de quimioatração de monócitos (MCP1). Por conseguinte, outras células do sistema imune serão atraídas a esta porção do néfron, culminando no bloqueio deste sítio e obstrução da passagem do filtrado. Este evento, promove a injúria sustentada do epitélio tubular renal. Se mantido o dano, haverá a substituição do tecido epitelial por tecido mesenquimal, com ativação de fibroblastos intersticiais e cicatrização através da produção de fator de crescimento e transformação beta (TGF-β), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e fibras de colágeno levando ao desenvolvimento de fibrose intersticial - (53,54) e à perda gradativa da função tubular renal (55).

1.2.2.1. Cubilina

A Cubilina (Figura 5) é uma proteína periférica de massa molecular aproximada de 460 kDa (56). Inicialmente, foi identificada como um fator intrínseco do receptor para vitamina B12 (57), mas atualmente, sabe-se que esta proteína se encontra altamente expressa no aparato endocítico do túbulo proximal e nos mesmos compartimentos que a proteína megalina. Mutações no gene que codifica a cubilina causam anemia megaloblástica hereditária 1 e síndrome de *Imerslund-Gräsbeck*, patologias associadas à deficiência na absorção seletiva de vitamina B12 e aumento na proteinúria (58), também evidenciando a importância desse receptor no manuseio renal de proteínas.

Acredita-se que esta glicoproteína deve obrigatoriamente formar um complexo com a megalina para que possa desempenhar seu papel como receptor de albumina e outras proteínas (59,60) devido à ausência de uma porção intracelular, estando somente ancorada à membrana através de seu domínio N-terminal.

1.2.2.2. Megalina

A megalina é uma lipoproteína da família de receptores de LDL de massa molecular de 600 kDa com três domínios, sendo a cauda C-terminal localizada dentro da célula, uma porção transmembrana e a maior parte extracelular extremamente importante para a captação de proteínas ao longo do túbulo (Figura 5). Sabe-se que camundongos *knockout* para o gene codificador da megalina apresentam elevada excreção tanto de albumina quanto de outras proteínas de baixo peso molecular como o proteína a de ligação ao retinol 4 (RBP4) (61), hipótese corroborada através de estudos clínicos com pacientes portadores da Síndrome de *Donnai-Barrow*, doença hereditária recessiva e rara (62).

Nota-se também que animais com DM2 apresentam redução da expressão de megalina desde os estágios iniciais da doença (63), sugerindo que a função desse receptor possa estar prejudicada em pacientes com Nefropatia Diabética (ND) incipiente, por apresentarem excreção exacerbada de proteínas de baixo peso molecular (64), também conhecida como proteinúria de origem tubular. Ademais, pacientes com ND tratados com o inibidor da dipeptidil peptidase 4 (DPP4) apresentaram efeitos antiproteinúricos (65,66).

1.3. Inibidores da DPP4

A necessidade de novas terapias para o tratamento da DM2 motivou pesquisadores a buscarem uma abordagem diferenciada para melhorar a qualidade de vida dos pacientes diabéticos. Inicialmente, os métodos convencionais visavam a utilização de drogas diretamente estimuladoras tanto da produção, quanto da liberação de insulina pelas células β-pancreáticas, como a metformina e sulfonilureias.

Após a constatação de que existiam hormônios intestinais com potentes implicações na homeostase da glicose pós-prandial, a indústria farmacêutica deu ênfase para drogas capazes de melhorar o efeito incretina em pacientes diabéticos. Este efeito incretina é definido como a resposta do trato gastrointestinal à ingestão de alimentos potencializando a secreção de insulina pelo pâncreas. Os principais agentes responsáveis por esse efeito são o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP) que são rapidamente clivados e inativados pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP4).

Sabendo que pacientes com DM2 apresentam diminuição acentuada de GLP-1 no estado pós-prandial (67) em decorrência de maiores níveis de DPP4, o que, à longo prazo, contribui para o agravamento da doença (68), levou-se ao desenvolvimento dos inibidores da DPP4. Esta nova classe de medicamentos anti-hiperglicemiante é capaz de prolongar o tempo de meia vida destes hormônios a partir da inibição da enzima DPP4 e consequentemente, aumentar o período do efeito incretina. Na Tabela 1, encontram-se os primeiros inibidores da DPP4 aprovados pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e utilizados no Brasil.

Tabela 1. Lista dos principais inibidores da DPP4 atualmente utilizados para o tratamento da DM2 no Brasil.

Denominação Química	Denominação Comercial	Companhia Farmacêutica
Sitagliptina	Januvia® (25mg, 50mg e 100mg) Janumet® (50/500mg, 50/850mg e 50/1000mg)	Merck Sharp& Dohme
Vildagliptina	Galvus® (50mg) Galvus Met® 50/500mg, 50/850mg e 50/1.000mg)	Novartis
Saxagliptina	Onglyza® (2,5mg, 5mg)	Bristol-Myers Squibb
Linagliptina	Trayenta® (5mg)	Boehringer Ingelheim
Alogliptina	NESINA® (6,25mg, 12,5mg e 25mg)	Takeda Pharma

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2016.

Em outubro de 2006, a sitagliptina tornou-se o primeiro inibidor da DPP4 que obteve a aprovação do FDA *(Food and Drug Administration*) para o tratamento da DM2 (69) (Tabela 1). Este inibidor demonstrou excelente seletividade e eficácia *in vivo*, sendo utilizado em monoterapia ou associado a outros medicamentos como a metformina (Janumet®) até os dias atuais. Em indivíduos saudáveis, a sitagliptina é rapidamente absorvida pelo organismo e apresenta picos de concentração plasmática entre 1 e 4 horas após a administração. A meia vida deste composto é de aproximadamente 12,4 horas e sua eliminação ocorre principalmente por via renal (87%), envolvendo uma secreção tubular ativa, possivelmente via isoforma 3 do transportador aniônico

orgânico humano (hOAT3) e pelas fezes (13%) (70). Seus efeitos anti-hiperglicêmicos ocorrem em decorrência da interação entre o composto da sitagliptina e a estrutura da enzima DPP4 (71). A partir de cristalografia de raios-X, foi possível documentar e descrever como ocorre esta interação (Figura 6).

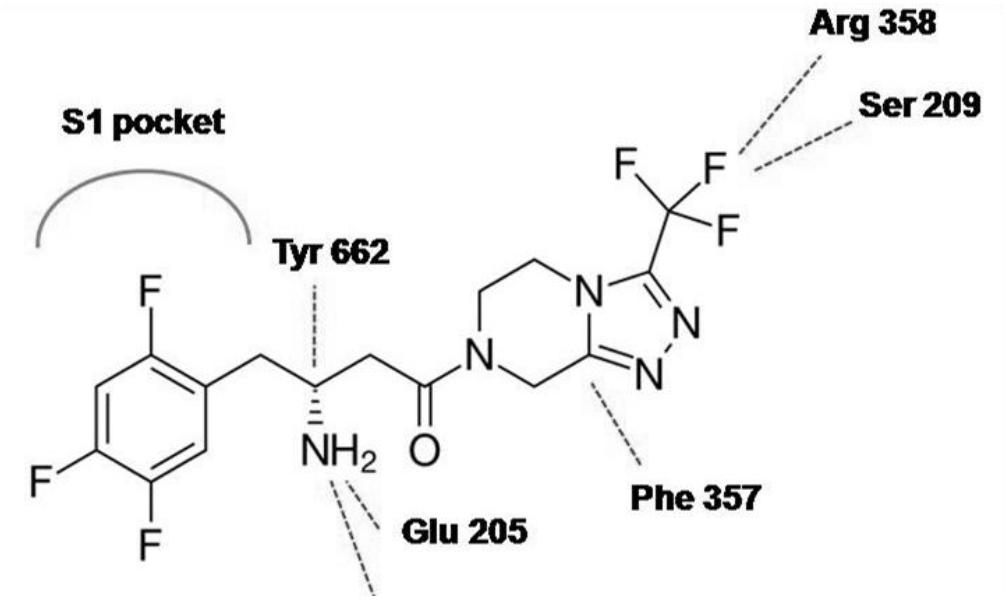

Figura 6. Molécula do composto de fosfato de sitagliptina e sua interação com a DPP4. A região com o grupo trifluorfenil ocupa a região S1 da DPP4, enquanto que o trifluormetil interage com as cadeias laterais dos resíduos de Arg 358 e Ser 209 da enzima. O grupo amino entra em contato com os Tyr 662 e com os grupos carboxilados de dois resíduos de glutamato, o Glu 205 e Glu 206. O grupo triazol piperazina colide com o grupo fenil do resíduo Phe 357. Adaptado de Pei *et al*, 2008 (71).

Estudos pré-clínicos revelaram que o aumento da biodisponibilidade do GLP-1, GIP e de outros peptídeos também clivados pela DPP4, como o peptídeo natriurético cerebral (BNP) e o fator 1α derivado do estroma (SDF-1α) também geram ações renais benéficas, sugerindo que os inibidores da DPP4 podem atuar muito além do benefício glicêmico, com atividades vasoativas e

renoprotetoras (72,73). Além disso, ensaios clínicos demonstraram que os inibidores da DPP4 possuem alta eficácia se comparados aos antidiabéticos clássicos, por terem uma boa tolerância associado com baixos efeitos colaterais ou crises de hipoglicemia (74).

Os efeitos renoprotetores dos inibidores da DPP4 também foram observados em camundongos com DM2 induzida por estreptozotocina. Neste modelo, o tratamento com linagliptina melhorou significativamente a estrutura e função dos rins através do bloqueio da atividade e expressão de TGF-β2, um fator pró-fibrótico, e diminuição significativa da excreção urinária de albumina (75). Em somatória, estudos com pacientes com normo, micro e macroalbuminúria demostraram que a administração dos inibidores da DPP4 apresentam efeito anti-proteinúrico (76–78). Ademais, outros estudos experimentais com uso de IDPP4 em modelos de DRC não associados à hiperglicemia documentaram a redução da atividade inflamatória renal, e da disfunção glomerular e tubular (79,80). Estes estudos salientam a eficácia e segurança da administração de inibidores da DPP4 em pacientes com DRC, bem como sugerem que estes agentes podem exercer ações renoprotetoras associadas ou não com as ações anti-hiperglicêmicas da classe das gliptinas.

1.4. Modelo experimental de Doença Renal Crônica independente de hiperglicemia – A Nefrectomia 5/6

A nefrectomia 5/6 é um modelo cirúrgico de DRC independente de hiperglicemia que mimetiza os estágios avançados encontrados no cotidiano médico com um alto grau de reprodutibilidade (81). As alterações iniciais oriundas da remoção cirúrgica de 5/6 da massa total renal levam à ativação de vias hipertróficas tanto da estrutura quanto de função dos néfrons

remanescentes (82). Esse processo compensatório levará à diversas modificações, dentre elas, nos níveis pressóricos, bem como no aumento da proteinúria e na queda do RFG.

Outros modelos de injúria renal comuns na pesquisa básica que também procuram mimetizar os danos encontrados na clínica utilizam substâncias nefrotóxicas misturadas à ração dos animis como a ciclosporina ou adenina, ou ainda intravenosas como adriamicina (83–85). Porém, tais modelos apresentam certas desvantagens quando comparadas à técnica de nefrectomia 5/6, como dificuldades quanto à estabilidade e avanço da insuficiência renal, além de poder gerar efeitos colaterais diversos (86).

De fato, a cirurgia de nefrectomia não representa o padrão progressivo na perda da função renal encontrado na população acometida pela DRC em geral devido à abrupta mudança na massa renal. Porém, ainda sim, parece ser um dos modelos cirúrgicos mais confiáveis para indução de DRC existentes atualmente. Esse modelo é oriundo de diversos estudos anteriores com outras frações de remoção do rim, como a nefrectomia unilateral, a nefrectomia total de um dos rins mais metade do outro rim e ainda a nefrectomia total de um dos rins mais ¾ do outro. De todos estes modelos de cirurgias realizadas em modelos animais, o que mais obteve sucesso em gerar alterações adaptativas estruturais e funcionais semelhantes aos processos patológicos aos encontrados na DRC foi o de nefrectomia 5/6.

Sabe-se que a DPP4 circulante se encontra aumentada em algumas patologias como DM2 e IC. Entretanto, não há descrição do aumento da atividade desta peptidase circulante ou renal na DRC, tampouco se o aumento dos níveis desta enzima se correlaciona com a severidade da doença renal.

Perante o exposto a cima, nosso estudo se propõe a investigar os mecanismos subjacentes ao efeito anti-proteinúrico dos inibidores da DPP4 na DRC em modelo de nefrectomia 5/6 não associada à hiperglicemia, bem como relacionar a excreção urinária de DPP4 como um possível biomarcador associado com a progressão da DRC.

2. OBJETIVOS

2.1. Testar a hipótese de que a inibição da DPP4 desempenha efeito anti-proteinúrico por atenuar a redução da expressão de proteínas constituintes da BFG e dos componentes do mecanismo de endocitose mediada por receptores em túbulo proximal.

2.2. Testar a hipótese de que a DPP4 urinária pode ser um possível biomarcador relacionado com a progressão da DRC.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Modelo Nefrectomia 5/6

Todos os procedimentos executados foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP, sob o protocolo de pesquisa 003/16. Os princípios éticos sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram seguidos minuciosamente.

Ratos Wistar com dois meses de idade e pesando aproximadamente 250 ± 50 g foram comprados no biotério de produção de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e mantidos no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

O biotério onde os ratos foram alojados dispôs de controle de temperatura (22ºC), de umidade (60%) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todo o material em contato com os animais foi auto clavado, água filtrada e ração controlada da marca *Nuvilab*® CR-1. Não houve restrição do acesso à água ou comida, com exceção dos períodos de jejum para a coleta de sangue.

A indução da DRC foi realizada em colaboração com a Profª Drª Maria Heloisa Massola Shimizu, seguindo um protocolo padrão (87). Os ratos foram submetidos à nefrectomia 5/6, sob anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (50 mg/Kg), via intraperitoneal. Após a laparotomia, os pedículos renais foram observados e foi realizada uma ligadura da artéria renal do rim direito com posterior remoção deste. A seguir duas das artérias segmentares do rim esquerdo foram coartadas com fio *mononylon* 6-0,

impedindo a perfusão de dois terços deste rim. O resultado desta cirurgia é o comprometimento de 5/6 da massa renal total (Figura 7).

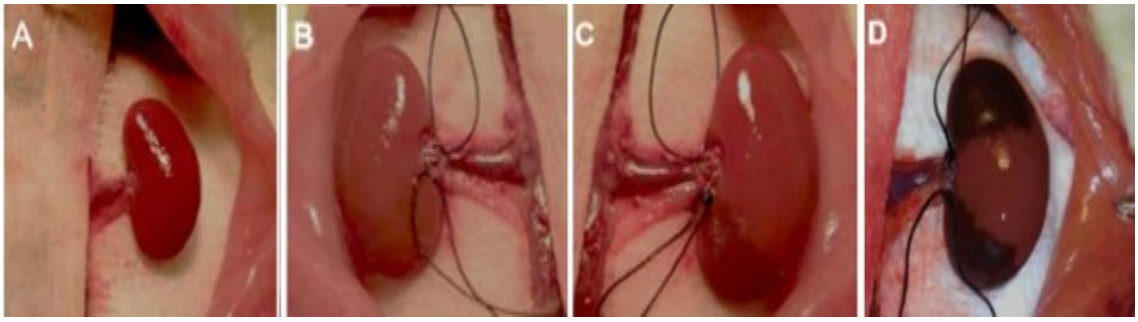

Figura 7. Imagens da cirurgia da nefrectomia 5/6. (A). Indicação do estado pré-cirúrgico. (B) Ligadura da artéria renal do rim direito e posterior remoção deste. (C) O fluxo de sangue é interrompido em duas artérias segmentares do rim esquerdo, impedindo a perfusão tecidual no órgão e culminando no prejuízo de 5/6 da massa renal. (D) Indicação do estado após a cirurgia de ablação dos rins restando somente a circulação de 1/6 do rim esquerdo (87).

3.1.1. Grupos experimentais

Após o procedimento cirúrgico da nefrectomia 5/6 ou somente laparotomia, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o procedimento cirúrgico e com o tipo de tratamento a ser administrado, sendo eles:

3.1.1.1. SHAM + V: Ratos submetidos à laparotomia, porém sem sofrer remoção do rim direito ou coartação das artérias segmentares esquerda, e tratados com veículo (água) durante 60 dias.

3.1.1.2. SHAM + IDPP4: Ratos submetidos à laparotomia, porém sem sofrer remoção do rim direito ou coartação das artérias segmentares esquerda, e tratados com o inibidor da DPP4, sitagliptina, durante 60 dias (200 mg/kg/12h).

3.1.1.3. NX + V: Ratos submetidos à nefrectomia 5/6 e tratados com veículo (água) durante 60 dias.

3.1.1.4. NX + IDPP4: Ratos submetidos à nefrectomia 5/6 e tratados com o inibidor da DPP4, sitagliptina, durante 60 dias (200 mg/kg/12h).

Após o período de tratamento, os ratos foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (50 mg/kg) intraperitoneal e tiveram o rim removido e armazenado em tampão específico. Por fim, os ratos foram eutanasiados por deslocamento da cervical. As carcaças dos ratos foram mantidas em câmara fria localizada no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, embaladas em sacos específicos para o descarte de material biológico. O recolhimento foi realizado pela prefeitura de São Paulo e conduzido até o local para sua incineração.

O preparo da solução com sitagliptina foi realizado diariamente. Comprimidos contendo 100 mg de fosfato de sitagliptina foram diluídos em água, seguindo a proporção necessária para que a dose administrada para cada rato fosse de 200 mg/kg/12h. O tubo com os comprimidos e água foi deixado em refrigerador (4ºC) por aproximadamente uma hora, para dissolução completa do medicamento. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi retirado e guardado para a administração via oral, por meio de gavagem nos ratos, enquanto que o *pellet* foi descartado.

3.1.2. Desenho experimental

A figura 8 ilustra o desenho experimental do estudo em questão, demonstrando a sequência temporal de procedimentos adotados.

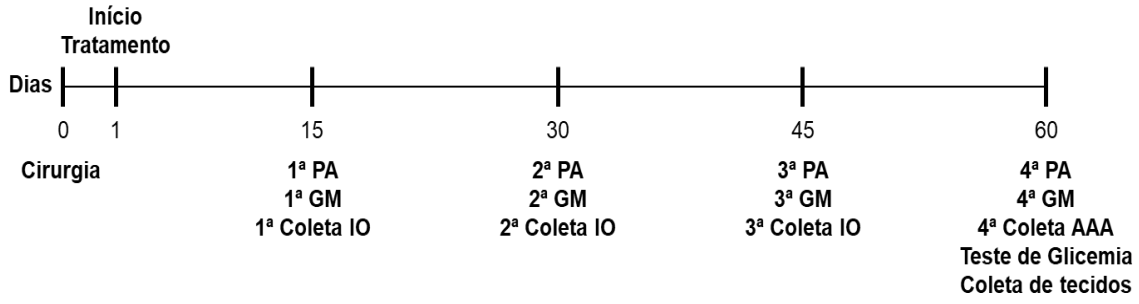

Figura 8. Desenho experimental com sequência temporal, em dias, do estudo e os procedimentos adotados. AAA = Artéria Aorta Abdominal, GM = Gaiola Metabólica, IO = Infra Orbital e PA = Pressão Arterial.

3.2. Acompanhamento do peso corpóreo e do ganho de peso

O acompanhamento do peso corpóreo ocorreu duas vezes por semana, sendo calculado o ganho de peso multiplicando o peso final por cem e dividindo pelo peso inicial do rato. O resultado foi subtraído por 100 indicando a porcentagem de ganho de peso de cada rato durante o período.

3.3. Aferição indireta da pressão arterial caudal

A aquisição de dados de pressão arterial (PA) caudal foi realizada utilizando o aparelho BP-2000 *Blood Pressure Analysis System*™ (*Visitech Systems, Inc*.). O aparelho de pletismografia de cauda consiste em uma plataforma aquecida com controle de temperatura (38ºC), túneis para a contenção dos ratos e manguitos de borracha acoplados a um transdutor de pulso (sensor) capaz de captar sinais e enviá-los ao software do computador. Para a realização do experimento e aquisição dos valores, foi necessário fazer a adaptação dos ratos por três dias, seguido de duas aferições oficiais. Além da adaptação, a calibração do aparelho antes de qualquer mensuração também foi feita. As aferições oficiais só ocorrem após a estabilização dos

sinais de pulso e frequência cardíaca. Por isso, em média, as 10 primeiras medidas de cada dia foram descartadas e aceitamos como valores adequados uma sequência mínima de dez medidas repetidas e próximas, para então realizar a média dos valores obtidos e considerar um valor de PA sistólica.

3.4. Avaliação da função renal

Quinzenalmente após as cirurgias, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas (*Tecniplast, Buguggiate,* VA, Italy) por um período de 24 horas de adaptação seguidas de 24 horas de coleta de urina e monitoramento do consumo de água e ração. A urina coletada foi centrifugada por 20 minutos a 4000 rpm.

A concentração da excreção de proteínas totais na urina foi avaliada utilizando o kit Sensiprot, *LabTest* (Lagoa Santa, MG). A reação foi feita em duplicata e de acordo com as instruções do fornecedor. Os valores obtidos foram padronizados pelo fluxo urinário e pelo peso corporal dos ratos, sendo este resultado expresso em mg/dia/kg. Por fim, os valores de proteína excretada foram corrigidos pelos valores de creatinina, visando minimizar as diferenças no RFG e as perdas urinárias que podem resultar em valores subestimados. A análise desde dado foi realizada a cada 15 dias para acompanhar a progressão da proteinúria em nossos ratos. Os demais dados foram apresentados com as amostras coletadas no último período.

O fluxo urinário foi calculado a partir do volume urinário padronizado pelo tempo de coleta e pelo peso do rato. Os resultados foram expressos em mL/kg/24h. Os consumos de ração e água foram calculados a partir da

subtração do peso do pote e da mamadeira no final pelo peso no início da gaiola. Esta medida foi padronizada pelo tempo de gaiola e pelo peso do rato. Os resultados foram expressos em mg/kg/24h e mL/kg/24h respectivamente. Para esse experimento, considerou-se 1 mL equivalente ao peso de 1 g de água.

Ademais, os ratos foram submetidos a jejum de aproximadamente 8 horas e posterior coleta de sangue arterial do plexo retro orbital. O sangue foi depositado em tubos BD *Vacutainer® SST®II Advance® Franklin Lakes*, NJ e levemente agitados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm. O soro foi coletado, aliquotado em microtubos e por fim, armazenados em freezer -80ºC para posteriores análises bioquímicas.

O RFG foi estimado por meio do cálculo da depuração da creatinina endógena. Deste modo, multiplica-se o fluxo urinário pela concentração urinária de creatinina (mg/dL) e divide-se este resultado pela concentração de creatinina no plasma (mg/dL). Os resultados foram expressos em mL/kg/min. As concentrações de creatinina urinária e plasmática foram determinadas por um método *end-point* e cinético respectivamente, empregando um kit colorimétrico da *Labtest* (Lagoa Santa, MG), em duplicata, seguindo as instruções do fornecedor. Ao final do experimento, as absorbâncias das amostras foram obtidas a partir de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm para creatinina.

3.5. Preparação de homogenato de rim

O rim esquerdo foi removido, descapsulado e a região com fibrose foi

retirada e descartada logo após sua remoção. A porção restante foi coletada e processada em tampão PBS gelado (150 mM NaCl, 2,8 mM fosfato de sódio monobásico, 7,2 mM fosfato de sódio dibásico, pH 7,4) contendo inibidores de protease, pepstatina (0,7 ug/ml), leupeptina (0,5 µg/mL), PMSF (40 µg/mL) e os inibidores de fosfatase, fluoreto de sódio (15 mM) e pirofosfato de sódio (50 mM). Em seguida, foi utilizado o homogeneizador de tecidos *Polymix® PX-SR 50E* (Kinematica, AG, Suíça) para homogeneizar cada amostra. O homogenato foi aliquotado em microtubos e armazenado em freezer -80°C.

3.6. Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em homogenato de rim foi realizada seguindo o protocolo descrito por Lowry (88). O método se baseia na adição de 5 µL de amostra em uma solução contendo hidróxido de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de cobre e tartarato de sódio. A reação consiste na redução de constituintes da solução de *Folin-Ciocalteau* em presença do cobre quando a solução apresenta pH alcalino, resultando em uma coloração azul em que a maior intensidade da cor reflete a maior presença de proteínas na amostra. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 750 nm.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de homogenato de rim e urina foram diluídas em 50 µL de tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; SDS 10,0%; 20% glicerol; 1,96% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol). Adicionou-se também a

corrida um padrão de massa molecular (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope, Bio-Rad*) para servir de parâmetro para o peso das demais proteínas na mesma altura.

As proteínas diluídas em tampão de amostra foram depositadas em poços de gel de empilhamento 3% e espessura de 1,5 mm de poliacrilamida contendo 10 % SDS (89). A separação das proteínas ocorreu em um gel de acrilamida na concentração de 7,5% para amostras de homogenato de rim ou de 10% para amostras de urina, também contendo 10% SDS. Por fim, o gel foi imerso em tampão de (25 mM Tris-base; 192 mM glicina, 10% metanol, pH 7,4) e deixado *overnight* para separação das proteínas de acordo com o tamanho molecular. A corrente foi fixada em 7 mA para cada gel. A corrida foi interrompida de acordo com o peso molecular das proteínas de interesse tomando como referência o padrão de massa molecular.

3.8. *Immunoblotting*

Após a corrida em gel de SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (*Immobilom-P Transfer Membrane, Millipore*) overnight. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio contendo 150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; leite em pó desnatado 5% e Tween-20 0,1%. A membrana ficou no máximo uma hora nesta solução de bloqueio, sendo incubada em sequência com o anticorpo primário de interesse já previamente diluído e preparado. A incubação ocorreu overnight a 4°C sob leve agitação.

No dia seguinte, a membrana foi lavada com a solução de bloqueio por

aproximadamente 10 minutos por cinco vezes e posteriormente, mergulhada em solução com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) diluído por mais uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita mais cinco lavagens como descrito acima. Então, houve a troca da solução citada por PBS 1x para retirar o excesso da solução de bloqueio por duas vezes, por um minuto cada. Em seguida, adicionou-se solução caseira de ECL com 150 mM Tris HCl pH 8,9, 250 mM luminol (diluído em DMSO), 0,4 mM ácido *p*-cumárico (diluído em DMSO) e 30% peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich Cat: H1009) para reação de imunodetecção através de quimioluminescência. Por fim, a membrana foi colocada em um fotodocumentador (GE *Health Care*) para poder visualizar as bandas marcadas, capturadas pelo programa *Image Quant* LAS 4000 (GE *Health Care*) e analisadas por densitometria através do software Image J (*Scion*). A tabela abaixo mostra a lista de anticorpos utilizados no projeto.

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados.

Anticorpo	Empresa	Lote	Diluição (v/v)	Peso molecular (~kDa)
DPP4 (clone 5E8)	Santa Cruz Biotechnology	sc - 52642	1:1000	110
Nefrina	Abcam	Ab 58968	1:1000	100
Podocina	Santa Cruz Biotechnology	sc - 21009	1:1000	42
Megalina	Doação Yale University	-	1:50000	600
Cubilina	Santa Cruz Biotechnology	sc - 20609	1:1000	460

RBP-4	Sigma	Srp - 6038	1:1000	22
GAPDH	Abcam	Ab 22555	1:5000	37
HPR-*goat*-anti *mouse* IgG	Life Technologies Corporation	# 62-6520	1:2000	-
HPR-*goat*-anti *mouse* IgM	Life Technologies Corporation	# 31440	1:2000	-
HPR-*goat*-anti *rabbit* IgG	Life Technologies Corporation	# 31460	1:2000	-

3.9. Coloração do gel SDS-PAGE com nitrato de prata

A coloração das proteínas separadas de acordo com o peso molecular em SDS-PAGE por nitrato de prata foi realizada seguindo o protocolo estipulado pelo fabricante do kit *Proteo Silver® Plus Silver Stain* (Sigma-Aldrich). O experimento consiste na utilização de nitrato de prata que se liga as proteínas em solução neutra ou levemente ácida. Esta ligação gera uma redução destes íons pelo formaldeído em solução alcalina, formando assim uma mancha “prata metálica” visualizada no gel.

3.10. Ureia sérica

As concentrações plasmáticas de ureia foram medidas quinzenalmente utilizando o kit da Labtest (Lagoa Santa, MG) e seguindo as informações sugeridas pelo fabricante. A análise foi realizada por método colorimétrico e a absorbância foi analisada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de

600 nm.

3.11. Mensuração de glicemia em jejum

No último dia do tratamento, a glicose plasmática foi medida em ratos de jejum de 8 horas aproximadamente. A concentração de glicose no sangue foi medida instantaneamente com tiras teste e aparelho Accu-Check Performa® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

3.12. Determinação da atividade catalítica da DPP4

A atividade da enzima DPP4 foi avaliada em soro e rim por método colorimétrico a partir da liberação de nitroanilina, resultante da hidrólise do composto tosilato de glicil-prolil-p-nitroanilida. Para tal, foi adicionado em duplicatas a quantidade de 15 µL de plasma ou homogenato de rim diluído em 185 µL de tampão Tris HCL (10 mM pH 8,0) contendo 4 mM de substrato da DPP4 glicil-prolil-p-nitroanilida (Bachem). As duplicatas permaneceram por 1 hora em banho-maria a 37ºC e então, foi adicionado 500 µL de tampão acetato (1 mMol/L pH 4.2) com o objetivo de parar a reação. A liberação enzimática da p-nitroanilina foi determinada pela leitura em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 405 nm. O resultado da atividade enzimática da DPP4 está expresso como densidade óptica do plasma (DO/mL) ou proteína (DO/mg).

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (teste ANOVA) de duas vias e pós teste de Tuckey. O nível de significância estabelecido para os valores foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1.1. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre os parâmetros de peso corpóreo e função renal.

Com a finalidade de confirmar a indução de DRC nos ratos utilizados neste estudo, realizamos análises de função renal e acompanhamento de parâmetros biométricos.

Na tabela 3, é possível observar que a cirurgia de nefrectomia 5/6 diminuiu significativamente a porcentagem de ganho de peso e o RFG final, bem como aumentou o peso do rim esquerdo, o fluxo urinário e o consumo de água dos ratos Nx + V quando comparados ao respectivo grupo controle (Sham + V). O ganho de peso dos ratos induzidos à cirurgia e ao tratamento com sitagliptina (Nx + IDPP4) foi estatisticamente semelhante aos ratos não submetidos à cirurgia (Sham + V e Sham + IDPP4), indicando que o tratamento com inibidor da DPP4 teve uma possível atuação no peso dos ratos. Além disso, é possível observar que o tratamento com sitagliptina foi capaz de atenuar a queda no RFG nos ratos submetidos a nefrectomia 5/6. Ademais, o tratamento com inibidor da DPP4 não mostrou diferença estatística entre os ratos nefrectomizados em relação aos outros parâmetros.

Tabela 3. Parâmetros de peso corpóreo e de função renal dos ratos nefrectomizados tratados com sitagliptina ou veículo.

Parâmetros	Sham + V	Sham + IDPP4	Nx + V	Nx + IDPP4
Peso Corpóreo Inicial *g*	193 ± 4 (16)	192 ± 6 (10)	198 ± 4 (16)	202 ± 3 (16)
Peso Corpóreo Final *g*	323 ± 7 (10)	350 ± 15 (7)	311 ± 12 (10)	340 ± 7 (9)
Ganho de Peso Corpóreo *%*	74 ± 3[a] (10)	83 ± 5[a] (7)	52 ± 6[b] (10)	68 ± 3[a] (9)
Peso do Rim/Peso Corpóreo *g/Kg*	3.3 ± 0.1[a] (10)	3.4 ± 0.1[a] (7)	4.5 ± 0.2[b] (10)	4.7 ± 0.2[b] (9)
Fluxo Urinário Final *mL/Kg/dia*	40 ± 4[a] (9)	48 ± 4[a] (8)	89 ± 8[b] (10)	84 ± 16[b] (9)
Consumo de Água Final *mL/Kg/dia*	80 ± 7[a] (9)	79 ± 6[a] (8)	158 ± 14[b] (10)	139 ± 16[b] (9)
Balanço de Água Final *mL/Kg/dia*	40 ± 4 (9)	30 ± 5 (8)	69 ± 13 (10)	55 ± 4 (9)
Consumo de Ração Final *mg/Kg/dia*	58 ± 4 (9)	59 ± 2 (8)	58 ± 6 (10)	68 ± 4 (9)
RFG Final *mL/min/kg*	7.1 ± 0.3[a] (7)	7.5 ± 0.6[a] (7)	2.8 ± 0.4[b] (10)	4.2 ± 0.3[c] (9)

Valores estão expressos como média ± EPM. Número de animais por grupo está indicado entre parênteses. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$).

4.1.2. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre parâmetros de sódio e pressão arterial.

Não encontramos diferença significativa entre os grupos quando analisamos os parâmetros de sódio (Figura 9A, B e C). Porém ao avaliar a pressão arterial caudal desses ratos podemos notar um aumento significativo no grupo nefrectomizado tratado com veículo em comparação ao grupo *sham*. É possível perceber também que a utilização do inibidor da DPP4 nos ratos

nefrectomizados fez com que diminuísse a hipertensão gerada pela cirurgia quando comparado com o grupo Nx + V (Figura 9D).

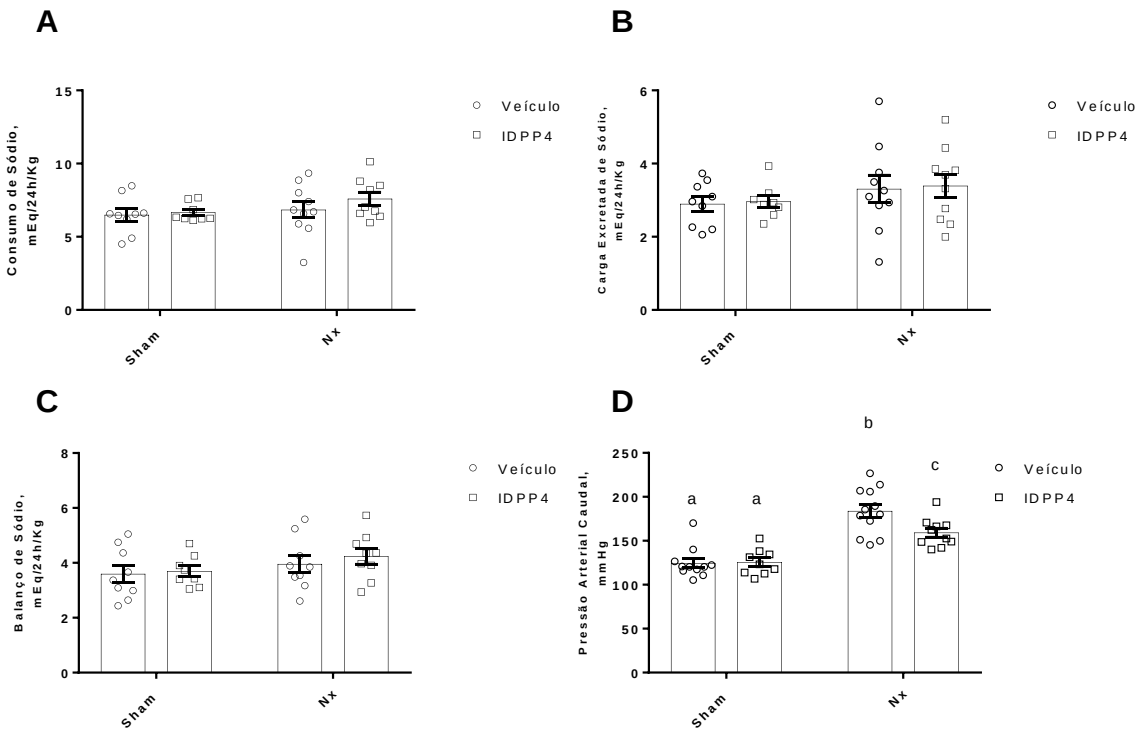

Figura 9. Avaliação dos parâmetros de sódio e pressão arterial caudal. (A) O consumo de sódio foi calculado com base no teor de sódio da ração de roedores e no consumo diário de ração de cada rato. (B) A carga excretada de sódio foi calculada com base nas amostras de urinas de 60 dias após a cirurgia último coleta de 24h. (C) O balanço de sódio foi estimado subtraindo a carga excretada pelo consumo de sódio de cada rato. (D) A pressão arterial foi avaliada indiretamente por método de pletismografia de cauda. A linha preta expressa a média ± EPM de cada grupo. Barras com letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

4.1.3. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a creatinina, ureia e glicose plasmáticas.

Conforme esperado, tanto as concentrações de creatinina e ureia plasmáticas, foram maiores nos ratos nefrectomizados tratados com veículo em comparação ao grupo sham. É possível perceber também que a utilização do inibidor da DPP4 nos ratos nefrectomizados fez com que houvesse menores concentrações tanto de creatinina quanto de ureia plasmática, quando comparado com o grupo Nx tratado com veículo (Figura 10A, B). Todas estas alterações encontradas não estão associadas com diferenças nos níveis glicêmicos, uma vez que não foram encontradas alterações entre os grupos nos valores de glicemia dos ratos em jejum (Figura 10C).

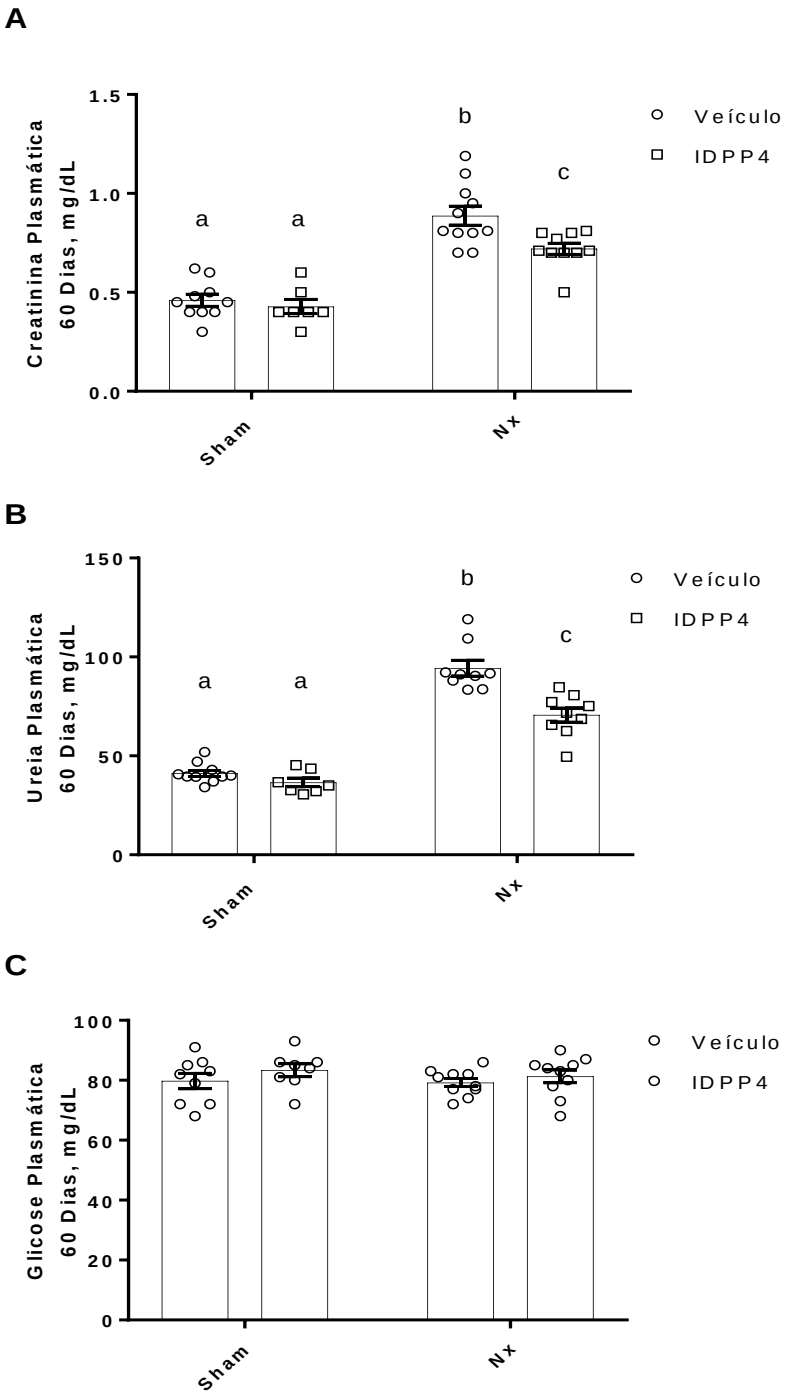

Figura 10. Avaliação da creatinina, ureia plasmáticas e glicemia. (A) A creatinina plasmática foi calculada a partir de ensaio colorimétrico por método cinético em comprimento de onda de 510 nm. (B) A ureia plasmática foi mensurada por meio de ensaio colorimétrico por método de *end-point* com comprimento de onda de 600 nm. (C) A glicemia foi medida em jejum de 8 horas aproximadamente utilizando fitas glicêmicas *accu-check*. Número de animais representado em *scatter dot plot* no respectivo grupo. A linha preta expressa a média ± EPM de cada grupo. Barras com letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

4.1.4. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a excreção de proteínas totais.

Com o aumento da pressão arterial encontrado nos ratos nefrectomizados, ocorre, em paralelo, o aumento da pressão intraglomerular no rim. Este aumento, por sua vez forçaria a passagem de moléculas pelo néfron levando ao aumento da excreção de proteínas na urina. Sendo assim, verificamos se os ratos nefrectomizados tratados com veículo apresentariam elevação da proteinúria ao longo do tempo quando comparados ao grupo sham e se o tratamento com sitagliptina modularia o padrão de excreção de proteínas. Podemos observar que o grupo Nx + V tem um aumento progressivo nos valores de proteinúria quando comparados com os grupos sham a partir de 30 dias após a cirurgia. Também observamos que o tratamento com grupo IDPP4 retardou o aumento exacerbado de proteinúria até a partir de 45 dias quando comparado com os animais Nx + V, mantendo-se até o final do tratamento (Figura 11A).

A partir deste resultado, decidimos investigar a possível origem dessa proteinúria exacerbada nos ratos Nx + V, considerando que poderia ser oriunda de modificações glomerulares ou tubulares. Utilizando a técnica de *Silver Stain* com amostras de urina padronizadas com 3 µg de creatinina para cada amostra, podemos visualizar o padrão de excreção de proteínas na urina dos ratos. Constatamos o aumento progressivo na proteinúria dos ratos nefrectomizados tratados com veículo. É possível perceber também que os ratos Nx + IDPP4 possuem uma mancha escura menor quando comparado aos ratos Nx + V, ilustrando qualitativamente o resultado encontrado na Figura 11A. Além disso, é possível perceber neste experimento que ocorre marcação tanto

em proteínas de alto como também de baixo peso molecular nos ratos Nx + V indicando que a proteinúria nesses ratos tenha origem mista, ou seja, de origem tanto glomerular quanto tubular. O uso prolongado do inibidor de DPP4 foi capaz de evitar o aparecimento de uma coloração tão forte quanto encontrados nos ratos Nx + V (Figura 11B). Esses dados apontam que os inibidores da DPP4 são capazes de retardar a presença exacerbada de proteínas na urina de ratos nefrectomizados, o que pode ser em decorrência de uma preservação tanto da BFG quanto de mecanismos endocíticos em túbulo proximal.

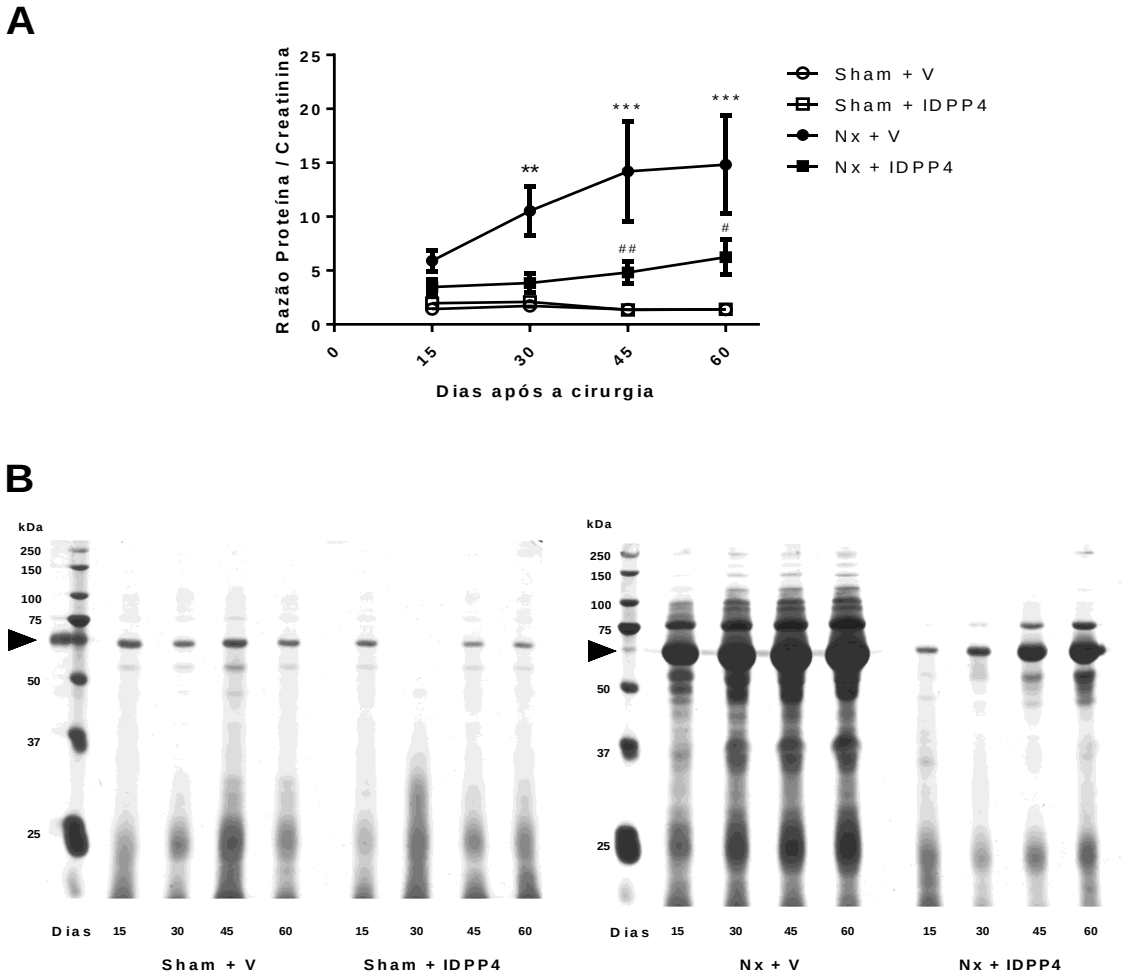

Figura 11. Avaliação da excreção de proteínas totais. (A) Valor de excreção de proteínas totais obtidos a partir de teste colorimétrico padronizado pelo valor de creatinina urinária e expressos com média ± EPM. n variado por grupo. ** P≤0,01 e *** P≤0,001 vs. Sham + V. # P≤0,05 e ## P≤0,01 vs. Nx + V. (B) Padrão de excreção de proteínas totais dos diferentes grupos em dias após a

cirurgia. Géis de poliacrilamida 10% contendo amostras de urina com volume equivalente a 3 µg de creatinina e corados com nitrato de prata (n=1/grupo). Seta preta representa peso molecular da albumina.

4.1.5. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a expressão proteica de componentes da BFG e do mecanismo de endocitose em túbulo proximal em ratos nefrectomizados.

Uma vez que os resultados demonstram envolvimento de proteinúria de origem mista na progressão da doença renal e que os inibidores da DPP4 retardam o avanço desse quadro, testamos a hipótese de que a sitagliptina poderia estar envolvida com a preservação de proteínas responsáveis pela manutenção da BFG e/ou com proteínas envolvidas com o mecanismo de endocitose em túbulo proximal renal.

Primeiramente, avaliamos por meio de *immunoblotting* com amostras de urina desses ratos, a presença de podocina e RBP4 (Figura 12). O surgimento dessas proteínas na urina é reconhecido na literatura como biomarcadores de lesão glomerular e tubular, respectivamente (90,91). Constatamos a presença da expressão proteica desses biomarcadores na urina somente nos ratos Nx + V, confirmando que houve lesão tanto no aparato glomerular quanto tubular. O tratamento com inibidor da DPP4 foi capaz de evitar o surgimento de ambos biomarcadores na urina dos ratos Nx + IDPP4 (Figura 12).

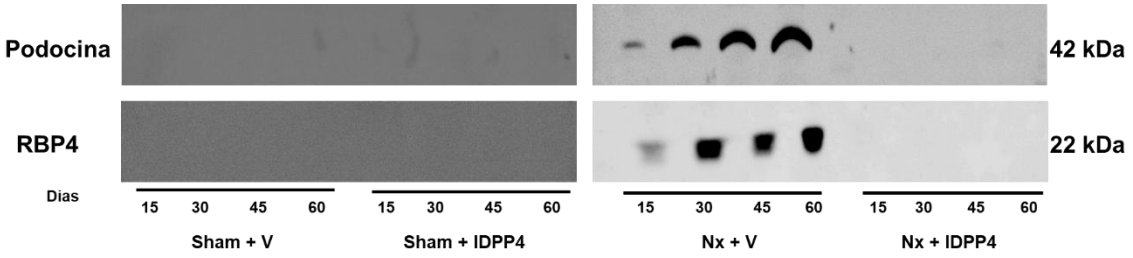

Figura 12. Avaliação temporal, em dias após a cirurgia, de biomarcadores de lesão glomerular e tubular renal. Expressão proteica de amostras de urina dos diferentes grupos submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por técnica de *immunoblotting*. Quantidade de 10 µg de creatinina urinária foi utilizada para cada amostra. n=1/grupo.

Logo após essa confirmação, foram analisadas, em homogenato de rim utilizando anticorpos específicos (Tabela 2), diferentes componentes da barreira de filtração glomerular, podocina e nefrina (Figura 13) e do maquinário endocítico em túbulo proximal, megalina e cubilina (Figura 14). Curiosamente, tratando-se da expressão proteica, encontramos que no grupo Nx + V ocorre uma diminuição significativa na expressão proteica de podocina e megalina quando comparados ao grupo sham. Por sua vez, o tratamento com sitagliptina foi capaz de impedir a redução da expressão dessas proteínas (Figura 13A e B e Figura14 A e B, respetivamente). Não encontramos diferença estatística entre os grupos em relação aos níveis de nefrina e cubilina em homogenato renal (Figura 13A e C e Figura 14A e C, respetivamente).

Esses resultados sugerem que o avanço na progressão da doença renal crônica está relacionado com redução na expressão proteica de componentes tanto da barreira de filtração glomerular quanto do mecanismo de endocitose mediada por receptores em túbulo proximal. Entretanto, o uso do inibidor da DPP4 é capaz de preservar a estrutura glomerular e tubular, por impedir a

redução destas proteínas constituintes.

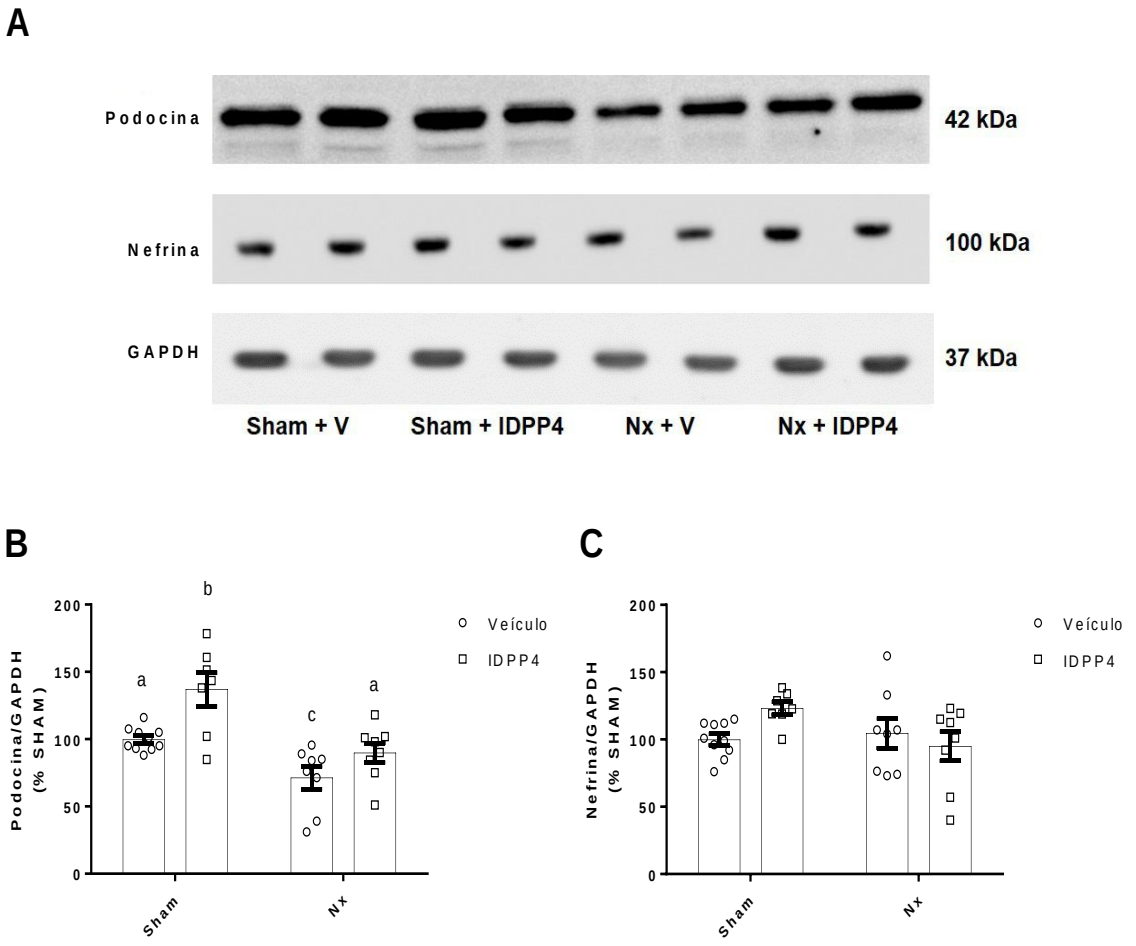

Figura 13. Avaliação dos componentes relacionados à BFG. (A) Avaliação da expressão proteica em amostras de homogenato de rim submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por técnica de *immunoblotting*. (B e C) Representação gráfica do nível de expressão relativa de proteína normalizado pelo respectivo GAPDH. Amostras equivalentes à 20 µg de proteínas para (B) podocina e (C) nefrina. Valores expressos como média ± EPM. Número de animais representado em *scatter dot plot*. Barras com letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

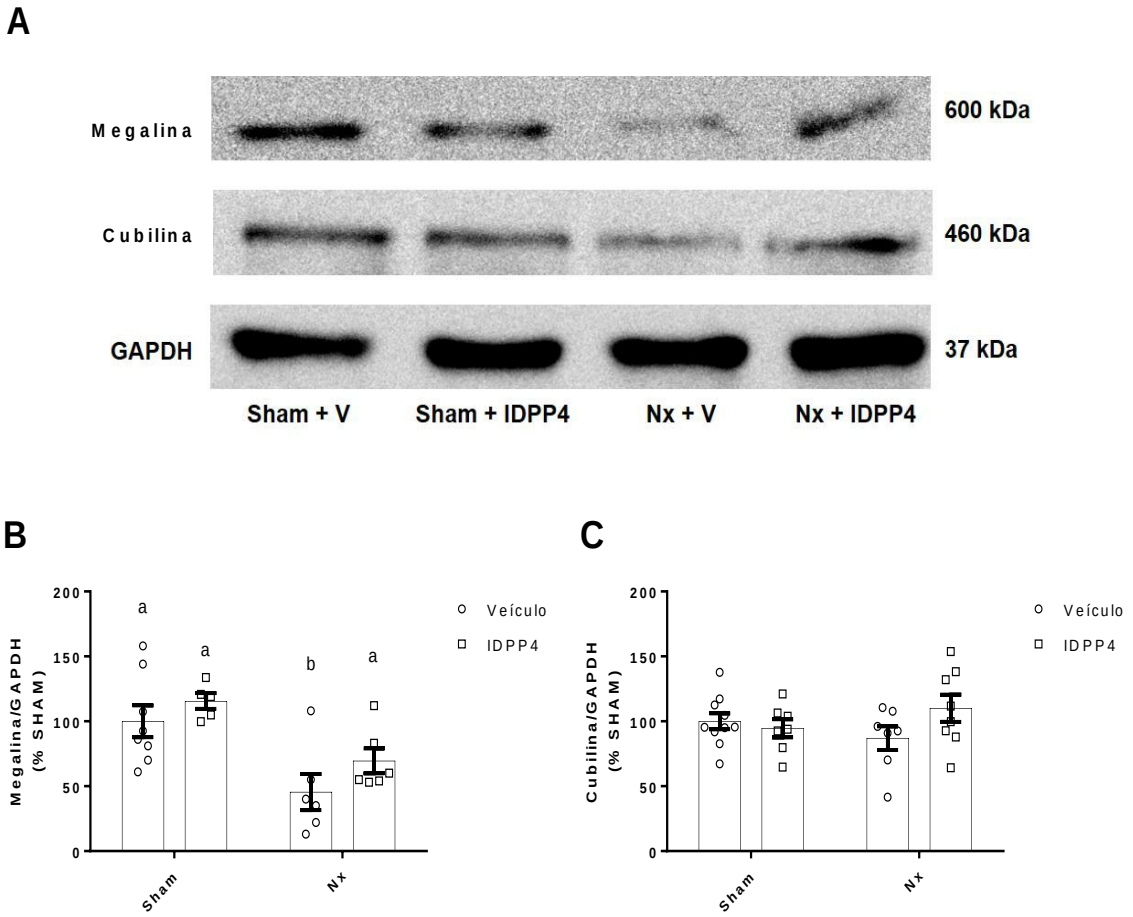

Figura 14. Avaliação dos componentes relacionados ao mecanismo de endocitose em túbulo proximal renal. (A) Avaliação da expressão proteica em amostras de homogenato de rim submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por técnica de *immunoblotting*. (B e C) Representação gráfica do nível de expressão relativa de proteína normalizado pelo respectivo GAPDH. Amostras equivalentes à 25 µg de proteínas para (B) megalina e (C) cubilina. Valores expressos como média ± EPM. Número de animais representado em *scatter dot plot*. Barras com letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

4.1.6. Efeito do tratamento com sitagliptina sobre a excreção urinária da DPP4.

Para testar a hipótese que o aumento da excreção urinária da DPP4 poderia ser um possível biomarcador relacionado com a progressão da DRC, primeiramente avaliamos como estaria a atividade da DPP4 ao longo do tempo nas amostras de soro e urina dos nossos grupos de ratos, uma vez que a atividade aumentada dessa enzima após a indução da cirurgia nos ratos Nx + V poderia estar corroborando com nossa hipótese.

Nossa avaliação temporal em amostras de soro não indicou diferença estatística entre os ratos Nx e os ratos *sham*, ambos tratados com veículo. Já a utilização do inibidor da DPP4 foi capaz de reduzir significativamente a atividade dessa enzima tanto dos ratos *sham* quanto dos ratos Nx em todos os tempos observados (Figura 15A), indicando a eficiência do tratamento

Entretanto, em relação as amostras de urina, verificamos um aumento significante da atividade da DPP4 15 dias após a indução da cirurgia, com um ligeiro aumento nas avaliações subsequentes de forma progressiva. O tratamento com o inibidor da DPP4 foi capaz de atenuar esse aumento desde a nossa primeira avaliação (15 dias após a cirurgia) e também durante 30 dias após a cirurgia (Figura 15B). Após essa avaliação é possível ver uma leve inclinação da curva nos ratos Nx + IDPP4 perdendo o valor estatístico 45 dias após cirurgia. Na última avaliação, o tratamento com sitagliptina nos ratos nefrectomizados tratados com sitagliptina mostra novamente redução significativa em relação ao grupo Nx tratado com veículo.

Para corroborar com este dado, também analisamos a expressão de DPP4 na urina no qual podemos perceber aumento progressivo somente nos

ratos Nx + V, o que não é possível ser notado em nenhum dos outros grupos (Figura 15C). Esses dados indicam que a DPP4 que aparece na urina é proveniente do tecido renal e essa excreção ocorre de forma progressiva conforme avança a doença.

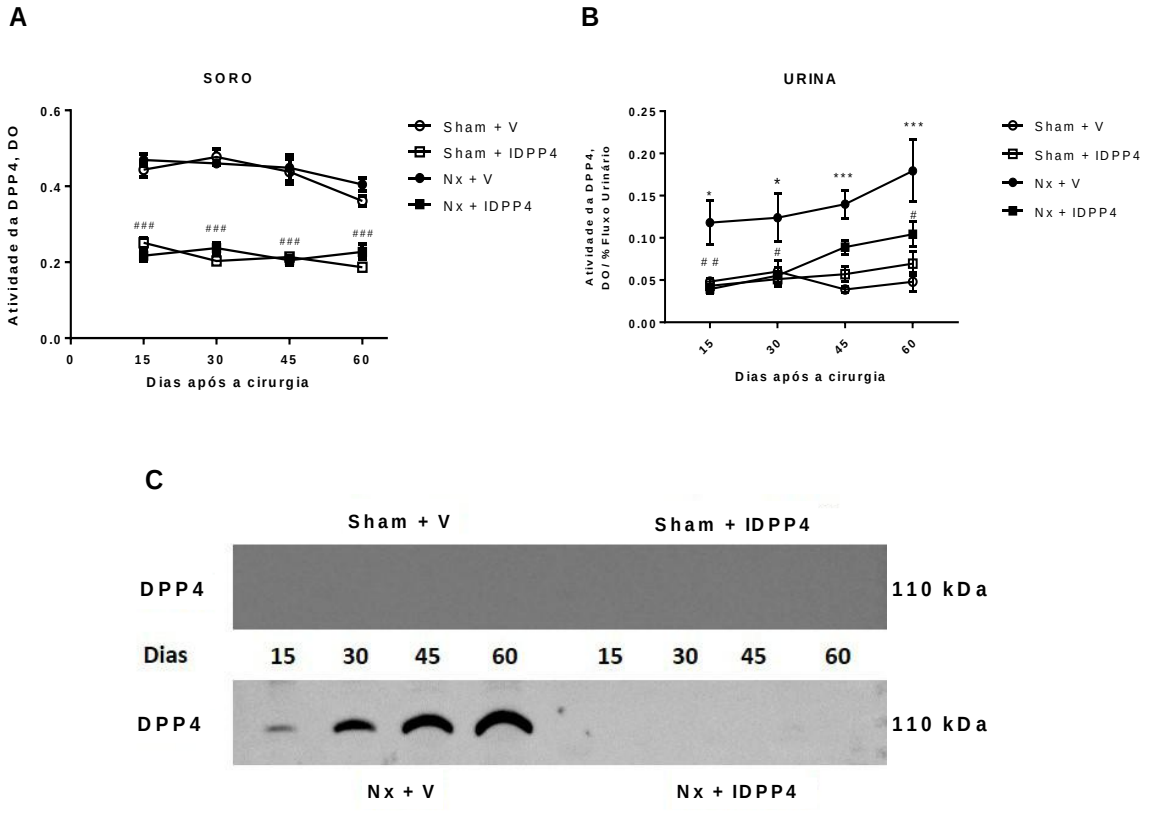

Figura 15. Avaliação da atividade enzimática e expressão proteica da DPP4 em soro, urina e tecido renal. (A) Atividade da DPP4 em soro. (B) Atividade da DPP4 em urina utilizando 4% do fluxo urinário do respectivo rato. n variado por grupo. (C) Avaliação da expressão proteica em amostras de urina submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por técnica de *immunoblotting*. A quantidade de proteína referente utilizada foi de 10 µg de creatinina urinária por amostra. n=1/grupo. *P≤0,05, *** P≤0,001 vs. Sham + Veículo; # P≤0,05 e ## P≤0,01 e ### P≤0,001 vs. Nx + Veículo. DO = Densidade óptica.

4.1.7. Avaliação da correlação entre atividade de DPP4 urinária e parâmetros de creatinina plasmática, excreção de proteínas totais e pressão arterial caudal nos ratos nefrectomizados tratados com veículo.

Para testar a hipótese de que o aumento progressivo da atividade da DPP4 na urina dos ratos nefrectomizados poderia estar associado com a progressão da DRC, realizamos análises de regressão linear entre a atividade da DPP4 urinária em 15, 30, 45, e 60 dias após a cirurgia de nefrectomia e alguns parâmetros vinculados com a DRC em nosso modelo de ratos nefrectomizados tratados somente com veículo.

Constatamos com nossos dados, correlação positiva entre a atividade de DPP4 urinária com 3 parâmetros importantes na clínica para diagnóstico e avaliação de DRC: creatinina plasmática; excreção de proteínas totais e também com a pressão arterial caudal desses ratos (Figura 16). Esses dados em conjunto com os resultados obtidos anteriormente, demonstram que a excreção urinária da enzima DPP4 poderia estar relacionada com o avanço da DRC e ainda ser um possível biomarcador para essa doença.

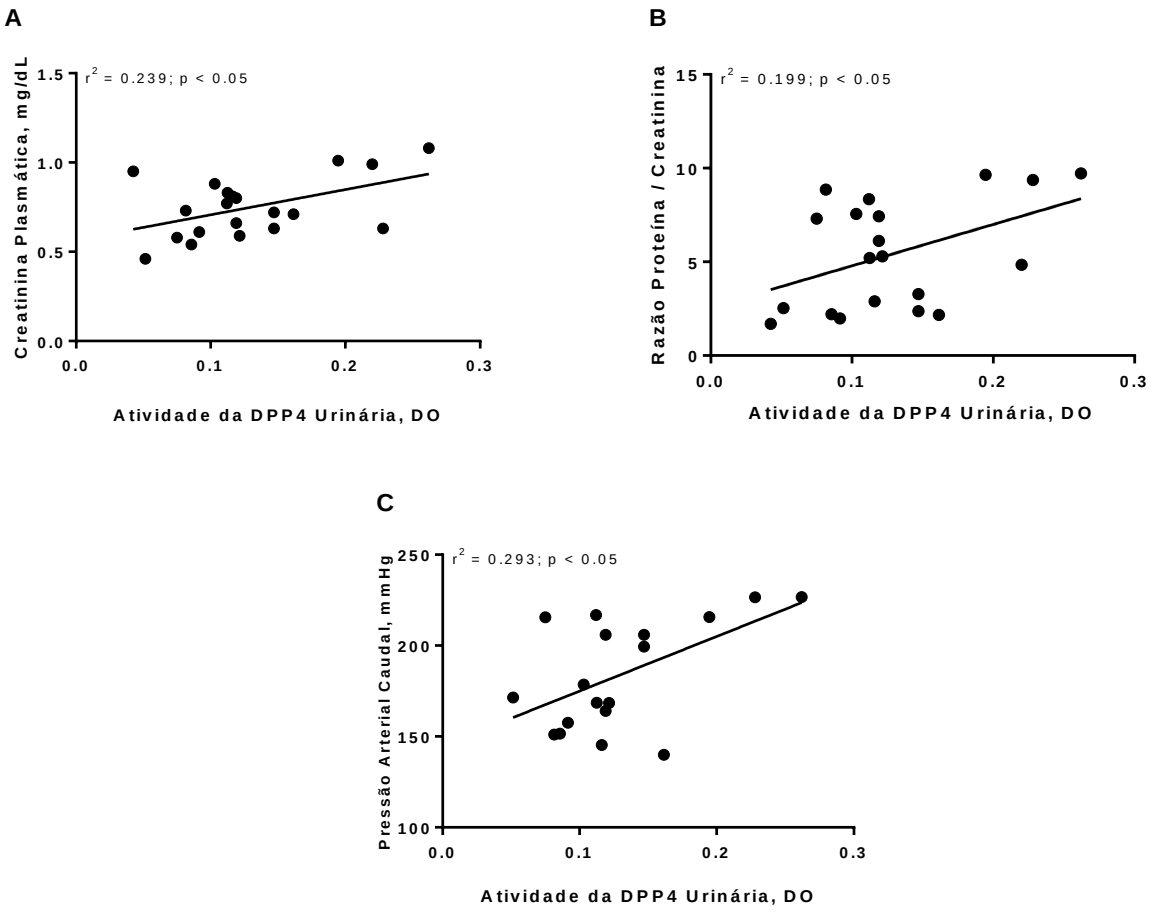

Figura 16. Correlação entre a atividade da DPP4 urinária e a creatinina plasmática, excreção de proteínas urinárias e pressão arterial caudal dos ratos nefrectomizados tratados com veículo. As linhas representam a regressão linar dos pontos. O coeficiente de determinação r^2 e os valores de P foram obtidos pelo teste de correlação de *Pearson*. A excreção de proteínas urinárias está expressa pela razão proteína/creatinina urinária. DO = Densidade Óptica.

5. DISCUSSÃO

É conhecido que os inibidores da DPP4 possuem ações para além do controle glicêmico. Em estudos com pacientes diabéticos e em modelo experimental de DRC não associada com hiperglicemia foi observado o efeito anti-proteinúrico desses inibidores (76,78,79). Entretanto, os mecanismos moleculares adjacentes a este efeito ainda permanecem incertos. Nosso estudo demonstrou que a administração do inibidor da DPP4, sitagliptina, reduziu proteinúria e este efeito foi, em parte, decorrente de redução de danos glomerular e tubular em modelo experimental de DRC independente de hiperglicemia, a nefrectomia 5/6. Ademais, constatamos o envolvimento da DPPIV na progressão da DRC, visto que sua excreção urinária aumenta progressivamente com o avanço da doença renal e o aumento da atividade enzimática desta se correlaciona com importantes marcadores de dano à função renal e mortalidade cardiovascular.

Recentemente foi conduzido um estudo (CARMELINA) de segurança cardiovascular e renal do inibidor da DPP4, linagliptina, em pacientes com DM2 e doença renal crônica associada (95–97). Como desfecho primário, o estudo demonstrou redução de eventos cardiovasculares. Além disso, o CARMELINA apresentou desfecho secundário reduzindo significativamente o risco de piora da albuminúria com linagliptina versus placebo. Esses dados fortificam a base de evidências para opções de tratamento em pessoas com função renal reduzida. A linagliptina é um interessante tratamento para tais pacientes, justamente, por não exigir ajuste da dose de acordo com a função renal, já que sua excreção ocorre primariamente por via intestinal/biliar, e a alta afinidade da sua ligação com a DPP4 significa que sua excreção renal é mínima (98).

Ademais, neste estudo, houve uma redução significativa dos eventos microvasculares quando comparado ao placebo, devido à redução da progressão da albuminúria com redução de risco cardiovascular em pacientes com DRC.

Em nosso estudo, foi observada redução de PA associada à inibição da DPP4. A utilização dos inibidores, alogliptina e sitagliptina, apresentaram redução significativa da PA sistólica em pacientes diabéticos e não diabéticos com hipertensão leve a moderada, respectivamente (99,100). Dados prévios do nosso grupo demonstraram que a PA sistólica se correlaciona positivamente com níveis de proteinúria em ratos espontaneamente hipertensos – SHR (101). Em nosso estudo, os ratos tratados com sitagliptina também apresentaram redução de PA acompanhado por redução de proteinúria. Desta forma, é possível que este efeito anti-hipertensivo possa reduzir a proteinúria evidenciada nos ratos nefrectomizados por reduzir o estresse mecânico em glomérulo e túbulo proximal, o que contribui para redução também do dano nestes segmentos do néfron. Entretanto, em um estudo com modelo de obesidade tratado com inibidor da DPP4 foi constatado redução da disfunção glomerular e tubular, redução de inflamação e estresse oxidativo em tecido renal e melhora da proteinuria sem redução da PA (102). Desta forma, não descartamos também a possibilidade de que este inibidor possa atuar localmente em tecido renal, modulando a expressão de proteínas constituintes da BFG e do maquinário endocítico, já que a DPP4 é expressa tanto em podócitos, na região glomerular, quanto nas células do túbulo proximal (103).

A proteinúria de origem glomerular observada em nosso estudo foi atribuída à redução da expressão de podocina o que foi atenuado a partir da

administração do inibidor sitagliptina. Em outro estudo do nosso grupo observamos aumento da expressão proteica de podocina e nefrina com a administração oral de vildagliptina em ratos com insuficiência cardíaca (IC) (104). Entretanto, diferentemente do nosso trabalho, este estudo demonstrou aumento da expressão de tais proteínas em resposta ao tratamento com o inibidor da DPP4 a níveis superiores ao do controle falso operado. Nosso estudo demonstrou que o inibidor sitagliptina promoveu atenuação da redução destas proteínas nos ratos nefrectomizados. Esta diferença de resultados pode ser atribuída ao modelo experimental desenvolvido entre os estudos e não propriamente às diferenças entre os medicamentos. No modelo de IC nós evidenciamos um dano secundário ao rim devido à sobrecarga em resposta ao infarto destes animais. Já em nosso modelo, nós induzimos a DRC retirando 5/6 da massa renal, configurando um insulto primário a este órgão. Este efeito observado frente aos grupos tratados com os inibidores da DPP4 pode ser devido a uma possível ação direta destes agentes sobre o tecido renal, uma vez que os ratos controles falso-operados tratados com sitagliptina (Sham + IDPP4) também apresentam aumento significativo da expressão proteica de podocina.

Alterações nos níveis de nefrina no glomérulo pode ter um papel fundamental para o avanço das doenças renais. Porém, certos estudos não demonstram variação significativa na expressão total dessa proteína glomerular (105–107). Estes trabalhos apontam para a importância na participação da fosforilação da nefrina como sendo associados à redução de proteinúria. É conhecido que a fosforilação da nefrina pela tirosina Y1228 através da regulação da formação de F-actina pode ser importante para a manutenção da

morfologia e função normal dos podócitos. Sendo assim, a ausência de diferença na expressão de nefrina entre os grupos do nosso trabalho pode ser devido ao fato da avaliação ter sido realizada somente para detecção da proteína total e não sua fosforilação na tirosina presente na cauda citoplasmática desta proteína.

Em relação ao aumento de proteinúria de origem tubular, nós atribuímos este dado à menor expressão da proteína megalina em tecido renal. Aroor e colaboradores demonstraram que a Ang II, principal componente de sistema renina-angiotensina (SRA), pode regular a expressão de megalina através de maior atividade da DPP4 em modelo experimental *in vivo* e *in vitro*, evidenciando um *crosstalk* entre o SRA e a DPP4 (108). Esta interação também foi observada pelo nosso grupo em um modelo de DRC independente de hiperglicemia, em que constatamos que maior concentração de Ang II se correlaciona positivamente com maiores concentrações de DPP4 em tecido cardíaco (109). Sabendo que a DRC é uma patologia com ativação do SRA local intra-renal como mecanismo compensatório, acreditamos que, em nosso estudo a inibição da DPP4 promove atenuação da expressão de megalina, possivelmente em parte, devido à redução na concentração de Ang II em tecido renal. Desta forma, é possível que os inibidores da enzima DPP4 regulem esta proteína do maquinário endocítico por se contrapor ao efeito mediado pela Ang II.

A proteinúria é reconhecida como um importante biomarcador de DRC. Recentemente, a excreção urinária da DPP4 foi apontada como um possível biomarcador de DRC através de estudos metabolômicos (110,111). Nosso estudo somou a este achado, constatando que a presença da DPP4 na urina

aumenta progressivamente conforme a doença avança, corroborando com esta hipótese. Um outro questionamento a respeito desse assunto seria compreender a origem da DPP4 excretada. Como nossos dados não mostram diferença entre os grupos em relação à atividade da DPP4 no soro, acreditamos que esta excreção seja proveniente do próprio rim. Dados não mostrados do nosso trabalho indicam não diferença entre os grupos na atividade da DPP4 em tecido renal. No entanto, uma possível regulação positiva para o RNAm da DPP4 em rim indicaria mais precisamente um aumento na expressão proteica nos ratos nefrectomizados tratados com veículo, indicando um efeito compensatório à excreção dessa enzima. Ademais, a despeito do possível papel da excreção urinária da DPP4 como possível biomarcador de progressão da doença, nosso estudo constatou que a atividade desta enzima na urina se correlaciona positivamente com a creatinina plasmática, pressão arterial e proteinúria.

Desta forma, nosso estudo elucidou, em parte, o mecanismo subjacente pelo qual o inibidor da DPP4, sitagliptina, promove efeito anti-proteinúrico. Aqui, constatamos que o tratamento com o inibidor atenuou a diminuição de proteínas constituintes da BFG e do maquinário endocítico em túbulo proximal, podocina e megalina, respectivamente. Além disso, concluímos também que a excreção urinária de DPP4 é um forte candidato a biomarcador de progressão na DRC, correlacionando-se positivamente com biomarcadores já utilizados na clínica como a creatinina plasmática e proteinúria e também com a pressão arterial em ratos nefrectomizados tratados com veículo.

6. CONCLUSÃO

A inibição da DPP4 promove efeito antiproteinúrico em ratos com DRC mediado, em parte, por melhora na disfunção glomerular e tubular. Além disso, a excreção dessa enzima é um forte candidato à biomarcador de progressão na DRC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL PRACTICE GUIDELINES. [citado 2 de fevereiro de 2018]; Available at: https://www.kidney.org/sites/default/files/docs/ckd_evaluation_classification_stratification.pdf
2. Cintra Sesso R, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Martins CT, Para C. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. Available at: http://www.scielo.br/pdf/jbn/v39n3/pt_0101-2800-jbn-39-03-0261.pdf
3. Li PK-T, Ma TK-W. Global impact of nephropathies. Nephrology. dezembro de 2017;22:9–13.
4. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton R, Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. J Am Soc Nephrol. 1 de setembro de 2005;16(9):2557–64.
5. Kochi M, Kohagura K, Shiohira Y, Iseki K, Ohya Y. Chronic kidney disease, inflammation, and cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis. J Cardiol. março de 2018;71(3):277–83.
6. Bock JS, Gottlieb SS. Cardiorenal Syndrome: New Perspectives. Circulation. 15 de junho de 2010;121(23):2592–600.
7. Maric-Bilkan C. Obesity and Diabetic Kidney Disease. Med Clin North Am. janeiro de 2013;97(1):59–74.
8. Cosmai L, Porta C, Gallieni M, Perazella MA. Onco-nephrology: a decalogue: Table 1. Nephrol Dial Transplant. 1 de abril de 2016;31(4):515–9.
9. Abdelhafiz AH, Brown SHM, Bello A, El Nahas M. Chronic Kidney Disease in Older People: Physiology, Pathology or Both? Nephron Clin Pract. 2010;116(1):c19–24.
10. Levey AS, Stevens LA, Coresh J. Conceptual Model of CKD: Applications and Implications. Available at: http://www.ajkd.org/article/S0272-6386(08)01718-6/pdf
11. Gorriz JL, Martinez-Castelao A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. Transplant Rev. 2012;26:3–13.
12. Carter DC, He XM, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom MB, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. Science. 9 de junho de 1989;244(4909):1195–8.
13. Gekle M. RENAL TUBULE ALBUMIN TRANSPORT. Annu Rev Physiol. 2005;67:573–94.
14. Birn H, Christensen E. Renal albumin absorption in physiology and pathology. Kidney Int. 2006;69:440–9.
15. Avasthi PS, Koshy V. The anionic matrix at the rat glomerular endothelial surface. Anat Rec [Internet]. março de 1988;220(3):258–66.
16. Bulger RE, Eknoyan G, Purcell Ii DJ, Dobyan DC, Bulger RE. Endothelial Characteristics of Glomerular Capillaries in Normal, Mercuric Chloride-

induced, and Gentamicin-induced Acute Renal Failure in the Rat. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1129168/pdf/jcinvest00767-0143.pdf

17. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD, Deen WM. Structural determinants of glomerular permeability. Available at: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajprenal.2001.281.4.F579

18. Deen WM. What determines glomerular capillary permeability? J Clin Invest. 114. Available at: http://www.jci.org

19. Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. Available at: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajprenal.00173.2005

20. Lawrence MG, Altenburg MK, Sanford R, Willett JD, Bleasdale B, Ballou B, et al. Permeation of macromolecules into the renal glomerular basement membrane and capture by the tubules. Available at: http://www.pnas.org/content/pnas/early/2017/02/27/1616457114.full.pdf

21. Rensson JS, Ohlson M, Rje Haraldsson B. A quantitative analysis of the glomerular charge barrier in the rat. Available at: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajprenal.2001.280.4.F646

22. Deen WM, Satvat B, Jamieson JM, Ja-Mieson JM. Theoretical model for glomerular filtration of charged solutes. Available at: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajprenal.1980.238.2.F126

23. Miner JH. Glomerular filtration: the charge debate charges ahead. Kidney Int. 2008;74(74).

24. Rje Haraldsson B, Nystr J, Deen WM. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. Available at: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00055.2006

25. Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, et al. Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. Kidney Int. 1 de agosto de 2008;74(3):289–99.

26. Richard Graham BC, Karnovsky MJ. GLOMERULAR PERMEABILITY ULTRASTRUCTURAL CYTOCHEMICAL STUDIES USING PEROXIDASES AS PROTEIN. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2138332/pdf/1123.pdf

27. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. J Cell Biol. fevereiro de 1974;60(2):423–33.

28. Huber TB, Kö M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with Podocin Facilitates Nephrin Signaling. Publ JBC Pap Press. 2001.

29. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. Available at: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00020.2002

30. Huang TW, Langlois JC. PODOENDIN A New Cell Surface Protein of the Podocyte and Endothelium. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2187700/pdf/je1621245.pdf

31. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. Kidney Int. 2 de junho de 2006;69(12):2131–47.

32. Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D, Farquhar MG. Epithelial Polyanion (Podocalyxin) Is Found on the Sides but Not the Soles of the Foot Processes of the Glomerular Epithelium.

33. Farquhar MG. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. J Clin Invest. 1 de agosto de 2006;116(8):2090–3.

34. KAWACHI H, MIYAUCHI N, SUZUKI K, HAN GD, ORIKASA M, SHIMIZU F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier (Review Article). Nephrology. agosto de 2006;11(4):274–81.

35. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. N Engl J Med. 30 de março de 2006;354(13):1387–401.

36. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome the development or function of the kidney filtration barrier. Mol Cell. 1998;1:575–82.

37. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 de julho de 1999;96(14):7962–7.

38. Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin – a unique structural and signaling protein of the kidney filter. Trends Mol Med. setembro de 2007;13(9):396–403.

39. Huber TB, Schmidts M, Gerke P, Schermer B, Zahn A, Rn Hartleben B, et al. The Carboxyl Terminus of Neph Family Members Binds to the PDZ Domain Protein Zonula Occludens-1. 2003.

40. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. Available at: https://www.nature.com/articles/nature04662.pdf

41. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman L. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. J Clin Invest. 2006;116:1346–59.

42. Zhu J, Sun N, Aoudjit L, Li H, Kawachi H, Lemay S, et al. Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. Kidney Int. 2008;73:556–66.

43. Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler M-C, et al. Early Glomerular Filtration Defect and Severe Renal Disease in Podocin-Deficient Mice. Mol Cell Biol. 2004;24(2):550–60.

44. Roselli SV, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, et al. Podocin Localizes in the Kidney to the Slit Diaphragm Area.

45. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. J Clin Invest. 2001;108:1621–9.

46. D ’amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. Kidney Int. 2003;63:809–25.

47. Verroust PJ, Kozyraki R, Hammond TG, Moestrup SK, Christensen EI. Physiopathologic role of cubilin and megalin. Adv Nephrol Necker Hosp. 2000;30:127–45.

48. Christensen EI, Nielsen R. Role of megalin and cubilin in renal physiology and pathophysiology. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2007;158:1–22.

49. Eppel GA, Osicka TM, Pratt LM, Jablonski P, Howden BO, Glasgow EF, et al. The return of glomerular-filtered albumin to the rat renal vein. Kidney Int. 1999;55:1861–70.

50. Russo L, Sandoval R, Mckee M, Osicka T, Collins A, Brown D, et al. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: Retrieval is disrupted in nephrotic states. Kidney Int. 2007;71:504–13.

51. Tenten V, Menzel S, Kunter U, Sicking E-M, van Roeyen CRC, Sanden SK, et al. Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. J Am Soc Nephrol. dezembro de 2013;24(12):1966–80.

52. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. Annu Rev Nutr. julho de 2001;21(1):407–28.

53. Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva ACS e. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. J Bras Nefrol. setembro de 2011;33(3):351–64.

54. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease.

55. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of Tubulointerstitial Fibrosis. J Am Soc Nephrol. 1 de novembro de 2010;21(11):1819–34.

56. Kozyraki R, Kristiansen M, Silahtaroglu A, Hansen C, Jacobsen C, Tommerup N, et al. The Human Intrinsic Factor-Vitamin B 12 Receptor, Cubilin: Molecular Characterization and Chromosomal Mapping of the Gene to 10p Within the Autosomal Recessive Megaloblastic Anemia (MGA1) Region.

57. Birn H, Verroust PJ, Nexø E, Hager[H, Jacobsen[C, Christensen EI, et al. Characterization of an Epithelial j460-kDa Protein That Facilitates Endocytosis of Intrinsic Factor-Vitamin B 12 and Binds Receptor-associated Protein*.

58. Gräsbeck R. Selective cobalamin malabsorption and the cobalamin-intrinsic factor receptor. Acta Biochim Pol. 1997;44:725–34.

59. Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ, Jacobsen C, Dautry-Varsat A, Gburek J,

et al. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia.

60. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, et al. Cubilin Is Essential for Albumin Reabsorption in the Renal Proximal Tubule. J Am Soc Nephrol. 2010.

61. Leheste R, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, et al. Animal Model Megalin Knockout Mice as an Animal Model of Low Molecular Weight Proteinuria. Am J Pathol. 1999;155:1361–70.

62. Kantarci S, Donnai D, Black GCM, Bieth E, Chassaing N, Lacombe D, et al. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. Nat Genet. 2007;39:957–959.

63. Russo LM, Del Re E, Brown D, Lin HY. Evidence for a Role of Transforming Growth Factor (TGF)-ℕ1 in the Induction of Postglomerular Albuminuria in Diabetic Nephropathy Amelioration by Soluble TGF-ℕ Type II Receptor.

64. Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD, Brown D. Impaired Tubular Uptake Explains Albuminuria in Early Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2009;21.

65. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, et al. Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. N Engl J Med. 3 de outubro de 2013;369(14):1317–26.

66. Udell JA, Bhatt DL, Braunwald E, Cavender MA, Mosenzon O, Steg PG, et al. Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Moderate or Severe Renal Impairment: Observations From the SAVOR-TIMI 53 Trial. Diabetes Care. 31 de dezembro de 2014;38(4):dc141850.

67. Vilsbøll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced Postprandial Concentrations of Intact Biologically Active Glucagon-Like Peptide 1 in Type 2 Diabetic Patients.

68. Demuth H-U, McIntosh CHS, Pederson RA. Type 2 diabetes—Therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics. agosto de 2005;1751(1):33–44.

69. White JR. Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors: Pharmacological Profile and Clinical Use. Clin Diabetes @BULLET. 2008;26(2).

70. CHMP. JANUVIA, INN: sitagliptin. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000722/WC500039057.pdf

71. Pei Z. From the bench to the bedside: dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a new class of oral antihyperglycemic agents. Curr Opin Drug Discov Devel. julho de 2008;11(4):512–32.

72. Tanaka T, Nangaku M, Nishiyama A. The role of incretins in salt-sensitive hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens. setembro de 2011;20(5):476–81.

73. Tanaka T, Higashijima Y, Wada T, Nangaku M. The potential for renoprotection with incretin-based drugs. Kidney Int. outubro de 2014;86(4):701–11.

74. Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch C. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev. 23 de abril de 2008;(2).

75. Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, et al. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. Diabetes. 2014;63(6):2120–31.

76. Hattori S. Sitagliptin reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. Endocr J. 2011;58(1):69–73.

77. H. M, Y. O, T. A. Sitagliptin improves albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Investig. 2014;5(3):313–9.

78. Kawasaki I, Hiura Y, Tamai A, Yoshida Y, Yakusiji Y, Ikuno Y, et al. Sitagliptin reduces the urine albumin-to-creatinine ratio in type 2 diabetes through decreasing both blood pressure and estimated glomerular filtration rate. J Diabetes. 2015;7(1):41–6.

79. Wook Joo K, Kim S, Ahn S-Y, Chin HJ, Chae D-W, Lee J, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in rat remnant kidney. BMC Nephrol. 2013.

80. Higashijima Y, Tanaka T, Yamaguchi J, Tanaka S, Nangaku M. Anti-inflammatory role of DPP-4 inhibitors in a nondiabetic model of glomerular injury. Am J Physiol Physiol. 2015;308(8):F878–87.

81. Chow K-M, Liu Z-C, Chang TM-S. Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited. Hong Kong J Nephrol. 1 de outubro de 2003;5(2):57–64.

82. Kaufman JM, Dimeola HJ, Siegel NJ, Lytton B, Kashgarian M, Hayslett JP. Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation. Vol. 6, Kidney International. 1974.

83. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. Kidney Int. fevereiro de 1986;29(2):502–10.

84. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal Model of Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. Nephron. 1986;44(3):230–4.

85. Piao SG, Bae SK, Lim SW, Song J-H, Chung BH, Choi BS, et al. Drug Interaction Between Cyclosporine and mTOR Inhibitors in Experimental Model of Chronic Cyclosporine Nephrotoxicity and Pancreatic Islet Dysfunction. Transplantation. fevereiro de 2012;93(4):383–9.

86. Chow K-M, Liu Z-C, Ming-Swi Chang T. Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited. Vol. 5. 2003.

87. Massola Shimizu MH, Coimbra TM, De Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure.

Kidney Int. 2005;68(5):2208–17.

88. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. novembro de 1951;193(1):265–75.

89. LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 15 de agosto de 1970;227(5259):680–5.

90. Titan SM, Vieira JM, Dominguez W V., Moreira SRS, Pereira AB, Barros RT, et al. Urinary MCP-1 and RBP: Independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy. J Diabetes Complications. 2012;26(6):546–53.

91. Simon R, Lemoine JÔ, Fonbonne C, Jaffuel A, Léonard JF, Gautier JC, et al. Absolute quantification of podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2014;94:84–91.

92. Green JB, Bethel MA, Paul SK, Ring A, Kaufman KD, Shapiro DR, et al. Rationale, design, and organization of a randomized, controlled Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin (TECOS) in patients with type 2 diabetes and established cardiovascular disease. Am Heart J. dezembro de 2013;166(6):983–989.e7.

93. Bethel MA, Green JB, Milton J, Tajar A, Engel SS, Califf RM, et al. Regional, age and sex differences in baseline characteristics of patients enrolled in the Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin (TECOS). Diabetes, Obes Metab. abril de 2015;17(4):395–402.

94. Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, et al. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. N Engl J Med. 16 de julho de 2015;373(3):232–42.

95. Rosenstock J, Perkovic V, Alexander JH, Cooper ME, Marx N, Pencina MJ, et al. Rationale, design, and baseline characteristics of the CArdiovascular safety and Renal Microvascular outcomE study with LINAgliptin (CARMELINA®): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial in patients with type 2 diabetes and high cardio-renal risk. Cardiovasc Diabetol. 14 de dezembro de 2018;17(1):39.

96. McGuire DK, Alexander JH, Johansen OE, Perkovic V, Rosenstock J, Cooper ME, et al. Linagliptin Effects on Heart Failure and Related Outcomes in Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus at High Cardiovascular and Renal Risk in CARMELINA. Circulation. 15 de janeiro de 2019;139(3):351–61.

97. Rosenstock J, Perkovic V, Johansen OE, Cooper ME, Kahn SE, Marx N, et al. Effect of Linagliptin vs Placebo on Major Cardiovascular Events in Adults With Type 2 Diabetes and High Cardiovascular and Renal Risk. JAMA. 1 de janeiro de 2019;321(1):69.

98. Blech S, Ludwig-Schwellinger E, Grafe-Mody EU, Withopf B, Wagner K. The Metabolism and Disposition of the Oral Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Linagliptin, in Humans. Drug Metab Dispos. 1 de abril de

2010;38(4):667–78.

99. Kishimoto S, Kinoshita Y, Matsumoto T, Maruhashi T, Kajikawa M, Matsui S, et al. Effects of the Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Alogliptin on Blood Pressure in Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Am J Hypertens. 11 de junho de 2019;32(7):695–702.

100. Mistry GC, Maes AL, Lasseter KC, Davies MJ, Gottesdiener KM, Wagner JA, et al. Effect of Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, on Blood Pressure in Nondiabetic Patients With Mild to Moderate Hypertension. J Clin Pharmacol. 1 de maio de 2008;48(5):592–8.

101. Inoue BH, Arruda-Junior DF, Campos LCG, Barreto ALT, Rodrigues M V, Krieger JE, et al. Progression of microalbuminuria in SHR is associated with lower expression of critical components of the apical endocytic machinery in the renal proximal tubule. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;305(2):F216-26.

102. Nistala R, Habibi J, Lastra G, Manrique C, Aroor AR, Hayden MR, et al. Prevention of Obesity-Induced Renal Injury in Male Mice by DPP4 Inhibition. Endocrinology. junho de 2014;155(6):2266–76.

103. Hasan AA, Hocher B. Role of soluble and membrane-bound dipeptidyl peptidase-4 in diabetic nephropathy. J Mol Endocrinol. julho de 2017;59(1):R1–10.

104. Arruda DF, Martins FL, Dariolli R, Jensen L, Antonio EL, dos Santos L, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition exerts renoprotective effects in rats with established heart failure. Front Physiol. 2016;7(JUL).

105. Uchida K, Suzuki K, Iwamoto M, Kawachi H, Ohno M, Horita S, et al. Decreased tyrosine phosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. Kidney Int. 2008;73:926–32.

106. Ohashi T, Uchida K, Asamiya Y, Tsuruta Y, Ohno M, Horita S, et al. Phosphorylation status of nephrin in human membranous nephropathy. Available at: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10157-009-0241-z.pdf

107. Fan Q, Xing Y, Ding J, Guan N. Reduction in VEGF protein and phosphorylated nephrin associated with proteinuria in adriamycin nephropathy rats. Nephron - Exp Nephrol. 2009;111(4).

108. Aroor A, Zuberek M, Duta C, Meuth A, Sowers JR, Whaley-Connell A, et al. Angiotensin II stimulation of DPP4 activity regulates megalin in the proximal tubules. Int J Mol Sci. 2016;17(5).

109. Beraldo JI, Benetti A, Borges-Júnior FA, Arruda-Junior DF, Martins FL, Jensen L, et al. Cardioprotection Conferred by Sitagliptin Is Associated with Reduced Cardiac Angiotensin II/Angiotensin-(1-7) Balance in Experimental Chronic Kidney Disease. Int J Mol Sci. 20 de abril de 2019;20(8):1940.

110. Malagrino PA, Venturini G, Schneider Yogi P, Dariolli R, Padilha K, Kiers B, et al. Metabolomic characterization of renal ischemia and reperfusion in a swine model ☆. 2016.

111. Malagrino PA, Venturini G, Yogi PS, Dariolli R, Padilha K, Kiers B, et al. Proteome analysis of acute kidney injury – Discovery of new predominantly renal candidates for biomarker of kidney disease. J Proteomics. janeiro de 2017;151:66–73.

8. ANEXOS

Aprovação do comitê de ética

MEDICINA
USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **"Potencial Terapêutico dos Inibidores da Dipeptidil Peptidase IV na Doença Renal Crônica: Renoproteção Independente dos Efeitos Anti-hiperglicêmicos"** protocolo nº 003/16 sob a responsabilidade de **Adriana Castello Costa Girardi** e **Juliana Isa Beraldo**, apresentado pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 16.03.16

Vigência do Projeto	Junho/2017
Espécie/linhagem	Rato wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	250gr
Sexo	macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 16 de Março de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

MEDICINA

USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 21.11.17, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **003/16** intitulado **"Potencial Terapêutico dos Inibidores da Dipeptidil Peptidase IV na Doença Renal Crônica: Renoproteção Independente dos Efeitos Anti-hiperglicêmicos"** apresentado pela Comissão Científica do InCor

- Substituição da pesquisadora executante para **Acaris Benetti dos Santos**
- Prorrogação do prazo do projeto para **dezembro 2020**
- Acréscimo de **30** ratos wistar machos, com aproximadamente 250 grs

Pesquisador Responsável: **Adriana Castello Costa Girardi**

CEUA-FMUSP, 21 de Novembro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br