UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

A memória hiperglicêmica no rim diabético: marcas metabólicas, moleculares e epigenéticas

Antonio Anax Falcão de Oliveira

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

A memória hiperglicêmica no rim diabético: marcas metabólicas, moleculares e epigenéticas

Antonio Anax Falcão de Oliveira

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48m	<p>Oliveira, Antonio Anax Falcão de</p> <p>A memória hiperglicêmica no rim diabético: marcas metabólicas, moleculares e epigenéticas / Antonio Anax Falcão de Oliveira. -- São Paulo, 2016.</p> <p>163p.</p> <p>Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Loureiro, Ana Paula de Melo</p> <p>1. Bioquímica : Metabolismo 2. Fisiopatologia 3. Diabetes mellitus 4. Nefropatias I. T. II. Loureiro, Ana Paula de Melo, orientador.</p> <p>572.4 CDD</p>
------	---

Antonio Anax Falcão de Oliveira

A memória hiperglicêmica no rim diabético: marcas metabólicas, moleculares e epigenéticas

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de DOUTOR

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017

*Aos meus pais, Antonio e Maria,
pelos momentos juntos que nos foram tirados
para que este sonho se concretizasse.*

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

- Processo 2012/08617-4 – Bolsa de Doutorado Direto
- Processo 2012/22190-3 – Auxílio Regular à Pesquisa

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRP-USP – Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A realização de um trabalho como este envolve, além de muito esforço e dedicação, contribuições e trocas nas mais diversas esferas. Por isso, registro aqui os meus sinceros agradecimentos àqueles que foram tijolos, pilares e pontes para que esse projeto ganhasse vida.

Aos meus pais, Antonio e Maria, que, na sua simplicidade, me ensinaram os melhores valores, me presentearam com amor verdadeiro e incondicional, e me apoiaram em mais essa jornada, mesmo que isso nos tenha custado viver a mais de 1.600 milhas de distância.

Aos meus irmãos e cunhadas por, perto ou longe, reconhecer minhas virtudes, apoiar as minhas escolhas e oferecer quaisquer formas de suporte que sempre precisei. Agradeço também por me presentear com 5 pequenas grandes pessoas, Mariana, Eloísa, Pablo, Álvaro e Gabi, que trouxeram ainda mais amor e alegria para a minha vida. Ser o tio Anax me ensina, me faz ser uma pessoa melhor e torna o fardo sempre mais leve.

À minha avó Adalgisa (*In memoriam*), meu primeiro modelo de cientista, ainda que sem formação, pelas horas de ensinamentos sobre a natureza, especialmente sobre as plantas, pelos valores preciosos que ajudou a cultivar em mim e pelo exemplo de coragem e determinação que sempre me serviram de inspiração.

Aos meus Professores do Ensino Médio, na E.E.C.C.Q, especialmente Vilcemar, Lavoisier e José Nilton que, vencendo as limitações de infra-estrutura de uma escola pública no interior do Brasil, regaram a semente de amor pela ciência que já existia em mim naquela altura e me incentivaram a levar meus sonhos adiante.

À Professora Maria Tereza, da Universidade Anhembí Morumbi, por ter me ajudado a amadurecer o amor pela ciência, por ter embarcado comigo em um projeto de iniciação científica onde parecia não haver espaço para tanto, pelo incentivo e ajuda para encontrar novos caminhos na pesquisa e, sobretudo, pelos ouvidos sempre abertos e palavras sempre prontas pra acalmar e ensinar.

À Professora Ana Paula Loureiro, por ter aberto as portas do laboratório e me oferecido a oportunidade de dar esse passo importante na minha vida profissional; pela coragem e confiança de iniciarmos um trabalho completamente novo para o grupo; pela

prontidão e disponibilidade em resolver os inúmeros desafios que surgiram ao longo do caminho; pelo tempo compartilhado na bancada, até mesmo nas madrugadas e fins de semana; pelas discussões científicas e ensinamentos muito valiosos; pelo exemplo de disciplina e dedicação; por ajudar a despertar em mim o espírito curioso, crítico e minucioso essenciais ao trabalho de um cientista.

Aos colegas de laboratório, Carla, Rafaela, Fabiana, André, João Manuel e Everson, pela troca de experiências, pelas conversas e cafés entre um e outro experimento, por terem tornado o dia-a-dia mais leve ao longo desses anos. Agradeço especialmente ao Tiago, cuja convivência foi a mais longa entre os colegas do grupo, e que se transformou numa boa parceria. Agradeço o apoio constante, a disponibilidade em sanar dúvidas, a ajuda imprescindível nos experimentos de espectrometria de massas, os serviços gráficos e, claro, as ideias mirabolantes que compartilhamos sempre.

À Larissa Bobadilla pela boa relação que criamos, pela prontidão e ajuda incansável, especialmente nos experimentos com os animais.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Tania, Elizabeth, Ernani, Maurício e Sandra, pela disponibilidade de equipamentos em seus laboratórios para diversos experimentos, pelo apoio em situações burocráticas ou não, pela experiência engrandecedora na CCP, pelas conversas, trocas, sugestões e ensinamentos.

Aos funcionários do departamento, Samantha, Ângelo, Rose, Dalva, Cláudia, que, às vezes nos bastidores, fizeram muitas coisas funcionar e se colocaram sempre à disposição para ajudar no que fosse necessário. Agradecimento especial à Dona Luzia pelo exemplo de dedicação e amor ao trabalho que escolheu, e pelo melhor café da FCF, que foi essencial em diversos momentos.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos pela troca não só de equipamentos, mas também de ideias e conhecimento. Aos alunos do Professor Maurício Yonamine, Margarita, Ana, Sarah, Gabi, Flávia Roveri, Kátia, Idylla, Flávia Pine e Jefferson, com quem dividi cafés, almoços, ideias, angústias e, mais importante, dei muitas risadas. Obrigado por terem me adotado até nos momentos fora da USP, e que assim seja com nossa amizade.

Aos Professores Marisa Medeiros e Paolo de Mascio, IQ USP, pela colaboração científica e disponibilidade de uso dos equipamentos nos experimentos com

espectrometria de massas, sem os quais boa parte deste trabalho não teria sido executada.

Ao Professor Roberto Zatz, da Faculdade de Medicina USP, pela ajuda essencial no delineamento experimental deste trabalho e pela ajuda para realização da perfusão renal retrógrada. À Miriam Lemos, NUCEL USP, pelo apoio na elaboração do sistema de perfusão e cirurgia.

À Flávia Ong e Livia, do Biotério da FCF/IQ, pela paciência e ensinamentos durante o longo período de experimentação com os animais.

À Liliane e Alexandre, do grupo da Professora Silvia Cozzolino, FCF USP, pela colaboração nas análises bioquímicas semi-automatizadas.

À Professora Maria Oliveira, ICB USP, pelas sugestões para as análises histológicas e colaboração na análise da área glomerular.

À Camila Carrião, ICEB UFOP, pela colaboração nos experimentos de *Western blot*.

À Professora Silvy Stuchi e à Fernanda Faião pela colaboração nos experimentos de expressão gênica.

À Professora Nadja de Souza-Pinto e Carolina Berra, IQ USP, pela colaboração na análise de pureza do DNA mitocondrial e posteriormente nos experimentos de expressão proteica de AMPK e pAMPK.

À Professora Susan Ozanne e colegas do seu grupo de pesquisa no Departamento de Bioquímica Clínica da Universidade de Cambridge, pela oportunidade do estágio no exterior. Ao Professor Thomas Ong pela amizade e apoio indispensável durante a minha estadia em Cambridge.

Chegar até aqui poderia ter sido muito mais difícil se não pudesse contar com o amor e apoio incondicional de grandes amigos com os quais a vida me presenteou. Aos de longe e de longa data, mas que se mantiveram sempre por perto, Rony, Hévila, André, Pâmela e Eliedna: vocês me fazem lembrar que existe uma força interior muito grande em nós; vocês são a referência sempre viva da minha origem e uma fonte inesgotável de alegria. Obrigado pela amizade que resiste até mesmo à ausência. Aos que São Paulo colocou no meu caminho e que, definitivamente, quero levar comigo sempre: Cláudia, Alyne, Gêssica, Aline Martins, Marcela, Caio, sobreviver nessa selva de pedras é muito melhor ao lado de vocês. Aos amigos-irmãos, com quem dividi não só uma casa física, mas compartilhei problemas, angústias da Pós-graduação, dicas de limpeza, receitas e que se tornaram também minha família: Thales, Kamila, Danilo e

Michele. Obrigado pela companhia e pelos momentos bons que dividimos ao longo desses anos.

Fabi, Gabi e Ana Miguel, vocês merecem um agradecimento especial e isso dispensa explicações. Nas minhas melhores e piores memórias vividas aqui, vocês se fizeram presente. Obrigado por ser um porto seguro sempre, por me ouvir, por me ajudar a enxergar as coisas de outra forma, por me despertar o meu melhor lado, por me oferecer o seu melhor, inclusive as suas casas e famílias, que faço questão de citar nominalmente: Vó Tereza, Renata, Sandra, Nanci, Isabel e Pedro. Serei sempre grato a vocês!

Finalmente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela força e proteção que, ainda que fujam do nosso entendimento, me fazem continuar caminhando.

Minha sincera gratidão a todos!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

OLIVEIRA, A. A. F. **A memória hiperglicêmica no rim diabético: marcas metabólicas, moleculares e epigenéticas.** 2016. 163f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A nefropatia diabética (ND) é uma das complicações microvasculares do diabetes e consiste no dano ao parênquima renal por consequência de uma série de fatores hemodinâmicos e moleculares. A ocorrência de ND e de outras complicações mesmo em indivíduos sob adequado controle glicêmico tem sido associada a um fenômeno conhecido como memória metabólica. Neste trabalho foram investigadas vias bioquímicas e moleculares persistentemente alteradas no rim de animais diabéticos tratados após um período inicial de hiperglicemia, com o propósito de entender os mecanismos envolvidos na memória metabólica. Para tanto, ratos com diabetes induzida por estreptozotocina foram mantidos hiperglicêmicos durante 4 semanas (período curto) ou 12 semanas (período longo) e posteriormente tratados com insulina isoladamente ou combinada com metformina (100mg/kg/dia) durante as 4 (período curto) ou 12 (período longo) semanas seguintes. Todos os animais tratados tiveram os seus níveis glicêmicos e função renal normalizados. Os tratamentos também foram capazes de normalizar os níveis elevados de malonaldeído no rim, bem como a excreção aumentada dos adutos de DNA 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) e *N*²-carboxietil-2'-desoxiguanosina (CEdG) na urina observados nos animais diabéticos. Níveis aumentados de 8-oxodG foram detectados em DNA mitocondrial (mtDNA), mas não em DNA nuclear, de animais diabéticos apenas no período curto de estudo e também foram normalizados após o controle glicêmico. Nós identificamos uma via gradualmente alterada durante o curso do diabetes que permanece persistentemente alterada após o controle glicêmico tardio. Essa via compreende um declínio precoce do clearance de ácido úrico e expressão da pAMPK, seguida pelo acúmulo de fumarato, expressão aumentada de TGF- β , expressão reduzida de PGC-1 α e redução da metilação e hidroximetilação do mtDNA. A redução persistente do clearance de ácido úrico em animais diabéticos tratados pode sustentar as alterações bioquímicas renais prolongadas observadas após o controle glicêmico, e essa regulação é provavelmente mediada pela redução sustentada da expressão de pAMPK e pela indução de inflamação. Este trabalho propõe a primeira consideração do possível papel da hiperuricemia e das alterações bioquímicas subjacentes como parte da memória metabólica na nefropatia diabética.

Palavras-chave: Nefropatia diabética, memória metabólica, ácido úrico, pAMPK, fumarato, TGF- β .

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. A. F. **The hyperglycemic memory in diabetic kidney: metabolic, molecular, and epigenetic marks.** 2016. 163f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diabetic nephropathy is one of the diabetes microvascular complications, and it consists on the damage to the renal parenchyma due to several hemodynamic and molecular factors. The occurrence of diabetic nephropathy and other complications even in those individuals under tight glycemic control has been associated to a phenomenon known as metabolic memory. Here we investigated biochemical and molecular pathways persistently altered in the kidney of diabetic animals treated after a previous period of hyperglycemia, aiming to understand underlying mechanisms in metabolic memory. Streptozotocin-induced diabetic rats were maintained hyperglycemic during 4 (short period) or 12 weeks (long period), and then they were treated with insulin alone or combined with metformin (100 mg/kg/day) for the following 4 or 12 weeks, respectively. All the treated animals had their glycemic levels and renal function normalized. The treatments were also able to control enhanced kidney malondialdehyde levels, as well as the increased urine excretion of the DNA adducts 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and *N*²-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine seen in diabetic animals. Increased levels of 8-oxodG were detected in mitochondrial DNA, but not in nuclear DNA of diabetic animals in the short period, and were also recovered after glycemic control. We have identified a kidney pathway that is gradually altered during the course of diabetes and remains persistently changed after late glycemic control. This pathway comprises an early decline of uric acid clearance and pAMPK expression followed by fumarate accumulation, increased TGF- β expression, reduced PGC-1 α expression, and downregulation of methylation and hydroxymethylation of mitochondrial DNA. The sustained decrease of uric acid clearance in treated diabetes may support the prolonged kidney biochemical alterations observed after tight glycemic control, and this regulation is likely mediated by the sustained decrease of AMPK activity and the induction of inflammation. This work proposes the first consideration of the possible role of hyperuricemia and the underlying biochemical changes as part of metabolic memory in diabetic nephropathy.

Keywords: Diabetic nephropathy, metabolic memory, uric acid, pAMPK, fumarate, TGF- β

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais vias bioquímicas envolvidas no desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes. Adaptado de Brownlee (2001).	35
Figura 2	Mecanismos envolvidos no dano causado por AGEs em células endoteliais, macrófagos e células mesangiais. Adaptado de Brownlee (2001).	38
Figura 3	Mecanismos operantes na memória metabólica, de acordo com estudos revisados por Ceriello e colaboradores (2009). A produção de superóxido a nível mitocondrial como consequência da hiperglicemia é uma possível causa da memória metabólica do estresse hiperglicêmico após a normalização da glicemia. A superprodução de ROS é um evento chave na ativação de outras vias envolvidas no desenvolvimento de complicações do diabetes, como a via do poliol, formação aumentada de AGEs, ativação da PKC, e fluxo aumentado da via das hexosaminas. A glicação de proteínas mitocondriais favorece a superprodução de superóxido, uma condição que não depende dos níveis glicêmicos. A ligação de AGEs ao RAGE promove a geração intracelular de ROS que, por sua vez, promovem a expressão de RAGE. O mtDNA pode influenciar a expressão gênica e ao mesmo tempo contribuir para a geração de radicais livres em nível mitocondrial. Estas condições se auto sustentam, levando à geração de estresse oxidativo persistente, independente dos níveis glicêmicos atuais, o que pode contribuir com a memória metabólica. Adaptada de Ceriello e colaboradores (2009).	50
Figura 4	Delineamento experimental dos estudos de curta e longa duração.	61
Figura 5	Representação esquemática do sistema de perfusão. Ar comprimido medicinal foi utilizado para bombear solução salina ou solução Dubosq-Brazil modificada sob pressão controlada. Um sistema de válvulas permitiu selecionar a solução de interesse. A, Rim perfundido <i>in situ</i> com solução salina. B, Rim perfundido <i>in situ</i> com solução Dubosq-Brazil modificada.	63
Figura 6	Esquema do método proposto para quantificação de hemoglobina glicada, baseada na razão entre heptapeptídeo glicado e não glicado, liberados a partir da clivagem enzimática pela endoproteinase Glu-C.	65
Figura 7	Glicemia (mg/dL) ao longo de 8 ou 24 semanas. O Controle glicêmico foi alcançado de 7 a 14 dias após o início do tratamento.	84

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.

- Figura 8 Níveis de malonaldeído no tecido renal (pmol/mg de proteína) no estudo de curta duração após 8 semanas (A) e no estudo de longa duração após 12 (B) e 24 semanas (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle diabético. 86
- Figura 9 8-oxodG e CEdG (pg/24h) em urina dos animais do estudo de curta duração após 4 semanas (A e C, respectivamente), antes do início do tratamento, e após 8 semanas (B e D, respectivamente), ao final do período de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle diabético. 87
- Figura 10 8-oxodG e CEdG (pg/24h) em urina dos animais do estudo de longa duração após 6, 8, 12, 18 e 24 semanas. De A a E estão apresentados os dados de 8-oxodG e de F a J os dados de CEdG nos períodos mencionados, respectivamente. Em 12 semanas a quantificação foi realizada apenas nos animais dos grupos ND12 e D12. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle diabético. 88
- Figura 11 8-oxodG (8-oxodG/ 10^6 dG) em DNA nuclear após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo e em DNA mitocondrial nos mesmos períodos (D, E e F, respectivamente). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle não diabético. + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético. 89
- Figura 12 CEdG (CEdG/ 10^6 dG) em DNA nuclear após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo e em DNA mitocondrial nos mesmos períodos (D, E e F, respectivamente). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais de acordo com teste t para o experimento realizado em 12 semanas ou ANOVA e pós-teste de Sidak para os demais períodos. 90
- Figura 13 Expressão renal de SOD2 (razão SOD2/ β -actina em relação ao grupo controle não diabético em unidades arbitrárias). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais 91

por grupo. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais de acordo com teste t para o experimento realizado em 12 semanas ou ANOVA e pós-teste de Sidak para os demais períodos.

- Figura 14 Expressão de pAMPK (Thr172) quantificada por ELISA e expressa em intensidade de absorbância a 450 nm. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. 91
- Figura 15 Níveis proteicos de AMPK e pAMPK (Thr172) quantificados por *western blot* e expressos em unidades arbitrárias após correção pelo nível de β -actina como controle endógeno. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Imagens representativas das bandas obtidas em cada um dos períodos estudados são apresentadas em D, E e F, respectivamente. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. 92
- Figura 16 Níveis proteicos de TGF- β quantificados por *western blot* e expressos em unidades arbitrárias após correção pelo nível de β -actina como controle endógeno. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Imagens representativas das bandas obtidas em cada um dos períodos estudados são apresentadas em D. Expressão gênica do *Tgf- β* (unidades arbitrárias da razão ΔCT *Tgf- β /Actina* em relação ao controle não diabético) após 12 (E) e 24 (F) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle não diabético. + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético. 93
- Figura 17 Atividade de Sirt-1 (μM de peptídeo desacetilado) no tecido renal dos animais do estudo de curta duração (A) e longa duração após 12 (B) e 24 (C) semanas. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. ++ $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético. 94
- Figura 18 Clearance de ácido úrico (dL/h) após 8 (A) e 24 (C) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. Em C é demonstrada correlação de Pearson entre pAMPK renal e clearance de ácido úrico. Foram incluídos dados dos estudos de curta e longa duração. N = 45. 94

Figura 19	Níveis de fumarato no tecido renal dos animais do estudo de curta duração (A) e longa duração após 12 (B) e 24 (C) semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média da razão de fumarato em cada grupo experimental versus o respectivo controle não diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético.	97
Figura 20	Níveis proteicos de PGC-1 α quantificados por <i>western blot</i> e expressos em unidades arbitrárias após correção pelo nível de β -actina como controle endógeno. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo, com imagens representativas das bandas obtidas em cada um dos períodos estudados. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle não diabético.	99
Figura 21	Níveis de 5-mC e 5-hmC (%) em DNA mitocondrial de rim dos animais do estudo de curta duração (A e D) e longa duração após 12 (B e E) e 24 (C e F) semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparado com o respectivo grupo não diabético.	100
Figura 22	A hiperglicemia ativa uma via fibrogênica no rim que permanece alterada após a recuperação da glicemia normal, dependendo do período prévio de hiperglicemia vivenciado pelo animal. Os componentes coloridos na imagem foram quantificados nesse estudo e permaneceram alterados após o controle glicêmico tardio, indicando que eles participam da memória metabólica no rim diabético. A alteração persistente do clearance de ácido úrico pode alimentar as alterações bioquímicas renais prolongadas, observadas após o controle glicêmico. A demonstração desse desarranjo metabólico sustentado pode ajudar a esclarecer o longo intervalo requerido entre o estabelecimento do controle glicêmico em indivíduos diabéticos e a redução do risco de desenvolvimento de doença renal crônica.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condição cromatográfica para quantificação do heptapeptídeo glicado e não glicado.	67
Tabela 2	Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação das lesões CEdG e 8-oxodG em DNA nuclear de rim (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).	72
Tabela 3	Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).	78
Tabela 4	Fragmentações e energias utilizadas para análise do nível de metilação e hidroximetilação em DNA nuclear e mitocondrial de rim (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).	80
Tabela 5	O prejuízo precoce à função renal é recuperado pelo controle glicêmico após os períodos curto e longo de hiperglicemia. O peso corpóreo e a glicemia foram avaliados semanalmente ao longo do estudo, mas os valores na tabela se referem às medidas nos períodos especificados. No estudo de curta duração, a função renal e a HbA1c foram avaliadas em dois períodos (4 e 8 semanas). No estudo de longa duração estes parâmetros foram avaliados em 3 períodos (6, 18 e 24 semanas). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0.05$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0.01$ comparado com o respectivo grupo diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.	85
Tabela 6	Níveis de ácido úrico no plasma (mg/dL) e urina (mg/24h) nos estudos de curta (8 semanas) e longa duração (24 semanas). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle não diabético.	95
Tabela 7	Níveis de AMP, ADP, ATP, e razões AMP/ATP e ADP/ATP no tecido renal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média em unidades de pmol/ μ g de proteína. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ e +++ $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.	96
Tabela 8	Níveis de intermediários do ciclo de ácido tricarboxílico no tecido renal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média em unidades de pmol/ μ g de proteína. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo não diabético.	98

+p<0.05 e +++p<0.001 comparado com o respectivo grupo diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Diabetes Association*

ADP: Adenosina difosfato

AGEs: Produtos avançados de glicação

AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosida

ALE: Produto avançado de lipoxidação

AMP: Adenosina monofosfato

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

pAMPK: Proteína quinase ativada por AMP fosforilada

ANOVA: Análise de variância

AR: Aldose redutase

ATP: Adenosina trifosfato

BER: Reparo por excisão de base

BRECs: Células endoteliais capilares de retina bovina

BSA: *Bovine serum albumin*

CedG: N^2 -carboxietil-2'-desoxiguanosina

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CML: N^{ϵ} -(carboximetil)lisina

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTGF: *Conjunctive tissue growth factor*

DAD: Detector de arranjos de fotodiodos

DAG: Diacilglicerol

DCCT: *Diabetes Control and Complications Trial*

dG: 2'-desoxiguanosina

DM: *Diabetes mellitus*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNPH: Dinitrofenilhidrazina

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EDIC: *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Ensaio Imunoenzimático

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

ESI: *Electrospray Ionization*

ESRD: *End stage of renal disease*

FADH₂: *Flavin adenine dinucleotide*

FoxO: *Forkhead box O*

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase

GSH: Glutathiona reduzida

HbA1c: Hemoglobina glicada

HepG2: Células de carcinoma hepatocelular humano

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IDF: *International Diabetes Federation*

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

IL-1: Interleucina – 1

IL-6: Interleucina – 6

KIM-1: Molécula de injúria renal-1

LKB1: Proteína quinase hepática B1

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MDA: Malonaldeído

miRNA: micro RNA

MnSOD: Superóxido dismutase dependente de manganês

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

mtDNA: DNA mitocondrial

mtDNMT1: DNA metiltransferase 1 mitocondrial

m/z: Razão massa/carga

NADH: *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

ND: Nefropatia diabética

nDNA: DNA nuclear

NER: *Nucleotide excision repair*

NF-κB: *Nuclear factor kappa B*

NLRP3: *NOD-like receptor protein 3*

NOS: Óxido nítrico sintase

Nox4: NADPH oxidase isoforma 4

OCT: Transportador de cátions orgânicos

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAI-1: *Plasminogen activator inductor* - 1

PAR: Poli ADP-ribose

PARP: Poli(ADP-ribose)polimerase

PAS: Ácido periódico de Schiff

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PGC-1 α : Coativador 1 α do receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo

PKC: Proteína quinase C

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

RAGE: Receptor de produtos avançados de glicação

RIPA: Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SAPK: *Stress-activated protein kinase*

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SIRT-1: Sirtuína – 1

Sp-1: *Specificity protein 1*

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STZ: Estreptozotocina

TBS: *Tris-buffered saline*

TFG: Taxa de filtração glomerular

TGF- β : *Transforming growth factor- β*

TGF- β R1 e R2: Receptores do *Transforming growth factor- β*

TNF- α : Fator de necrose tumoral - α

TSP-1: Trombospondina – 1

UCP-1: Proteína desacopladora mitocondrial – 1

UKPDS: *United Kingdom Prospective Diabetes Study*

VEGF: *Vascular endothelium growth factor*

1N²- ϵ dA: 1,N⁶-eteno-2'-desoxiadenosina

5-mC: 5-metilcitosina

5-hmC: 5-hidroximetilcitosina

8-OxodG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Apresentação	25
1.2	Diabetes mellitus: definição, classificação e epidemiologia	26
1.3	Complicações crônicas do DM – Nefropatia diabética	27
1.4	Bases fisiopatológicas da nefropatia diabética	29
1.4.1	Aspectos Hemodinâmicos	29
1.4.2	Aspectos Metabólicos	31
1.4.3	Glicação Avançada	36
1.4.4	Estresse Oxidativo	40
1.4.5	Mecanismos Epigenéticos	44
1.5	Memória Metabólica	46
2	OBJETIVOS	52
2.1	Objetivo geral	52
2.2	Objetivos específicos	52
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	Reagentes e insumos	54
3.2	Equipamentos	55
3.2.1	Equipamentos básicos	55
3.2.2	Espectrofotômetros e Transiluminador	56
3.2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	56
3.2.3.1	HPLC-DAD	56
3.2.3.2	HPLC-ESI/MSn	57
3.2.3.3	HPLC-ESI-MS/MS	57
3.2.4	Sistemas de Eletroforese e Transferência de Proteínas	57
3.3	Modelo experimental	58
3.3.1	Animais	58
3.3.2	Indução de Diabetes	58
3.3.3	Delineamento Experimental	59
3.4	Monitoramento do diabetes e função renal	61
3.5	Coleta de rins e eutanásia	62
3.6	Quantificação de hemoglobina glicada	64

3.6.1 Princípio do método	64
3.6.2 Preparo da amostra	65
3.6.3 Quantificação de hemoglobina total	66
3.6.4 Clivagem enzimática da hemoglobina	66
3.6.5 Análise por HPLC-ESI/MSn <i>Ion Trap</i>	66
3.6.6 Validação do método	67
3.7 Quantificação de malonaldeído	67
3.8 Quantificação de adutos de DNA em urina	68
3.9 Quantificação de adutos em DNA nuclear e mitocondrial	69
3.9.1 Extração de DNA nuclear e mitocondrial	69
3.9.2 Quantificação de adutos em DNA nuclear	71
3.9.3 Quantificação de adutos em DNA mitocondrial	72
3.10 Análise da expressão de proteínas	74
3.11 Análise da Expressão Gênica do <i>Tgf-β</i>	75
3.12 Quantificação de pAMPK por ELISA	76
3.13 Análise da atividade de Sirtuína-1	76
3.14 Quantificação de intermediários de Krebs	77
3.15 Quantificação de ATP, ADP e AMP	78
3.16 Quantificação de ácido úrico em plasma e urina	79
3.17 Análise da metilação e hidroximetilação global do mtDNA	79
3.18 Análise estatística	81
4 RESULTADOS	83
4.1 Glicemia, peso e função renal	83
4.2 Marcadores de estresse oxidativo e glicação do DNA	86
4.3 Expressão de pAMPK e TGF-β	91
4.4 Atividade de Sirt-1 e níveis de ácido úrico	93
4.5 AMP, ADP e ATP no tecido renal	95
4.6 Intermediários do ciclo de Krebs	97
4.7 Expressão de PGC-1α, metilação e hidroximetilação do mtDNA	99
5 DISCUSSÃO	102
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	116
REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	142

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

O cenário atual de pesquisa em Toxicologia é extremamente complexo e amplo, tendo, entretanto, mantido o mesmo objetivo que na sua origem: a proteção à saúde por meio da redução dos riscos de desenvolvimento de doenças. Ao longo da história da Toxicologia esse cenário vem migrando da exposição a altas concentrações/doses de xenobióticos, desencadeando efeitos claramente associados a essas exposições, para a exposição a baixas concentrações/doses para as quais não é possível associar um efeito em curto prazo, mas que podem resultar no desenvolvimento de doenças a longo prazo (GALLO, 2013).

A exposição crônica a baixas concentrações de xenobióticos, juntamente com características individuais, hábitos alimentares e atividade física são capazes de modular alterações moleculares e celulares ao longo da vida que poderão culminar nas doenças tipicamente associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (LIEBLER, 2006). Diante da crescente incidência dessas doenças, acompanhada do aumento da mortalidade pelas mesmas, deve ser criado espaço na área de Toxicologia para estudos de mecanismos de toxicidade envolvidos no processo de adoecimento (JACOBS; MARNETT, 2007).

Atuar na redução dos riscos envolve conhecer os mecanismos pelos quais tais doenças se desenvolvem e desenvolver ferramentas para intervir nessas vias, buscando aumentar a qualidade de vida da população. A Toxicologia deve estar alinhada às demais áreas de pesquisa na busca de soluções para as principais doenças que afligem a humanidade nos dias atuais. Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de tais doenças estão, em geral, associados à concentração/dose de substâncias reativas no organismo (LIEBLER, 2006). Assim, as mesmas substâncias que em concentrações/doses baixas promovem a saúde, levam à doença se em concentrações/doses elevadas, atendendo ao princípio da Toxicologia de que a dose faz o veneno ou o remédio (GALLO, 2013; JACOBS; MARNETT, 2007).

Assim como o cenário de atuação da Toxicologia mudou ao longo da história, nossa atenção deve também considerar essa nova perspectiva de toxicantes gerados

endogenamente em função do estilo de vida do indivíduo. Indo ao encontro desse novo cenário, esse trabalho propõe investigar mecanismos pelos quais a hiperglicemia leva ao desenvolvimento de nefropatia diabética no contexto da memória metabólica.

1.2 Diabetes *mellitus*: definição, classificação e epidemiologia

Diabetes *mellitus* (DM) consiste em um grupo de alterações metabólicas que têm em comum a ocorrência de hiperglicemia como consequência de falhas na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambas. Do ponto de vista etiológico, o diabetes *mellitus* pode ser classificado em DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. O DM tipo 1 corresponde a 5 a 10% dos casos e ocorre pela destruição das células beta pancreáticas, que leva à deficiência de insulina. Essa destruição na maioria dos casos é de caráter autoimune, mas em outros casos é tida como idiopática. O DM tipo 2 é a forma mais prevalente da doença (90 a 95% dos casos) e é caracterizada tanto pela resistência à ação da insulina quanto pelo prejuízo na sua secreção. Essa forma de DM está mais relacionada ao estilo de vida do indivíduo e à suscetibilidade individual e é comumente associada a sobrepeso ou obesidade. Na classificação de outros tipos específicos de DM estão formas menos comuns da doença cuja causa pode ser identificada, como por exemplo, doenças do pâncreas exócrino, como tumor de pâncreas, ou alterações genéticas pontuais. O DM gestacional, por sua vez, engloba qualquer intolerância à glicose iniciada ou diagnosticada durante a gestação e as suas características se assemelham ao DM tipo 2 (ALBERTI; ZIMMET, 1998; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O diabetes *mellitus* é considerado uma epidemia global e tem preocupado organizações de saúde no mundo inteiro. Os últimos dados reportados pelo *International Diabetes Federation* (IDF) estimam que existem 415 milhões de diabéticos no mundo inteiro, o que representa 8,8% da população adulta mundial. Praticamente 75% destes vivem em países de baixa e média renda, onde a epidemia está crescendo em um ritmo alarmante. Se esta tendência for mantida, estima-se que em 2040 existirão 642 milhões de indivíduos diabéticos. Os dados são também preocupantes do ponto de vista de mortalidade. Foram registradas 5,0 milhões de mortes

relacionadas à doença, na faixa etária de 20 a 79 anos, em 2015. Isso representa 14,5% de todas as causas de morte nesta faixa etária no mesmo ano em todo o mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Na América Central e América do Sul havia 29,6 milhões de pessoas com diabetes em 2015, o que representa 9,4% da população adulta. A estimativa do IDF é de que em 2040 este número pode chegar a 48,8 milhões de pessoas. Além disso, dados atuais mostram que nesta mesma região 42,2 milhões de pessoas, ou 8,0% da população adulta, já apresenta intolerância à glicose. Entre os países da América Central e América do Sul, o Brasil tem o maior número de pessoas com diabetes (14,3 milhões), com uma prevalência de 10-12%. Em se tratando de mortalidade, em 2015 foram registradas 247.500 mortes atribuídas ao diabetes entre adultos nessa região, sendo que só no Brasil ocorreu pouco mais da metade (130.700) de todas as mortes por diabetes na região (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Os gastos com saúde relacionados com diabetes foram estimados em 12,0% de todos os gastos com saúde no mundo em 2015. Isso representa um total de 673 bilhões de dólares utilizados para tratar o DM e suas complicações. Na América Central e América do Sul 12,0% de todos os gastos com saúde são atribuídos ao diabetes em adultos, sendo que em 2015 este valor girou em torno de 34,6 bilhões de dólares (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

1.3 Complicações crônicas do diabetes – Nefropatia diabética

Um aspecto que contribui diretamente com aumento dos gastos com saúde e da mortalidade relacionada à DM é a ocorrência de complicações microvasculares e macrovasculares, como doença cardiovascular, neuropatia, retinopatia e doença renal.

Do ponto de vista epidemiológico, a incidência de nefropatia diabética (ND) mais que dobrou na última década e sabe-se que ela é responsável por mais de 50% de todos os casos de estágio final de doença renal (ESRD), quando o paciente precisa de terapia renal substitutiva (KANWAR et al., 2011). Hiperglicemia, hipertensão arterial e predisposição genética são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ND. Outros fatores que parecem desempenhar um papel sobre o risco de se desenvolver essa

complicação do diabetes são níveis séricos de lipídios elevados, tabagismo e quantidade e origem das proteínas da dieta (GROSS et al., 2005; RITZ, 2006).

A ND resulta de uma combinação de anormalidades hemodinâmicas e metabólicas e consiste basicamente no dano ao parênquima renal provocado pelo DM. A forma clinicamente aparente é caracterizada por um declínio progressivo da taxa de filtração glomerular (TFG), proteinúria persistente e hipertensão. O estágio inicial da doença consiste na progressão de um estado de normoalbuminúria para microalbuminúria e mais tarde para macroalbuminúria, provocando um prejuízo contínuo à função renal e o início do declínio da TFG (BICHU et al., 2009; GROSS et al., 2005).

Embora os termos micro e macroalbuminúria tenham sido amplamente empregados para classificar a ND, a Associação Americana de Diabetes passou a classificar a albuminúria apenas como normal ou aumentada, uma vez que os valores de corte foram definidos em estudos realizados em populações pequenas de pacientes com DM tipo 1. Com base no último consenso, o valor de corte de albuminúria utilizado como critério diagnóstico de ND é ≥ 14 mg/L ou ≥ 30 mg/24 h. A medida da TFG também passou a ser considerada uma ferramenta importante no diagnóstico de ND, uma vez que uma porcentagem de pacientes apresenta TFG reduzida mesmo sem alteração do nível de albuminúria (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; KRAMER et al., 2007; MACISAAC et al., 2004).

Alterações morfológicas e estruturais no tecido renal também são importantes na caracterização da ND. No estágio inicial da doença essas alterações podem ser ausentes ou se limitam a proliferação mesangial leve. Posteriormente pode haver progressão para uma expansão da matriz mesangial. Por fim, em estágios mais avançados, ocorrem lesões glomerulares graves, como proliferação mesangial e expansão de matriz bem acentuadas, acompanhadas de espessamento da membrana basal glomerular e surgimento de fibrose periglomerular. Quando a expansão da matriz é muito intensa, pode ocorrer a formação de nódulos grosseiros, PAS-positivos, que conferem ao glomérulo um aspecto lobulado, o que denomina a lesão de nefropatia diabética nodular intercapilar ou lesão de Kimmestiel-Wilson. Nesse estágio a lesão renal é irreversível e as medidas terapêuticas visam controlar a progressão. Alterações semelhantes acontecem no compartimento tubulointersticial, incluindo hipertrofia tubular, seguida por espessamento da membrana basal tubular e fibrose intersticial (O'CONNOR; SCHELLING, 2005; TITAN, 2008; ZYIADEH; SHARMA, 2003).

É notório que a ND apresenta um caráter multicelular e que a falha renal progressiva é o produto da injúria provocada pela hiperglicemia aos vários tipos de células que compõem o rim, como podócitos, células mesangiais, epitélio tubular, fibroblastos intersticiais e endotélio vascular. Cada tipo celular é afetado em menor ou maior grau e responde de maneira particular, o que justifica a complexidade dos mecanismos patogênicos envolvidos na doença (KANWAR et al., 2011). A seguir os principais aspectos das bases fisiopatológicas da ND serão discutidos.

1.4 Bases fisiopatológicas da nefropatia diabética

1.4.1 Aspectos hemodinâmicos

Os danos ao parênquima renal provocados por desregulação hemodinâmica talvez tenham sido o primeiro aspecto explorado na tentativa de entender a fisiopatologia da ND. De fato, a ocorrência de hiperfiltração glomerular em pacientes recém-diagnosticados com DM ou em modelos experimentais de DM foi bem caracterizada. Posteriormente, estudos de micropunção permitiram mostrar que esse fenômeno ocorre tanto por aumento no fluxo plasmático glomerular quanto na pressão capilar glomerular. A comprovação de que essas anormalidades hemodinâmicas precoces eram importantes no desenvolvimento da ND se deu por meio da observação de que a prevenção da hipertensão capilar glomerular em ratos diabéticos culminava em uma proteção contra alterações estruturais e proteinúria (HOSTETTER et al., 1981; ZATZ et al., 1986).

Outros estudos realizados na década de 1980 reforçaram a ideia de que a hiperfiltração é um importante mecanismo de lesão renal na ND. À medida que se torna persistente, a hipertensão glomerular exige um aumento de função do néfron, tanto do ponto de vista de filtração quanto de excreção. Como resultado tem-se proteinúria, glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial. A longo prazo ocorre perda de néfrons e, como consequência, os néfrons remanescentes sofrem sobrecarga mais acentuada de modo a alimentar o ciclo vicioso de dano renal (ANDERSON et al., 1985; ZATZ et al., 1985).

A relevância da relação entre alterações hemodinâmicas e lesão renal foi ressaltada também em estudos avaliando a influência da ingestão de proteínas na dieta sobre o curso da nefropatia crônica. Na vigência de uma dieta hiperproteica se observava aumento do fluxo plasmático renal e da filtração glomerular, que provocava hipertensão glomerular. Já a restrição proteica, por sua vez, promovia redução da progressão da doença renal crônica. Além da importância teórica para a compreensão das bases fisiopatológicas da doença renal crônica, esse conhecimento trouxe benefícios no sentido de direcionar a orientação nutricional para os pacientes portadores da doença (KLAHR et al., 1994; ROSEMBERG, CHMIELEWSKI; HOSTETTER, 1990).

Embora o papel das alterações hemodinâmicas no desenvolvimento de doença renal crônica já estivesse bem estabelecido, até então não havia indícios dos mecanismos moleculares que explicavam essa relação. Uma importante contribuição nesse aspecto veio da constatação de que a utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) para controlar a hipertensão glomerular exercia um papel protetor contra a progressão do dano renal, mas o mesmo não acontecia quando se utilizava outras drogas anti-hipertensivas. Apesar de reduzirem a pressão arterial sistêmica, as outras drogas não apresentavam efeitos benéficos sobre a hemodinâmica glomerular. Isso sugeriu o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) como mediador das alterações observadas na doença renal crônica (BJORCK et al., 1992; LEWIS et al., 1993; REMUZZI et al., 1990).

Outras evidências de que o SRAA exerce um papel importante na patogênese da ND vieram de estudos que mostraram aumentos dos níveis séricos de pró-renina em pacientes diabéticos, sugerindo hiperativação do SRAA, bem como aumento da atividade da ECA em pacientes com DM tipo 1. Com esses achados foi proposto que a ativação exacerbada do SRAA, por consequência do DM, interferia na hemodinâmica glomerular provocando hipertensão, que levava posteriormente à lesão renal (FRANKEN et al., 1990; VAN DYK et al., 1994). Ao longo dos anos o papel do SRAA no desenvolvimento de ND foi cada vez mais reforçado. Estudos mecanísticos propuseram, inclusive, que a angiotensina II promovia dano renal por meio do estímulo para a produção de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso sugeriu que além da ação hemodinâmica bem conhecida, o SRAA também provoca dano renal por uma ação metabólica (BISWAS et al., 2008; KAMIYAMA et al., 2013; LIAO et al., 2008; MARRERO et al., 2005). A importância de todos esses achados reside no fato de que as principais estratégias terapêuticas para o

tratamento da ND atualmente se baseiam no uso de inibidores da ECA e bloqueadores do receptor de angiotensina associados ao controle da glicemia (BRENNER et al., 2001; HIRST et al., 2012; MACKINNON et al., 2006; VEJAKAMA et al., 2012; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Além do envolvimento do SRAA, já foi demonstrado também que o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) atua como um mediador importante de alterações da hemodinâmica glomerular na vigência do DM. Estudos em modelos experimentais mostraram que a hiperglicemia leva ao aumento na produção de $\text{NO}^\bullet$ que, por sua vez, promove hiperfiltração glomerular. Esse efeito foi atribuído principalmente à ação vasodilatadora do $\text{NO}^\bullet$ sobre a arteríola aferente no glomérulo (KOMERS; ANDERSON, 2003; PFLUEGER et al., 1999). A ação do $\text{NO}^\bullet$ como promotor de hiperfiltração glomerular foi reforçada quando se observou que a utilização de diferentes inibidores de óxido nítrico sintase (NOS) promovia um efeito vasoconstritor renal e era capaz de reverter a hiperfiltração glomerular, bem como que o aumento da geração basal de $\text{NO}^\bullet$ pela superexpressão de NOS endotelial na microvasculatura renal promovia vasodilatação intra renal típica do estágio precoce de DM (DE VRIESSE et al., 2001; KOMERS, ALLEN; COOPER, 1994).

Esses trabalhos deixam claro que o papel das alterações hemodinâmicas como causadoras de lesão renal na ND foi muito bem estabelecido. Com o passar dos anos se observou que além de um dano exclusivamente mecânico restrito ao endotélio vascular, a hiperfiltração glomerular é consequência do envolvimento de mediadores químicos e também é capaz de promover a ativação de outras moléculas que estão relacionadas à progressão da ND. A resposta a esses mediadores passa a envolver os outros tipos celulares que compõem o tecido renal e culmina em processos metabólicos complexos, cujo entendimento é essencial para a criação de estratégias mais efetivas para o tratamento da doença.

1.4.2 Aspectos metabólicos

Antes de discutir o estado de ativação das vias metabólicas na vigência do DM, é importante considerar que, embora todos os tipos celulares estejam expostos ao ambiente hiperglicêmico, essa ativação ocorre apenas em tipos celulares específicos, o

que explica a suscetibilidade de determinados órgãos ao desenvolvimento de complicações em detrimento dos outros. Essa suscetibilidade de alguns tecidos alvos aos danos provocados pela hiperglicemia está relacionada à capacidade das células de reduzir a captação de glicose quando as suas concentrações extracelulares estão elevadas. Uma relação inversa entre as concentrações extracelulares e o transporte de glicose é observada em células que não são consideradas alvos diretos do dano hiperglicêmico. Em contrapartida, esse mecanismo não existe em células endoteliais vasculares, de modo a ocorrer uma hiperglicemia intracelular na vigência do DM (GIACCO; BROWNLEE, 2010; KAISER et al., 1993).

A primeira via bioquímica apontada como relevante no desenvolvimento de complicações do DM foi a via do poliol, descrita em nervo periférico e medula espinal de ratos (GABBAY; MEROLA; FIELD, 1966). Nessa via a aldose redutase (AR), uma oxidoreductase monomérica dependente de NADPH, medeia a redução da glicose a sorbitol. O sorbitol, por sua vez, é oxidado a frutose pela sorbitol desidrogenase, com redução de NAD^+ a NADH. A AR tem baixa afinidade pela glicose, de modo que em condição de euglicemia uma porcentagem muito pequena da glicose é direcionada para essa via e o principal papel da AR é a redução de aldeídos tóxicos a álcoois inativos. Entretanto, uma vez que a concentração de glicose na célula aumenta, a sua taxa de conversão a sorbitol cresce significativamente (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; SUZEN; BUYUKBINGOL, 2003).

Inicialmente acreditava-se que o sorbitol poderia ser lesivo à célula por causar estresse osmótico, entretanto as concentrações desse álcool encontradas em vasos e nervos de indivíduos diabéticos são muito baixas a ponto de não causarem esse tipo de dano (BROWNLEE, 2001). Posteriormente se propôs que a conversão de sorbitol a frutose aumenta a razão citossólica de NADH/NAD^+ , o que inibe a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e aumenta a concentração de triose fosfato (WILLIAMSON et al., 1993). A principal consequência disso é o aumento da formação de metilglioxal, um precursor de produtos avançados de glicação (AGEs), e de diacilglicerol (DAG), cujos efeitos deletérios serão discutidos adiante. Considerando que a redução da glicose a sorbitol consome NADPH, essa seria uma importante via de indução de estresse oxidativo, uma vez que NADPH é requerido para a manutenção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) que é utilizada pela glutathiona peroxidase para a detoxificação de peróxidos inorgânicos, como o peróxido de hidrogênio, e orgânicos. Camundongos transgênicos com super-expressão de AR apresentaram níveis reduzidos

de GSH em células da retina, apontando esse como um dos principais efeitos negativos do fluxo aumentado de glicose pela via do poliol (BROWNLEE, 2005; LEE; CHUNG, 1999).

O papel da via do poliol no desenvolvimento de complicações vasculares do DM já foi comprovado principalmente no contexto da neuropatia diabética, tanto em modelos experimentais quanto em estudos clínicos (HOTTA et al., 2006; HOTTA et al., 2012; JOHNSON et al., 2004; OBROSOVA et al., 2005). No âmbito da nefropatia diabética Drel e colaboradores (2006) mostraram que a inibição da AR é capaz de controlar o estresse oxidativo e nitrosativo no córtex renal de animais diabéticos e em cultura de células mesangiais humanas. Mais recentemente foi mostrado que a AR regula negativamente a expressão do micro RNA 220a-3p/141-3p em células mesangiais, tendo como consequências a indução de estresse oxidativo, fibrogênese e transição epitélio-mesenquimal. A inibição desse micro RNA *in vivo* levou à exacerbação da fibrose glomerular e cortical e aumento da excreção urinária de albumina. Por outro lado, a inibição da aldose redutase e a recuperação da atividade do micro RNA 220a-3p/141-3p mostraram-se promissores no sentido de controlar as alterações relacionadas à ND. Esses achados sugerem, portanto, que o principal efeito deletério do aumento da atividade da via do poliol no DM está relacionado à perda do equilíbrio redox (WEI et al., 2014).

A hiperglicemia é um fator que promove também a ativação da proteína quinase C (PKC) em células renais no DM. O excesso de glicose promove aumento dos níveis intracelulares de DAG, principal mediador endógeno dessa via de sinalização. Esse aumento ocorre pela síntese de novo de gliceraldeído-3-fosfato, um metabólito da via glicolítica. Adicionalmente, a PKC também pode ser ativada pela ligação de AGEs a seus receptores ou pelo aumento da atividade da via do poliol em virtude de essa via também contribuir para o aumento dos níveis de DAG (BROWNLEE, 2001; DERUBERTIS; CRAVEN, 1994; KEOGH; DUNLOP; LARKINS, 1997). Estudos em glomérulos isolados, em culturas de células endoteliais, mesangiais e em modelos experimentais evidenciaram a importância dessa via bioquímica na patogênese da ND. A ativação da PKC resulta na produção de endotelina, fatores de crescimento como o TGF- β e aumento do estresse oxidativo, processos sabidamente envolvidos na lesão renal típica do DM (MURPHY; MCGINTY; GODSON, 1998). A PKC também é capaz de ativar ERK, uma proteína quinase ativada por mitógenos, que induz a expressão pelas células mesangiais de proteínas de matriz extracelular, como colágeno I e

fibronectina (HANEDA et al., 1997). A inibição da via DAG-PKC-ERK protegeu contra a disfunção glomerular em ratos diabéticos, prevenindo a hiperfiltração glomerular, albuminúria e produção excessiva de proteínas da matriz extracelular (HANEDA; KOYA; KIKKAWA, 2001; KOYA et al., 2000).

O consumo excessivo de glicose pela via das hexosaminas também chama a atenção do ponto de vista de danos celulares que podem levar ao desenvolvimento de complicações do DM. Nessa via a frutose-6-fosfato, intermediário da via glicolítica, é desviada e convertida em glicosamina-6-fosfato pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase. A partir da glicosamina-6-fosfato é formada UDP-*N*-acetilglicosamina, que é utilizada em reações de glicosilação catalizadas pela *O*-*N*-acetilglicosamina transferase (DU et al., 2000; KOLM-LITTY et al., 1998). Embora não se conheça a relação exata entre ativação da via das hexosaminas e os danos observados nas complicações do DM, já se observou que a glicosilação em resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição como o Sp-1 está relacionada ao aumento da expressão do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e TGF- β (CHEN et al., 1998).

PAI-1 é um importante inibidor fibrinolítico que já foi encontrado em níveis elevados em indivíduos diabéticos e é positivamente correlacionado com risco de aterosclerose e de complicações vasculares do DM (JUHAN-VAGUE; ALESSI; VAGUE, 1991; POTTER VAN LOON et al., 1993). O TGF- β , por sua vez, é um fator de crescimento secretado como um complexo inativo que requer ativação para que a ligação com os seus receptores seja possível. Aspectos como mudanças de pH, radiação- γ e espécies reativas de oxigênio são capazes de ativar o TGF- β *in vitro*. Assim como ocorre na via da PKC, o TGF- β é ativado na via das hexosaminas, além de outras vias em resposta à hiperglicemia. Já foi descrito que a trombospondina-1 (TSP-1), um membro da família de glicoproteínas matricelulares, induzida por altas concentrações de glicose, desempenha um papel potencial na ativação do TGF- β *in vivo*. Tal ativação permite a ligação do TGF- β aos seus receptores específicos (TGF- β -R1 e TGF- β -R2) mediando a fosforilação de moléculas de sinalização e posterior transcrição de genes-alvos (DANIEL et al., 2007; HOHENSTEIN et al., 2008).

Sabidamente o TGF- β está envolvido no desenvolvimento de complicações do DM. Particularmente na ND, ele atua induzindo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), estimula a produção de colágeno tipo IV e fibronectina, levando ao espessamento da membrana

basal glomerular e glomeruloesclerose. O TGF- β também promove alterações estruturais em podócitos e perda dessas células por apoptose (GARUD; KULKARNI, 2014; SHAH; MACKAY; MCKAY, 2009).

Além de fatores de transcrição, a glicosilação mediada por intermediários da via das hexosaminas pode atuar como uma importante modificação pós-traducional em proteínas, sendo, portanto, capaz de modular a atividade das mesmas. Exemplo disso é a inibição da óxido nítrico sintase endotelial por *O*-glicosaminação da enzima no sítio de fosforilação pela Akt (serina 1177), que explica parcialmente o processo de aterosclerose acelerado no DM. Nenhum exemplo nesse sentido foi descrito em estudos de ND, mas isso ressalta que os principais mecanismos relacionados à via das hexosaminas que levam a complicações do DM envolvem modificações de fatores de transcrição e de proteínas citoplasmáticas. Um resumo dessas vias bioquímicas é apresentado na figura 1 (BROWNLEE, 2001; DU et al., 2001).

Figura 1 - Principais vias bioquímicas envolvidas no desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes. Adaptado de Brownlee (2001).

1.4.3 Glicação avançada

O excesso de glicose observado na vigência do DM, além de promover danos mediados pela atividade exacerbada das vias metabólicas clássicas, tem implicações negativas para a homeostase celular relacionadas ao dano direto da glicose ou de produtos do seu metabolismo a biomoléculas essenciais. Os produtos da reação não enzimática e covalente de açúcares ou seus derivados com macromoléculas são chamados de produtos avançados de glicação (AGEs). A primeira observação a esse respeito foi realizada em 1912 por Louis Camille Maillard na reação de escurecimento de alimentos envolvendo aminoácidos e carboidratos simples. Apenas 40 anos depois, a química básica envolvida na reação de Maillard foi descrita. Simultaneamente muitos cientistas se dedicavam à investigação da ocorrência dessa reação em sistemas biológicos (BROWNLIE; VLASSARA; CERAMI, 1984; TESSIER, 2010).

O passo inicial da reação de Maillard envolve a interação entre uma amina ligada à proteína ou aminoácido livre e um açúcar redutor, como a glicose, formando um intermediário imina, também chamado de base de Schiff. Posteriormente a imina lábil pode gerar compostos α -dicarbonil ou oxoaldeídos, ou ainda se rearranjar para formar produtos mais estáveis, chamados de produtos de Amadori. Por fim, esses produtos de Amadori sofrem rearranjos complexos, clivagem e reações covalentes resultando em adutos estáveis e ligações cruzadas com proteínas, considerados AGEs. Os principais compostos dicarbonil que levam à formação de AGEs são o glioxal, que resulta da auto-oxidação intracelular da glicose, a 3-desoxiglucosona, resultante da decomposição de produtos de Amadori e o metilglioxal, produto de fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato e da dihidroxiacetona fosfato (THORNALLEY, 1990; VISTOLI et al., 2013; WELLS-KNECHT et al., 1995).

O acúmulo de AGEs em processos como envelhecimento, diabetes e falência renal é bem caracterizado na literatura. Eles podem ser considerados glicotoxinas que desempenham um papel importante na fisiopatologia dessas doenças e são passíveis de serem utilizados como biomarcadores. O exemplo mais claro dessa utilização é a hemoglobina glicada (HbA1c), que é um produto de Amadori, descoberto em 1955 em adultos saudáveis e identificado em níveis elevados em hemácias de pacientes diabéticos em 1968. Na década de 1980 a HbA1c foi introduzida na prática clínica para monitorar o controle glicêmico em pacientes diabéticos e em 2009 passou a ser

recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como critério diagnóstico para DM. Embora existam algumas limitações quanto ao seu uso para o diagnóstico, como nos casos de hemoglobinopatias e variações étnicas, a HbA1c é amplamente utilizada no monitoramento glicêmico uma vez que permite avaliar o grau de exposição à glicose ao longo do tempo (KUNKEL; WALLENIUS, 1955; RAHBAR, 1968; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

N^ε-(carboximetil)lisina (CML) é um exemplo de AGE extensivamente estudado. Na verdade, este foi o primeiro AGE isolado e caracterizado a partir de proteínas glicadas *in vivo* (AHMED; THORPE; BAYNES, 1986). CML é formada a partir da reação de proteínas com glioxal, que pode resultar da oxidação tanto de açúcares quanto de lipídeos. Sendo assim, além de um AGE, CML também pode ser considerada um produto avançado de lipoxidação (ALE). Portanto, a detecção de CML em indivíduos diabéticos é comumente descrita como um indicador de estresse glicoxidativo (FU et al., 1996; TESSIER, 2010). Alguns *crosslinks* da reação de Maillard com estruturas aromáticas e propriedades fluorescentes também já foram descritos como de potencial interesse para monitorar indiretamente o acúmulo de AGEs em tecidos. Como exemplos têm-se *crosslinks* de lisina-arginina como pentosidina e glucosepano (BIEMEL et al., 2001; SELL et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais os AGEs exercem o seu efeito envolvem três aspectos principais. Devido ao próprio caráter da sua formação, os AGEs afetam a estrutura e função das proteínas, de modo que as consequências para a célula dependem do tipo de proteína envolvida e da sua taxa de renovação. Além disso, os componentes da matriz extracelular que são afetados pelos AGEs passam a interagir entre si, formando *crosslinks* de proteínas extracelulares, e interagem também com receptores para proteínas de matriz nas células. O terceiro mecanismo baseia-se na interação com receptores de produtos avançados de glicação (RAGE) em células endoteliais, mesangiais e macrófagos. Esses mecanismos são ilustrados na figura 2 (BROWNLEE, 2001; D'AGATI et al., 2009).

Figura 2 - Mecanismos envolvidos no dano causado por AGEs em células endoteliais, macrófagos e células mesangiais. Adaptado de Brownlee (2001).

RAGE é um receptor multiligante, que faz parte da superfamília de imunoglobulinas. A sua ativação por AGEs culmina na geração de estresse oxidativo, em parte mediada por ativação da NADPH oxidase, e também na ativação do fator de transcrição NF- κ B, que medeia a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (RAMASAMY et al., 2005; TAN; FORBES; COOPER, 2007). Já se propôs também que a interação AGE-RAGE promove apoptose de podócitos mediada pela MAPK p38, um dos principais membros da família das proteínas quinases ativadas por estresse (SAPK). A MAPK p38 está envolvida em uma série de funções biológicas, incluindo diferenciação, proliferação, inflamação, apoptose e fibrose (FANG et al., 2012; MA; LIU; NIKOLIC-PATERSON, 2009).

A utilização de inibidores de AGEs em alguns estudos experimentais permitiu reforçar o papel desses agentes como mediadores de alterações observadas em complicações crônicas do DM. A inibição de AGEs com aminoguanidina se mostrou capaz de prevenir o aumento do depósito de colágeno na aorta, em glomérulos isolados e em túbulos renais, além de atenuar o aumento de albuminúria e de expansão mesangial em ratos diabéticos (SOULIS-LIPAROTA et al., 1991; TURGUT; BOLTON, 2010). OPB-9195 também foi capaz de controlar os níveis circulantes de AGEs e a excreção urinária de albumina, bem como prevenir a progressão da glomeruloesclerose e o depósito de AGEs nos glomérulos de ratos diabéticos

(NAKAMURA et al., 1997). Um estudo clínico com pacientes portadores de DM tipo 1 mostrou que o uso de aminoguanidina foi capaz de controlar a proteinúria e um número reduzido de pacientes que utilizaram esse inibidor de AGEs desenvolveu retinopatia (BOLTON et al., 2004).

Embora muita atenção tenha sido dada ao estudo de AGEs oriundos de proteínas, sabe-se que o DNA também é alvo para o ataque de compostos dicarbonil reativos, o que abre espaço para investigar o papel de produtos avançados de glicação do DNA na fisiopatologia das complicações do DM, o seu uso como biomarcadores de glicosidação, bem como o possível direcionamento de intervenções terapêuticas nesse sentido. É importante ressaltar que a escolha de um AGE derivado de proteína para avaliar o estado de glicação é complicada quando se considera que a distribuição de proteínas não é homogênea entre todos os tecidos e os adutos formados têm estabilidade variável. Por outro lado, o uso de um aduto de glicação do DNA oferece a vantagem de refletir o nível de dano por metilglioxal ou glicose em um tecido-alvo, uma vez que todas as células nucleadas apresentam o mesmo conteúdo de DNA (SYNOLD et al., 2008).

O principal produto de glicação do DNA é a N^2 -carboxietil-2'-desoxiguanosina (CEdG), resultante da reação do metilglioxal ou da própria glicose com a desoxiguanosina. Embora tenha sido descrito pela primeira vez em 1969, muitos anos se passaram até que a ocorrência endógena desse aduto fosse observada *in vivo*. Níveis elevados de CEdG foram detectados em rim e aorta de pacientes diabéticos e urêmicos, por meio de método de imunoensaio. Em biópsias de rim, particularmente, CEdG foi detectado predominantemente no núcleo de células epiteliais, células mesangiais e células endoteliais dos glomérulos, além de células epiteliais parietais e células tubulares. Pacientes com ND apresentaram aumento significativo do número de células CEdG positivas nos glomérulos (LI et al., 2006; SHAPIRO et al., 1969). A contribuição dessa lesão para a instabilidade genética foi avaliada em fibroblastos humanos e observou-se que o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é o mecanismo primário de reparo de CEdG nesse tipo celular. Esse aduto é considerado mutagênico, principalmente por causar transversões AT $\rightarrow$ GC, mas ainda não se sabe o seu papel na fisiopatologia das complicações do DM, o que deve ser um importante objeto de estudo para a área nos próximos anos (SYNOLD et al., 2008; TAMAE et al., 2011; WENSCHHELL et al., 2010).

1.4.4 Estresse oxidativo

A utilização de oxigênio pelos organismos aeróbios oferece uma vantagem metabólica importante do ponto de vista de produção de energia para atender às demandas celulares. Em contrapartida, a produção de espécies reativas como consequência da redução incompleta do oxigênio pode perturbar a homeostase. Dentre as espécies reativas de interesse biológico estão as espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), e de nitrogênio (RNS), como óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Sabe-se que em determinadas circunstâncias esses agentes apresentam papéis fisiológicos importantes, como na defesa contra patógenos ou mediando vias de sinalização celular. Entretanto a sua produção exacerbada pode trazer efeitos deletérios principalmente por consequência do ataque a biomoléculas essenciais, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Nesse sentido, a célula dispõe de mecanismos para conter a formação de ROS e RNS, sejam eles enzimáticos ou não enzimáticos. Quando ocorre perda do equilíbrio, seja por aumento na formação de ROS e RNS ou pela redução da capacidade antioxidante, tem-se a ocorrência de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Evidências crescentes advindas de estudos experimentais e clínicos apontam o estresse oxidativo como um mediador chave das complicações vasculares do DM. O seu papel foi destacado em uma teoria proposta por Brownlee (2001), que sugere que o estresse oxidativo é um elemento comum que interliga todas as vias de dano induzido pela hiperglicemia. Segundo esse pesquisador, apesar de muitos trabalhos terem sido publicados e de peças importantes desse “quebra-cabeças” terem sido encontradas, conforme discutido anteriormente, dois aspectos sugeriam que algo maior ainda estava faltando. Além de não haver um elemento comum a todas as vias já descritas, os estudos clínicos com inibidores dessas vias em pacientes não eram satisfatórios (BROWNLEE, 2005).

De acordo com a teoria proposta por Brownlee, os mecanismos patogênicos descritos para o aumento da atividade da via do poliol, a ativação exacerbada das vias da PKC e das hexosaminas e a formação de AGEs refletem basicamente a superprodução de ânion radical superóxido pela cadeia de transporte de elétrons na

mitocôndria. Isso acontece porque a hiperglicemia promove aumento da atividade da via glicolítica, gerando mais piruvato. Consequentemente, tem-se maior entrada de piruvato no ciclo do ácido tricarboxílico e maior aporte de NADH e FADH₂ para a cadeia de transporte de elétrons. O aumento da diferença de potencial da membrana mitocondrial, por sua vez, atinge um limiar a partir do qual ocorre lentidão da cadeia de transporte de elétrons, favorecendo o vazamento de elétrons e formação de ânion radical superóxido (BROWNLEE, 2001; PICONI; QUAGLIARO; CERIELLO, 2003).

A alteração do potencial de membrana mitocondrial foi demonstrada em células endoteliais expostas a concentrações crescentes de glicose, que exibiram um aumento de potencial acima do limiar necessário para a produção de superóxido (DU et al., 2001). Já o mecanismo proposto para a produção de superóxido dependente da hiperglicemia foi demonstrado em um modelo com expressão aumentada de manganês-superóxido dismutase (MnSOD) ou da proteína desacopladora mitocondrial-1 (UCP-1). Nesse modelo a hiperglicemia isoladamente promoveu a formação de ROS, o que não ocorreu quando o potencial de membrana mitocondrial foi controlado pela superexpressão da UCP-1. Da mesma forma, não foi observado aumento na produção de ROS quando da superexpressão de MnSOD. Esses dados evidenciam que a cadeia de transporte de elétrons é uma fonte importante de ROS induzida pela hiperglicemia e que o radical superóxido é a principal espécie formada (BROWNLEE, 2005; NISHIKAWA et al., 2000; PICONI et al., 2003).

Conforme já discutido, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é inibida pelo aumento da razão citossólica de NADH/NAD⁺. Sabe-se também que a produção de superóxido induzida pela hiperglicemia é capaz de inibir essa enzima. No entanto, apenas concentrações muito elevadas de superóxido, incompatíveis com a quantidade formada em condição hiperglicêmica, são capazes de promover uma inibição direta, o que sugere que o bloqueio da atividade da GAPDH mediada por superóxido ocorre por um mecanismo indireto. Sob a catálise da SOD, o radical superóxido é dismutado para peróxido de hidrogênio, que é reduzido por cátions bivalentes na reação de Fenton, gerando radical hidroxila. Este, por sua vez, é capaz de provocar danos no DNA, o que leva à ativação de poli(ADP-ribose)polimerases (PARP), envolvidas no processo de reparo do DNA. Uma vez ativadas, as PARP adicionam polímeros de ADP ribose em diversas proteínas nucleares e também na GAPDH, o que inibe a sua atividade (DU et al., 2003).

Com a inibição da GAPDH, ocorre acúmulo de glicose e de intermediários da via glicolítica anteriores a esse passo, como gliceraldeído – que gera metilglioal e DAG, e frutose-6-fosfato. Esses intermediários são responsáveis pela exacerbação das demais vias bioquímicas já apresentadas. De fato, o aumento da expressão de UCP-1 e MnSOD preveniram completamente a ativação das vias do poliol, da PKC e das hexosaminas, bem como a formação intracelular de AGEs em células endoteliais, o que mostra o papel central do estresse oxidativo na ativação dessas vias (BROWNLEE, 2005; NISHIKAWA et al., 2000).

Outra linha de investigação sugere que o estresse oxidativo envolvido na patogênese das complicações do DM ocorre também porque pacientes diabéticos apresentam uma resposta anormal de genes antioxidantes à hiperglicemia, com uma expressão reduzida de enzimas antioxidantes (CERIELLO et al., 2000; HODGKINSON et al., 2003). Independente do mecanismo pelo qual ocorre o estresse oxidativo, existe uma preocupação quanto aos seus efeitos deletérios para a célula, uma vez que ROS e RNS podem lesar biomoléculas provocando em alguns casos alteração ou perda de função. Os danos em biomoléculas nesse contexto são importantes tanto por permitirem investigações mecanísticas quanto pelo seu potencial de serem utilizados como biomarcadores para monitorar a intensidade do prejuízo causado (GIUGLIANO; CERIELLO; PAOLISSO, 1996).

Em nosso grupo, têm sido estudados marcadores de dano oxidativo em lipídeos e em DNA. Nesse sentido, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) é o produto de oxidação do DNA mais estudado em diferentes situações nas quais o estresse oxidativo parece estar envolvido (BIANCHINI et al., 2001; CADET et al., 2008). Essa lesão pode ser gerada por oxidação monoelétrica da guanina ou ataque de radical hidroxila ou oxigênio singlete à guanina no DNA (CADET et al., 2008). Diferentes tipos celulares em humanos e modelos animais de diabetes têm apresentado aumento dos níveis de 8-oxodG, indicando que há a ocorrência de estresse oxidativo generalizado no DM. Essa lesão também é passível de ser detectada na urina de pacientes diabéticos ou de animais experimentais, podendo ser utilizada como biomarcador de estresse oxidativo (BROEDBAEK et al., 2011).

A abundância de ácidos graxos poliinsaturados na célula e a sua suscetibilidade à oxidação, os torna alvos importantes para os oxidantes. Como essa oxidação desencadeia uma cascata autocatalítica que gera numerosas substâncias genotóxicas, tais danos aos lipídeos têm grandes implicações para a integridade do DNA (LOUREIRO;

DI MASCIO; MEDEIROS, 2002). De fato, a peroxidação lipídica tem sido associada ao desenvolvimento de condições patológicas, sejam elas induzidas por exposição a agentes oxidantes ou não. Nesse processo são gerados aldeídos α,β -insaturados, variantes estruturais dos mesmos (tais como 4-hidroxicenais e epoxialdeídos) e malonaldeído (MDA), os quais são agentes alquilantes com capacidade de ligação covalente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas (MARNETT; PLASTARAS, 2001; OSAWA; KATO, 2005).

Além de danos em lipídeos e no DNA, o aumento das espécies reativas de oxigênio em estudos clínicos e experimentais de diabetes tem sido relacionado com vasoconstrição, crescimento e migração de células da musculatura lisa, disfunção endotelial, modificação de proteínas da matriz extracelular e aumento da reabsorção de sódio pelos rins (ELMARAKBY; SULLIVAN, 2012). Alterações da expressão e atividade de algumas moléculas alvos relacionadas ao controle do estresse oxidativo, como sirtuína1 (SIRT1) e proteína quinase ativada por AMP (AMPK), têm sido hipotetizadas como importantes para o desenvolvimento de complicações do DM mediado pelo estresse oxidativo. A sirtuína1 (SIRT1), uma desacetilase de histonas da classe III, é uma proteína multifuncional importante para a regulação da homeostase energética, ciclo celular, apoptose, resposta inflamatória e níveis de ROS. Já a AMPK é uma proteína quinase que atua na manutenção do balanço energético celular e reduz os níveis intracelulares de ROS. De fato, a importância dessas proteínas foi evidenciada em modelos *in vitro* e *in vivo* de retinopatia diabética (ZHENG et al., 2012).

Por fim, o estresse oxidativo pode atuar ainda como indutor da expressão de citocinas pró-inflamatórias, o que também influencia a ocorrência de complicações crônicas do DM. O exemplo mais claro desse aspecto é a ativação do fator de transcrição NF- κ B mediada por ROS, que funcionam como mensageiros nessa via de sinalização. Como resultado tem-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). A liberação dessas citocinas acontece também em virtude do aumento da migração de macrófagos observada no DM, que acaba sendo outro fator indutor da produção de ROS, de modo a alimentar o ciclo vicioso de inflamação e estresse oxidativo (ELMARAKBY; SULLIVAN, 2012; GUIJARRO; EGIDO, 2001; MASSY et al., 1999).

A expressão elevada de IL-1 associada a fatores quimiotáticos e moléculas de adesão aumenta a permeabilidade vascular e estimula a proliferação de células mesangiais e a síntese de matriz extracelular. Já a expressão renal de IL-6, além de também promover a proliferação mesangial, está relacionada com atrofia tubular em diversos modelos de nefropatia. Quanto ao TNF- α sabe-se que o seu papel está relacionado com a própria sinalização do NF- κ B mediando a transcrição de várias citocinas envolvidas na sobrevivência e proliferação celular, resposta inflamatória, adesão celular e fatores anti-apoptóticos. Pelo fato de ser citotóxico para células glomerulares, mesangiais e epiteliais e poder induzir dano renal, tem desempenhado um papel fisiopatológico em vários modelos experimentais de doença renal (ELMARAKBY; SULLIVAN, 2012).

1.4.5 Mecanismos Epigenéticos

O estudo de mecanismos epigenéticos como parte das bases moleculares do desenvolvimento de complicações do diabetes tem trazido contribuições importantes para a compreensão desses processos (COOPER; EL-OSTA, 2010; KATO; NATARAJAN, 2014; VILLENEUVE; REDDY; NATARAJAN, 2011). A epigenética compreende mecanismos moleculares estáveis, mas reversíveis, que controlam a expressão gênica sem que ocorra, no entanto, alterações na sequência de bases do DNA. Estes mecanismos incluem a metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas e micro RNAs (miRNAs) (MEISSNER, 2010; PORTELA; ESTELLER, 2010; WAKI; YAMAUCHI; KADOWAKI, 2012). Dentre os diferentes mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é o mais estudado. Trata-se basicamente da adição covalente de um grupamento metil na posição 5 da citosina, catalisada por DNA metil transferases. Essa modificação é a alteração mais abundante no genoma de eucariotos e tem como consequência a supressão da expressão gênica, modulando o acesso do maquinário transcricional à cromatina ou recrutando proteínas de ligação a grupos metil (BARRES; ZIERATH, 2011; BIRD, 2007).

Sabe-se que o padrão de metilação do DNA é alterado na vigência de doenças e no DM, especificamente, algumas evidências sustentam esta constatação. Já se mostrou, por exemplo, que o silenciamento do gene PPARGC1A em ilhotas pancreáticas por

consequência da metilação do DNA promoveu comprometimento da secreção de insulina (LING et al., 2008; OLSSON et al., 2011). Em um estudo envolvendo pacientes diabéticos em estágio final de doença renal e pacientes diabéticos sem nefropatia, Sapienza e colaboradores (2011) identificaram 187 genes com diferentes níveis de metilação entre os grupos, dentre os quais 39 estavam relacionados com desenvolvimento do rim ou nefropatia diabética. Trabalho semelhante com pacientes irlandeses, identificou 19 sítios CpG que demonstraram correlação com o tempo de desenvolvimento de nefropatia (BELL et al., 2010). Esses estudos chamam a atenção para a importância da metilação do DNA na gênese do DM propriamente dito e de suas complicações crônicas, ressaltando a necessidade de se conhecer melhor o papel deste mecanismo epigenético nessas condições a fim de direcionar este conhecimento para o benefício dos pacientes.

Além da metilação do DNA, os miRNAs têm emergido como importantes mediadores de alterações que levam às complicações crônicas do DM. Essa abordagem foi aplicada inicialmente em estudos de nefropatia diabética e até agora muitos miRNAs foram identificados em modelos de ND em células e animais (KATO et al., 2013). miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante (com cerca de 20 a 22 nucleotídeos) que atuam no silenciamento de genes. Esse papel de regulação pós-transcricional em mamíferos ocorre por consequência de imprecisão de complementaridade com o mRNA alvo, levando à sua degradação, ou por inibição da síntese proteica (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004).

Partindo do pressuposto de que a atuação dos miRNAs estaria alterada na vigência de doenças, o grupo da Dra. Natarajan foi pioneiro em investigar esta hipótese no âmbito da ND, reportando tanto alterações na expressão de diversos miRNAs como também revelando vias pelas quais circuitos de miRNAs promovem o desenvolvimento de doença renal por consequência do DM. Conforme já descrito anteriormente, o TGF- β é um agente conhecidamente envolvido na gênese da ND, no entanto não se conheciam os mecanismos pelos quais esse fator de crescimento desempenhava o seu papel pró-fibrótico. Um trabalho importante do grupo da Dra. Natarajan demonstrou que o TGF- β participa da regulação de colágeno através do miR-192. Esse miRNA realiza ligações cruzadas entre repressores E-box (δ EF1 e SIP1) presentes na região promotora do gene do colágeno. Como resultado tem-se aumento da expressão de colágeno que promove fibrose e consequente prejuízo à função renal. A importância dessa via foi demonstrada

tanto em cultura de células mesangiais quanto em modelos de diabetes tipo 1 e tipo 2 (KATO et al., 2007).

O mesmo grupo já mostrou também que o miR-192 é capaz de promover a expressão de outros miRNAs, como miR-216a/217 e miR-200b/c em células mesangiais, também levando ao aumento da expressão de colágeno. Além disso, foi observado que miR-216a e miR-217 têm como alvo PTEN, que é um inibidor da via de ativação de Akt. Sendo assim, a indução desses dois miRNAs, por consequência da ação do TGF- β , culmina na ativação de Akt, levando à sobrevivência de células mesangiais glomerulares e hipertrofia. Trata-se da revelação de mais uma via importante para a ND, já que os mecanismos de ativação da Akt pelo TGF- β ainda não haviam sido completamente elucidados (KATO et al., 2009). Outra publicação recente reforçou a relevância do miR-192 na ND ao correlacionar níveis aumentados de TGF- β 1, p53 e miR-192 no córtex renal de camundongos diabéticos com aumento de expansão glomerular e fibrose. Associada a isso está a importante constatação de que o silenciamento gênico do miR-192 protegeu os animais das alterações características da ND (DESHPANDE et al., 2013).

Além destas vias aqui discutidas, outras abordagens têm sido publicadas no sentido de buscar compreender o papel dos miRNAs na ND, o que tem resultado na identificação de outros miRNAs possivelmente relevantes nesse contexto. De maneira particular, tem se chamado a atenção para a necessidade de investigar a relação entre estresse oxidativo e miRNAs na ND. Acredita-se que o conhecimento de como espécies reativas de oxigênio podem regular a expressão de miRNAs e vice versa, bem como a compreensão do envolvimento de sinalização redox e fatores de transcrição nesse processo contribuirão com o desenvolvimento de melhores terapias para ND (ALVAREZ; DISTEFANO, 2013; KATO et al., 2013).

1.5 Memória metabólica

Apesar de o conhecimento de todas essas vias, mecanismos e mediadores ser importante para a compreensão da fisiopatologia das complicações do DM, o que se observa é que as estratégias terapêuticas adotadas ainda não são completamente efetivas e que o número de pessoas que desenvolve essas complicações, principalmente

nefropatia diabética, permanece significativo e preocupante. Alguns estudos têm apontado a existência de um fenômeno conhecido como memória metabólica ou memória hiperglicêmica para explicar o fato de que muitos pacientes diabéticos, mesmo estando sob um controle glicêmico adequado após um período anterior de descontrole glicêmico, continuam desenvolvendo as complicações crônicas da doença. Isso chama a atenção para a necessidade de se buscar conhecer mecanismos moleculares adicionais e formas de revertê-los (CERIELLO; IHNAT; THORPE, 2009; KATO; NATARAJAN, 2014).

A primeira observação a esse respeito aconteceu em um estudo de retinopatia em cães diabéticos. Nesse estudo os animais foram mantidos sob pobre controle glicêmico ou bom controle glicêmico durante cinco anos e um terceiro grupo mantido sob pobre controle glicêmico por 2,5 anos seguido de controle glicêmico adequado nos seguintes 2,5 anos. Aneurismas nos capilares da retina e outras lesões se desenvolveram após 5 anos na ausência de um controle glicêmico adequado, mas não no grupo cuja glicemia foi controlada. Já no terceiro grupo, não se observaram alterações histológicas nos primeiros 2,5 anos de hiperglicemia e, surpreendentemente, após os 2,5 de controle glicêmico os animais desenvolveram retinopatia (ENGERMAN; KERN, 1987).

Poucos anos após esse relato, outro estudo importante mostrou aumento persistente da expressão do gene da fibronectina em córtex renal e coração de ratos diabéticos cuja glicemia já havia sido controlada. Em cultura de células endoteliais humanas, o aumento da expressão de fibronectina e colágeno IV provocado pela exposição a alta concentração de glicose permaneceu detectável após múltiplas divisões celulares na ausência de alta concentração de glicose. Esses dados mostraram os primeiros indícios mecanísticos de que a hiperglicemia promove alterações que não são prontamente reversíveis, envolvendo possivelmente alterações na expressão gênica capazes de se perpetuar (ROY et al., 1990). Hammes e colaboradores (1993) verificaram também que o transplante de ilhotas de Langerhans após 6 semanas, mas não após 12 semanas de diabetes, era capaz de prevenir o desenvolvimento de retinopatia em ratos, sugerindo mais uma vez que a hiperglicemia promove a ocorrência de alterações precoces irreversíveis antes do aparecimento das complicações.

O fenômeno da memória metabólica ganhou mais importância clínica com a publicação de um grande estudo epidemiológico envolvendo pacientes com DM tipo 1, o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) que teve seguimento com o *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC). No estudo DCCT,

os pacientes eram mantidos sob regime de tratamento padrão ou intensivo para obter o controle glicêmico. Uma vez que a incidência de complicações microvasculares foi significativamente reduzida nos pacientes que estavam sob controle glicêmico intensivo, o DCCT foi encerrado precocemente, após um período de 6,5 anos, e todos os pacientes passaram a manter o regime de tratamento para controle intensivo da glicemia. Posteriormente no EDIC, que foi realizado com os mesmos pacientes, se observou que os indivíduos que haviam iniciado com o regime padrão no DCCT ainda apresentaram uma alta incidência de complicações microvasculares, como retinopatia e nefropatia, em relação aos que estavam sob intenso controle glicêmico desde o início, apesar de os níveis de HbA1c entre os grupos serem os mesmos (DCCT, 1993; EDIC, 2002; EDIC, 2003). O monitoramento dos pacientes após 12 anos do EDIC mostrou que ainda havia uma menor incidência de retinopatia, nefropatia e doença cardiovascular entre os indivíduos que estavam sob controle glicêmico intensivo desde o início do DCCT, mesmo com níveis de HbA1c muito próximos entre os dois grupos (DCCT/EDIC, 2009).

Uma observação semelhante ocorreu em um estudo clínico e posterior seguimento de pacientes com DM tipo 2. Assim como no DCCT-EDIC, pacientes mantidos no regime de tratamento padrão durante o estudo apresentaram maior incidência de complicações microvasculares e cardiovasculares quando comparados aos que mantiveram controle glicêmico intenso desde o início do estudo e ao longo do seguimento, reforçando que a memória hiperglicêmica independe da etiologia da doença (HOLMAN et al., 2008; UKPDS, 1998).

A publicação desses estudos chamou a atenção para a necessidade de se investigar os mecanismos envolvidos nessa memória metabólica e que outros fatores, além da glicemia, podem explicar a variação no risco de desenvolvimento de complicações do DM, uma vez que a exposição total à glicemia, considerando nível de HbA1c e tempo de diagnóstico do diabetes explicam apenas cerca de 11% do risco observado no DCCT-EDIC (LACHIN et al., 2008).

Ao se considerar os mecanismos fisiopatológicos das complicações do DM apresentados até aqui, tendo a formação de ROS como elemento central, e o conceito de memória metabólica propriamente dito, pode-se chegar a uma contradição aparente entre esses dois aspectos: o tempo. Enquanto a meia vida de uma espécie reativa de oxigênio pode durar em torno de segundos dependendo da espécie, a memória metabólica é um fenômeno que envolve anos. Entretanto, uma possível explicação para

essa discrepância reside na capacidade de ROS provocarem danos em biomoléculas. O mesmo é válido para a glicação avançada de biomoléculas. Uma vez modificadas, as biomoléculas podem desempenhar funções celulares alteradas ao longo de anos. De fato a ocorrência de estresse oxidativo e glicação avançada foi documentada em vários estudos revisados por Ceriello e colaboradores (2009) empregando modelos *in vivo* e *in vitro* para mimetizar a memória hiperglicêmica. Apesar disso, os mecanismos que explicam a persistência desses danos mesmo após a normalização da glicemia permanecem incertos. Um resumo de possíveis mecanismos operantes na memória metabólica revisados por Ceriello e colaboradores é apresentado na figura 3 (CERIELLO; IHNAT; THORPE, 2009; KATO; NATARAJAN, 2014).

Considerando a relevância do estresse redox e de alterações metabólicas e epigenéticas para o desenvolvimento da ND, e o papel da memória metabólica nesse cenário, faz-se necessário entender se estes mecanismos estão envolvidos na memória metabólica. Dessa forma, espera-se fornecer subsídio para o desenvolvimento de alternativas mais efetivas para prevenção e tratamento da doença renal diabética.

Figura 3. Mecanismos operantes na memória metabólica, de acordo com estudos revisados por Ceriello e colaboradores (2009). A produção de superóxido a nível mitocondrial como consequência da hiperglicemia é uma possível causa da memória metabólica do estresse hiperglicêmico após a normalização da glicemia. A superprodução de ROS é um evento chave na ativação de outras vias envolvidas no desenvolvimento de complicações do diabetes, como a via do poliol, formação aumentada de AGEs, ativação da PKC, e fluxo aumentado da via das hexosaminas. A glicação de proteínas mitocondriais favorece a superprodução de superóxido, uma condição que não depende dos níveis glicêmicos. A ligação de AGEs ao RAGE promove a geração intracelular de ROS que, por sua vez, promovem a expressão de RAGE. O mtDNA pode influenciar a expressão gênica e ao mesmo tempo contribuir para a geração de radicais livres em nível mitocondrial. Estas condições se auto sustentam, levando à geração de estresse oxidativo persistente, independente dos níveis glicêmicos atuais, o que pode contribuir com a memória metabólica. Adaptada de Ceriello e colaboradores (2009).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar marcadores metabólicos, moleculares e epigenéticos no rim de animais diabéticos tratados, após um período prévio de hiperglicemia, que possam contribuir para o entendimento da memória metabólica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar marcadores de estresse redox, como forma de investigar o seu papel na memória hiperglicêmica;
- Analisar a modulação de uma via fibrogênica importante para a nefropatia diabética após o controle glicêmico precoce e tardio;
- Verificar se metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico participam da memória hiperglicêmica no rim diabético;
- Avaliar a dinâmica de marcas epigenéticas em DNA mitocondrial nas condições de diabetes e controle glicêmico precoce e tardio.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Insumos

Todos os reagentes e insumos utilizados para a condução dos experimentos realizados neste trabalho foram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente. A ração padrão fornecida aos animais de experimentação foi proveniente da Nuvilab (Curitiba, Brasil). Isoflurano utilizado para anestesia inalatória foi adquirido do Laboratório Cristália (Itapira, Brasil). Insulina NPH (Humulin[®] N) e insulina glargina (Lantus[®]) foram obtidas dos laboratórios Lilly (Indianápolis, EUA) e Sanofi (Paris, França), respectivamente. Cloridrato de metformina foi fornecido pela Alcon Biosciences (Mumbai, Índia). Cristais de sulfato potássico alumínico utilizados como hemostáticos foram adquiridos do Laboratório Tayuyna (Nova Odessa, Brasil). Os anestésicos cetamina e xilazina foram adquiridos dos laboratórios Ceva (Paulínia, Brasil) e Syntec (Hortolândia, Brasil), respectivamente. Os kits reagentes para quantificação de proteínas totais e de hemoglobina foram provenientes da LabTest (Lagoa Santa, Brasil). O kit de ELISA para quantificação de albumina (Nephtr[®]) foi adquirido da Exocell (Filadélfia, EUA). Os heptapeptídeos glicado e não glicado, utilizados para validação do método e quantificação de hemoglobina glicada, foram sintetizados pela Merck (Darmstadt, Alemanha). A solução de lise e solução de precipitação de proteínas empregadas na extração de DNA, bem como o kit para extração de RNA foram adquiridos da Qiagen (Hilden, Alemanha). O coquetel inibidor de protease e fosfatase, o padrão de peso molecular de proteínas e o SYBR[®] Green foram provenientes da Thermo Scientific (Waltham, EUA). O kit para síntese de cDNA e o TaqMan[®] *Universal Master Mix II* foi obtido da Applied Biosystems (Foster City, EUA). O reagente de Bradford, tampão Laemmli, as soluções para preparo de géis de poliacrilamida (TGX[™] FastCast[™]) e as membranas de PVDF 0,2 µm (Transfer Pack TransBlot[®] Turbo[™]) foram adquiridos da BioRad (Hercules, EUA). O kit para quantificação de KIM-1 e o anticorpo primário anti-TGFβ foram adquiridos da Abcam (Cambridge, Reino Unido). O kit para quantificação de pAMPK (PathScan[®]) e os anticorpos primários para AMPKα, pAMPKα (Thr172) e SOD2 foram obtidos da Cell Signaling (Danvers, EUA). O kit para medida da atividade de Sirtuína-1 (Fluor de Lys[®])

foi fornecido pela Enzo Life Sciences (Farmingdale, EUA). O substrato quimioluminescente (Luminata™ Forte), bem como metanol e acetonitrila grau HPLC foram provenientes da Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha). Todos os demais reagentes e insumos foram obtidos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). A água utilizada no preparo das soluções foi deionizada em um sistema modelo Direct-Q® 5UV (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Equipamentos básicos

Os seguintes equipamentos básicos foram utilizados para a realização dos procedimentos experimentais: Microcentrífuga modelo Mikro 120 (Hettich, Tuttlingen, Alemanha), centrífugas modelos 5702R e 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), balança semi-analítica modelo FA210N (Bioprecisa, Curitiba, Brasil), balança analítica modelo AT261-DeltaRange (Mettler Toledo, Columbus, EUA), incubadora com controle de temperatura e agitação modelo Vortemp56 (Labnet, Edison, EUA), agitador de tubos (modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, Brasil), agitador magnético modelo 78HW-1 (Biomixer, Ribeirão Preto, Brasil), potenciômetro digital modelo W3B (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil), banho maria modelo 245 (Cientec, Belo Horizonte, Brasil). As etapas de concentração à vácuo foram realizadas em um concentrador modular modelo miVac (Genevac, Ipswich, Reino Unido). O preparo de homogenatos foi realizado em um homogeneizador do tipo Ultra-turrax® (IKA, Karnataka, Índia). A quantificação de proteínas totais em urina foi realizada em um Analisador Bioquímico Labmax® 240 (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). O ensaio de PCR em tempo real pelo método Taqman® foi realizado no equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, New Jersey, EUA).

3.2.2 Espectrofotômetros e Transiluminador

Os espectrofotômetros utilizados foram modelo Libra S12 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) para leituras em cubeta de quartzo, e modelo Sinergy H1 (BioTek, Winooski, EUA) para leituras em microplacas. Este último foi utilizado também para experimentos de determinação de fluorescência. A determinação das concentrações de DNA e RNA foi realizada em um espectrofotômetro modelo NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) disponível no Laboratório da Professora Silvy Stuchi Maria-Engler, FCF/USP. Para detecção de quimioluminescência nos experimentos de *western blot*, foi utilizado um transiluminador modelo Amersham Imager 600 (GE, Fairfield, EUA). Tanto o leitor de placas quanto o transiluminador foram disponibilizados pelo Laboratório da Professora Tania Marcourakis, FCF/USP.

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.2.3.1 HPLC-DAD

As análises e purificações realizadas com UV/VIS foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21. (Shimadzu, Kyoto, Japão). As condições cromatográficas utilizadas são descritas ao longo do trabalho.

3.2.3.2 HPLC-ESI/MSⁿ

Esse sistema analítico é constituído por HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AD, uma válvula SPD-M20A, um detector de arranjo de fotodiodos DGU-20A/3R, um auto injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AC) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. O HPLC é acoplado a um espectrômetro de massas modelo amaZon Speed com fonte ESI e duplo funil de íons, analisador tipo Ion Trap (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), disponível no laboratório da Professora Marisa H. G. Medeiros do IQUSP.

3.2.3.3 HPLC-ESI-MS/MS

O sistema analítico é constituído por HPLC Agilent série 1200 (Wilmington, EUA), equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B), uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de absorvância de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um injetor automático (G1367C Agilent 1200). O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap modelo 4000 QTRAP da empresa Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments (Foster City, EUA). Os dados foram processados utilizando o software Analyst 1.4 (Applied Biosystems, EUA).

3.2.4 Sistemas de eletroforese e transferência de proteínas

Para separação eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida, foi utilizado um sistema de eletroforese vertical composto de cuba modelo Mini-PROTEAN Tetra System e fonte PowerPac™ Basic (BioRad, Hercules, EUA). A transferência das

proteínas por via semi-seca foi realizada em um equipamento modelo Trans-Blot® Turbo™ (BioRad, Hercules, EUA).

3.3 Modelo experimental

3.3.1 Animais

Foram utilizados neste estudo ratos Wistar Hannover, machos, com 8 semanas de idade, pesando entre 250 e 350g, adquiridos e mantidos no Biotério de Produção e Experimentação Animal do Instituto de Química/Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram alocados aos pares em caixas de polipropileno (49cm x 34cm x 16cm) com grade aramada em aço inoxidável, contendo maravalha proveniente de madeira Pínus, dispostas em estantes abertas, com acesso a água e ração *ad libitum*, em sala com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$; umidade $55\pm 10\%$; 15 a 20 trocas de ar por hora; iluminação com lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro, controlado por um temporizador digital. Antes da indução de diabetes eram realizadas duas trocas de caixa por semana e após a indução de diabetes as trocas passaram a ser diárias, em virtude do expressivo aumento do volume urinário. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/363) e considerado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

3.3.2 Indução de diabetes

O procedimento de indução de diabetes iniciou-se após duas semanas de aclimação dos animais na sala experimental. Para tanto, após um período de jejum de 12 horas, registrou-se o peso e a glicemia dos animais e os mesmos foram anestesiados com isoflurano 4% utilizando-se um equipamento de anestesia inalatória (Morya®).

Uma solução recém-preparada de estreptozotocina em solução salina (50 mg/mL) foi administrada por via intravenosa, através de punção da veia peniana, em volume correspondente à dose de 40 mg de STZ por quilograma de peso corpóreo. Para evitar problemas relacionados à hipoglicemia grave, manteve-se o cuidado de garantir que os animais se alimentassem após 30 min da administração da droga. Os animais dos grupos controles não diabéticos foram submetidos aos mesmos procedimentos, tendo recebido apenas o veículo por via intravenosa.

A condição de diabetes foi confirmada após acompanhamento glicêmico em 24, 48 e 72 horas da administração de STZ. A glicemia foi quantificada no sangue coletado da veia caudal, utilizando-se o glicosímetro Breeze™ 2 (Bayer HealthCare, Mishawaka, EUA) sendo que os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250mg/dL nas três medições foram considerados diabéticos e incluídos no estudo.

3.3.3 Delineamento experimental

A primeira etapa experimental deste estudo foi delineada com o propósito de avaliar se um período curto de hiperglicemia seria capaz de promover alterações persistentes após o controle glicêmico. Para tanto, os animais foram randomicamente distribuídos em 4 grupos de 6 animais. O período total de estudo foi de 8 semanas, sendo que os grupos experimentais compreenderam animais não diabéticos ou diabéticos por 8 semanas e diabéticos por 4 semanas tratados nas 4 semanas seguintes. O tratamento foi realizado com Insulina (6UI/dia) ou Insulina (3UI/dia) e Metformina (100 mg/kg/dia). Utilizou-se Insulina NPH 100U/mL administrada por via subcutânea duas vezes ao dia sempre no mesmo horário, sendo 1/3 da dose pela manhã e 2/3 no final da tarde. Metformina foi solubilizada em água e administrada diariamente por gavagem. Os animais dos grupos não tratados receberam apenas o veículo pela mesma via. Esta etapa experimental será referida a partir de então como estudo de curta duração.

A segunda etapa experimental deste estudo foi delineada com o propósito de avaliar o perfil dos marcadores de interesse após um período mais longo de hiperglicemia e como os tratamentos com insulina e metformina modulariam tais marcadores. Para tanto, os animais foram randomicamente distribuídos em 6 grupos de

10 animais. O período total de estudo foi de 24 semanas, sendo que os grupos experimentais compreenderam animais não diabéticos ou diabéticos por 12 semanas, de modo a se obter informações do tecido renal no período imediatamente anterior ao início dos tratamentos (ND12 e D12, respectivamente); animais não diabéticos ou diabéticos por 24 semanas, como controles do período total de estudo (ND24 e D24, respectivamente); animais diabéticos por 12 semanas e tratados nas 12 semanas seguintes com Insulina isoladamente ou associada à metformina (100 mg/kg/dia) (D12INS e D12MET, respectivamente). O tratamento com insulina consistiu em uma combinação de 2UI de insulina NPH 100U/mL administrada pela manhã e 2 ou 3UI de insulina glargina 100U/mL administrada ao final da tarde, ambas por via subcutânea. Essa associação de dois tipos de insulina objetivou garantir um melhor controle glicêmico ao longo das 24 horas. A escolha da dose de insulina a ser aplicada foi realizada com base nas medições semanais da glicemia, de modo a garantir o controle glicêmico adequado. Os grupos de animais não tratados foram submetidos a procedimento semelhante de injeção subcutânea sem que, entretanto, nenhum líquido tenha sido inoculado. Metformina foi dissolvida diariamente na água de consumo em concentrações adequadas para manter as doses escolhidas, de acordo com o volume de água ingerido pelos animais.

Independentemente dos grupos experimentais, todos os animais diabéticos durante o período em que não havia tratamento (grupos D12INS e D12MET até a 12^a semana e grupos D12 e D24 durante todo o período), receberam diariamente uma dose de 1 a 3 UI de insulina NPH ao final da tarde, com o propósito de manter a glicemia média inferior a 500 mg/dL. Esta medida objetivou evitar que os animais desenvolvessem hiperglicemia grave, que poderia levar a complicações agudas e inclusive impossibilitar a sobrevivência dos mesmos ao longo das 24 semanas de estudo. Esta etapa experimental será referida a partir de então como estudo de longa duração. Um esquema dos grupos experimentais nos estudos de curta e longa duração é demonstrado na figura 4.

Figura 4 – Delineamento experimental dos estudos de curta e longa duração.

3.4 Monitoramento do diabetes e da função renal

Para acompanhamento dos níveis glicêmicos dos animais ao longo do período de estudo, a glicemia foi aferida semanalmente em horário fixo no sangue obtido da veia caudal, utilizando-se o glicosímetro Breeze™ 2. O peso dos animais foi registrado na mesma periodicidade. Nos animais do estudo de curta duração a função renal foi avaliada no período pré-tratamento (4 semanas) e pós-tratamento (ao final de 8 semanas). Nos animais do estudo de longa duração, a função renal foi avaliada em amostras coletadas após 6, 8, 12, 18 e 24 semanas de estudo.

No dia anterior a cada coleta de sangue, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para coleta da urina de 24 horas, sendo que durante as últimas 8 horas os mesmos permaneceram em jejum, com acesso apenas à água *ad libitum*. Nos períodos anteriores à eutanásia, cerca de 500µL de sangue total foram coletados em micro tubos com heparina a partir de uma incisão de aproximadamente 2 mm na extremidade da cauda do animal feita com tesoura cirúrgica de aço inoxidável após aquecimento da cauda em lâmpada de infravermelho por 10 min, para favorecer a dilatação do vaso.

Após a coleta, o sangramento foi interrompido por compressão com gaze contendo cristais de sulfato potássico alumínico. Ao final de cada estudo, cerca de 6 mL de sangue total foram coletados em tubos heparinizados a partir de punção da aorta abdominal com capilar de vidro imediatamente antes da eutanásia do animal. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min para obtenção da fração de eritrócitos a ser empregada na quantificação de hemoglobina glicada.

A quantificação de proteínas totais na urina foi realizada por método semiautomatizado, com kit reagente e calibrador procedente do mesmo fabricante do equipamento. Antes da análise, as amostras de urina foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 min e diluídas 25 vezes. A concentração de proteínas totais foi calculada de acordo com as instruções contidas na bula do kit. Para determinação de albumina e KIM-1 na urina, foram utilizados kits de ELISA e procederam-se os ensaios conforme instruções dos fabricantes.

3.5 Coleta de rins e eutanásia

Após o período de 8, 12 ou 24 semanas, conforme delineamento experimental, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilazina nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. A artéria renal direita, veia renal direita e ureter direito foram presos com pinça hemostática para permitir a remoção do rim direito sem perda excessiva de sangue posteriormente. Uma vez removido, o rim direito foi cuidadosamente lavado em solução salina, pesado e seccionado transversalmente. Da porção inferior resultante, obteve-se uma fatia coronal de 2 a 3 mm que foi mantida em glutaraldeído (solução 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4) por 2 horas e transferida para solução salina para posterior análise por microscopia eletrônica. O restante da porção inferior foi acondicionado a -80°C para extração de DNA. Na porção superior realizou-se um corte longitudinal para obtenção de duas frações, para extrações de RNA e proteínas. Ambas também foram armazenadas a -80°C.

A seguir, uma pequena incisão foi feita na aorta abdominal para coleta de sangue com auxílio de um capilar de vidro heparinizado. Através da mesma incisão, procedeu-se a perfusão retrógrada *in situ* do rim esquerdo com solução Dubosq-Brazil modificada (solução saturada de ácido pícrico 32%, formaldeído 25,6%, ácido acético glacial 6% e

etanol 36,4%), após breve perfusão com solução salina 0,9%. Para evitar danos artefatuais no processo de perfusão, utilizou-se um sistema empregando ar comprimido medicinal cuja pressão foi mantida em cerca de 120 mmHg durante todo o procedimento. Ao término da perfusão, a eutanásia foi realizada por incisão do diafragma. A perfusão renal retrógrada foi realizada para a coleta do rim esquerdo de modo adequado para ser utilizado em eventuais análises histológicas posteriores. Uma representação esquemática do sistema de perfusão é demonstrada na Figura 5. O treinamento para realização do procedimento ocorreu com a colaboração do Prof. Roberto Zatz da FM/USP.

Figura 5 - Representação esquemática do sistema de perfusão. Ar comprimido medicinal foi utilizado para bombear solução salina ou solução Dubosq-Brazil modificada sob pressão controlada. Um sistema de válvulas permitiu selecionar a solução de interesse. A, Rim perfundido *in situ* com solução salina. B, Rim perfundido *in situ* com solução Dubosq-Brazil modificada.

3.6 Quantificação de hemoglobina glicada

3.6.1 Princípio do método

Neste trabalho propôs-se o desenvolvimento e validação de um novo método analítico para quantificação de hemoglobina glicada. O método utilizado como base foi descrito pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e tem como fundamento a utilização da endoproteinase Glu-C para clivar a hemoglobina e liberar o hexapeptídeo da cadeia β para posterior quantificação dos fragmentos glicosados e não glicosados. O desenvolvimento de novos métodos por parte do IFCC partiu de uma necessidade evidenciada em laboratórios clínicos de diversos países de se harmonizar mundialmente a quantificação de HbA1c e padronizar os seus valores de referência em humanos com base em métodos confiáveis e reprodutíveis, uma vez que com os métodos até então empregados se observava uma discrepância significativa de valores (JEPPSSON et al., 2002).

A endoproteinase Glu-C é uma serina endoprotease, que hidrolisa ligações peptídicas no sítio carboxil de resíduos glutamyl e aspartil. Partindo desse pressuposto, considera-se que quando em contato com a cadeia β da hemoglobina, a enzima libera diversos peptídeos de tamanhos variados, dentre eles o hexapeptídeo terminal (V-H-L-T-P-E) utilizado para quantificação, já que a valina inicial nesse peptídeo é um alvo principal para a reação de glicação da hemoglobina (JEPPSSON et al., 2002). Como há uma diferença na sequência de aminoácidos da cadeia β da hemoglobina do rato em relação ao humano, o produto de interesse após a digestão com a endoproteinase Glu-C neste caso seria um heptapeptídeo (V-H-L-T-D-A-E). Utilizando-se então heptapeptídeos glicosado e não glicosado sintéticos, um método empregando HPLC-ESI/MSn *Ion Trap* foi desenvolvido e validado, conforme procedimentos descritos a seguir. Um resumo do método proposto está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema do método proposto para quantificação de hemoglobina glicada, baseada na razão entre heptapeptídeo glicado e não glicado, liberados a partir da clivagem enzimática pela endoproteínase Glu-C.

3.6.2 Preparo da amostra

Alíquotas de 100 μ L de hemácias foram lavadas com 1 mL de solução salina e após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o mesmo procedimento. Ao pellet de células formado, adicionou-se novamente 1 mL de solução salina, homogeneizando os tubos levemente por inversão, sem desprender as células, e a seguir os mesmos foram incubados em banho-maria a 37°C por 4 horas, com o propósito de remover a pré-HbA_{1c} (base de Schiff). Finalizado o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e preparou-se o hemolisado com a adição de 1 mL de água deionizada e posterior homogeneização.

3.6.3 Quantificação de hemoglobina total

Hemoglobina total foi quantificada utilizando-se kit comercial. Uma alíquota de 10 µL do hemolisado foi adicionada em 2,5 mL de reagente de cor. Os tubos foram agitados em vortex e após 5 min determinaram-se as absorbâncias a 540 nm em leitor de placa. O mesmo procedimento foi realizado com 10 µL de uma solução padrão de hemoglobina. O cálculo da concentração de hemoglobina total foi realizado utilizando-se as absorbâncias de cada amostra e um fator de correção, com base nas instruções do fabricante.

3.6.4 Clivagem enzimática da hemoglobina

A uma alíquota do hemolisado, correspondendo a 50 µg de hemoglobina total, foram adicionados 2,5 µL de uma solução de endoproteinase Glu-C (200 µg/mL) e completou-se o volume para 100 µL com tampão de digestão (acetato de amônio, pH 4,3). As amostras foram incubadas a 37°C, 70 rpm, por 18 horas. Uma vez transcorrido o período de incubação, a digestão foi interrompida pelo congelamento das amostras a -20°C.

3.6.5 Análise por HPLC-ESI/MSn *Ion Trap*

Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 12.200 rpm por 2 min e alíquotas de 15 µL foram injetadas no sistema de HPLC-ESI/MSn descrito em 3.2.3.2. Para a eluição, empregou-se coluna Luna C18(2) (150 x 2.0 mm i.d., 3.0 µm, 100A Phenomenex) e um gradiente de ácido trifluoroacético 0,025% em água (bomba A) e ácido trifluoroacético 0,023% em acetonitrila (bomba B), conforme demonstrado a seguir (Tabela 1). O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e temperatura de 35°C. As análises foram realizadas em modo positivo e considerou-se que durante a ionização as moléculas de interesse são duplamente protonadas. Portanto, as massas observadas corresponderiam à massa da molécula adicionada a 2 prótons e dividida por 2 (m/z).

Sendo assim, os íons com $m/z = 392$ e $m/z = 473,2$, correspondendo ao heptapeptídeo não glicado e glicado, respectivamente, foram monitorados para quantificação.

Tabela 1: Condição cromatográfica para quantificação do heptapeptídeo glicado e não glicado.

TEMPO (min)	Fluxo (μL)	A (%)	B (%)
0	200	93	7
3	200	93	7
19	200	80	20
21	200	0	100
25	200	0	100
27	200	93	7
37	STOP		

3.6.6 Validação do Método

Para validação do método analítico, quantidades crescentes do heptapeptídeo glicado (1,1 ng, 2,5 ng e 4,6 ng) foram adicionadas a amostras de hemolisado contendo 50 μg de hemoglobina total e submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente. Para cálculo da precisão e exatidão, as amostras foram processadas em quadruplicata. Foram realizadas injeções em dois dias distintos para cálculo do coeficiente de variação inter-dia. A linearidade foi determinada a partir do preparo de curvas de calibração na faixa de 0,0015 a 0,03 μg de heptapeptídeo glicado no volume de injeção e de 0,03 a 0,3 μg de heptapeptídeo não glicado no volume de injeção. Os dados de validação do método são apresentados no Anexo A.

3.7 Quantificação de malonaldeído

Alíquotas de 100 μL de plasma ou homogenato de rim (50 mg de tecido, homogeneizado em 500 μL de PBS e 72 μL de butil-hidroxitolueno 0,2%, v/v) foram hidrolisadas para liberação do MDA ligado a proteínas através da adição de 10 μL de NaOH 4 M com subsequente incubação a 60 °C por 30 min sob agitação de 100 rpm.

Ao término da incubação, 150 μL de H_2SO_4 1% (v/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9.300 g por 10 min. Após a centrifugação, 175 μL do sobrenadante foram coletados e incubados com 25 μL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/mL em HCl 2M). A reação de derivatização ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min. Alíquotas de 100 μL foram injetadas no sistema de HPLC-DAD descrito em 3.2.3.1 A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: uma Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μm , (Phenomenex, Torrance, EUA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foi eluída com um gradiente de água (Solução A) e acetonitrila (Solução B), ambas suplementadas com ácido acético (0,2%; v/v), a 30 °C, com fluxo de 1 mL/min (0 – 28 min, 20 – 100% de B; 28 – 30 min, 100 – 20% de B; 30 – 40 min, 20% de B). O detector de DAD foi fixado em 306 nm para o monitoramento do produto MDA-DNPH.

3.8 Quantificação de adutos de DNA em urina

Para a coleta de urina, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas pelo período de 24 h. Dessa forma, os resultados estão expressos em pg/24h para cada uma das lesões.

Alíquotas de 100 μL de urina foram adicionadas a 200 μL de H_2O , 2 μL de uma solução contendo 75 fmol/ μL de [$^{15}\text{N}_5$]CEdG e 1,5 μL da solução contendo 1000 fmol/ μL de [$^{15}\text{N}_5$]8-oxodG. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex e secas completamente a vácuo. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de metanol às amostras, que foram novamente homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 10 min a 16.000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para nova secagem completa a vácuo. As amostras foram então ressuspensas em 75 μL de H_2O e centrifugadas por 5 min a 16.000 g. Por fim, foram injetados 50 μL no sistema HPLC-ESI-MS/MS descrito em 3.2.3.3. Para as quantificações utilizou-se curvas de calibração no intervalo de 5 a 400 fmol de CEdG e 50 a 4000 fmol de 8-oxodG, mantendo-se fixas as quantidades de padrão interno em 100 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]CEdG e 1000 fmol de [$^{15}\text{N}_5$]8-oxodGuo no volume de injeção.

As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) para detecção e quantificação das lesões, sendo utilizadas as seguintes fragmentações: m/z 284 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 168 $[M - 2' - \text{desoxirribose} + H]^+$ e m/z 289 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 173 $[M - 2' - \text{desoxirribose} + H]^+$ para detecção de 8-oxodG e respectivo padrão interno $[^{15}\text{N}_5]\text{8-oxodG}$; m/z 340 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 224 $[M - 2' - \text{desoxirribose} + H]^+$ e m/z 345 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 229 $[M - 2' - \text{desoxirribose} + H]^+$ para detecção de CEdG e respectivo padrão interno $[^{15}\text{N}_5]\text{CEdG}$. As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma coluna Luna C18(2) (150 x 2.0 mm i.d., 3.0 μm , 100A Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H_2O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em metanol (Solução B), a 35 °C, com fluxo de 0,130 mL/min (0 – 30 min, 0 – 50 % de B; 30 – 31 min, 50 – 80% de B; 31 – 33 min, 80 – 0% de B; 33 – 45 min, 0% de B).

3.9 Quantificação de adutos em DNA nuclear e mitocondrial

3.9.1 Extração de DNA nuclear e mitocondrial

Um homogenato foi obtido a partir da trituração de 500 mg de tecido renal em 2,5 mL de tampão tris EDTA 10 mM contendo sacarose 0,25 M, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 1.000 g por 30 minutos, sob temperatura de 4°C. O pellet contendo os núcleos foi separado para posterior procedimento de extração do DNA, enquanto que o sobrenadante contendo as mitocôndrias foi centrifugado novamente a 10.000 g por 15 minutos. O novo pellet formado foi lavado com tampão Tris EDTA 10 mM, pH 7,4, e, a seguir, dissolvido em tampão mitocondrial (glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM, pH 8,0). As mitocôndrias foram lisadas pela adição de 250 μL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 M e SDS 1%. O pH da mistura foi neutralizado com 40 μL de uma solução de acetato de sódio 3 M e ácido acético 2 M, pH 4,8. Após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, ao qual foram adicionados 20 μL de uma solução aquosa de proteinase K (20 mg/mL). O tubo

foi invertido 25 vezes para homogeneização e incubado à 37°C por 1 hora. A seguir, adicionou-se 20 µL de RNase A (15 mg/mL em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,2) e, uma vez homogeneizada, a amostra foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente. Ao término da incubação, as proteínas foram precipitadas utilizando-se 250 µL de uma solução comercial, a amostra centrifugada a 2.000 g por 10 minutos e ao sobrenadante adicionaram-se 5 mL de isopropanol gelado para precipitação do DNA. Após centrifugação a 3.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o DNA lavado com 2 mL de etanol 70%, seco e ressuspensão em 50 µL de uma solução aquosa de desferroxamina 0,1 mM e D-penicilamina 10 mM.

Para extração do DNA nuclear, adicionou-se 10 mL de tampão A (320 mM sacarose, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 em pH final de 7,5) ao pellet obtido após a primeira centrifugação. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 1.500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao novo pellet adicionou-se 5 mL de solução de lise de células. Uma vez dissolvido completamente o pellet, adicionou-se 175 µL de SDS 10%. O tubo foi invertido 20 vezes e procedeu-se a extração do DNA a partir da adição de proteinase K, conforme descrito anteriormente para o DNA mitocondrial, mantendo-se as devidas proporções de todos os reagentes.

Todas as soluções utilizadas foram adicionadas de desferroxamina 0,5 mM e D-penicilamina 10 mM imediatamente antes do uso, com o propósito de prevenir a formação artefactual de adutos durante o processo de extração do DNA. A concentração e a pureza do DNA obtido foram determinadas em espectrofotômetro do tipo NanoDrop.

Com o propósito de checar a ausência de contaminação de amostras de DNA mitocondrial com DNA nuclear, amostras representativas foram submetidas a uma reação de PCR em tempo real utilizando-se um par de *primers* capaz de amplificar o gene *Nd4*, constitutivamente expresso apenas pelo DNA mitocondrial. Os *primers* utilizados foram ND4-Forward 5'-TAGCTCAATCTGCCTACGCC-3' e ND4-Reverse 5'-ATGGCTGTGATGACTAGGGC-3'. O DNA amplificado foi marcado com SYBR Green I para facilitar a análise quantitativa dos produtos de PCR em um volume de reação de 25 µL. O procedimento foi realizado à uma temperatura inicial de 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de denaturação à 95 °C por 15 segundos, anelamento por 30 segundos a 60 °C e polimerização por 30 segundos a 72 °C. Esta etapa foi realizada com a colaboração da Professora Nadja Cristhina de Souza Pinto (IQ/USP).

3.9.2 Quantificação de Adutos em DNA nuclear

Alíquotas contendo 80 µg de DNA nuclear (isolado conforme descrito anteriormente) foram adicionadas a 3,8 µL de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4), 3,2 µL de DNase I (1 unidade), 5,3 µL da solução contendo 75 fmol/µL do padrão [¹⁵N₅]CEdG e 2 µL da solução contendo 1000 fmol/µL do padrão [¹⁵N₅]8-oxodG. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h. Após a incubação foram adicionados 3,2 µL da enzima PDE1 (0,0005 unidade) e 4 µL da enzima fosfatase alcalina (3,2 unidades). As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, o volume final da incubação (100 µL) foi centrifugado por 10 min a 9300 g e uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi injetada no sistema de HPLC-DAD para a quantificação de 2'-desoxiguanosina (dG). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, EUA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H₂O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% , 50 % metanol e H₂O (Solução B), a um fluxo de 1 mL/min, 35 °C, nas seguintes condições: 0 – 25 min, 0 – 40 % B; 25 – 26 min, 40 – 0 % B; 26 – 40 min, 0 % B. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação de dG normal. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,025 até 1,5 nmol.

Para quantificação dos adutos CEdG e 8-oxodG, alíquotas de 50 µL foram injetadas paralelamente no sistema de HPLC-ESI-MS/MS. As seguintes condições foram utilizadas em modo positivo (ESI+, [M+H]⁺), utilizando os parâmetros otimizados: CUR, 15 psi; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; CAD, LOW; TEM, 650 °C; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no monitoramento de reações múltiplas (MRM) são descritas na Tabela 2. Foi utilizado um sistema de *SPE online* conforme o descrito abaixo. *Válvula posição 0*: Coluna Luna C18 (2) 50 mm x 4,6 mm, 2.6 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (Solução B), a um fluxo de 130 µL/min, 25 °C, nas seguintes condições: 0 – 5 min, 0 – 4 % de B; 5 – 6 min, 4% de B; 6 – 11 min, 4 – 7 % de B; 11 – 12 min, 7 – 8 % de B; 12 – 16 min, 8 – 10 % de B; 16 – 25 min, 10 – 60 % de B; 25 – 26 min, 60 – 80 % de B; 26 – 33 min, 80 % de B; 33 – 35 min, 80 – 0 % de B; 35 – 50 min, 0 % de B (*Linha 1*). Concomitantemente uma coluna

Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm, 3 μ m, (Phenomenex, Torrance, EUA) é eluída em modo isocrático por uma solução constituída por 15% de metanol em água com 0,1% de ácido fórmico, a um fluxo de 130 μ L/min, 25 °C (Linha 2). *Válvula posição 1*: Com a alteração do posicionamento da válvula, as duas linhas descritas acima passam a ser eluídas pelo gradiente da bomba binária e as duas colunas analíticas passam a integrar a mesma linha do sistema cromatográfico (Linha 3). As seguintes condições de posicionamento para a válvula de comutação de fluxo são empregadas: 0 – 13 min, posição 0; 13 – 35 min, posição 1; 35 – 50 min posição 0. Para as quantificações foram injetadas curvas de calibração no intervalo de 10 a 4000 fmol de 8-oxodG (1000 fmol de [15 N₅]8-oxodGuo) e 5 a 1500 fmol de CEdG (200 fmol de [15 N₅]CEdG).

Tabela 2. Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação das lesões CEdG e 8-oxodG em DNA nuclear de rim (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
8-oxodG	284	168	120	36	21	8
	284	140	120	36	45	6
[15 N ₅]8-oxodG	289	173	120	36	21	8
CEdG	340	223	120	51	21	12
	340	177	120	51	41	8
[15 N ₅]CEdG	345	228	120	51	21	12

3.9.3 Quantificação de Adutos em DNA mitocondrial

Alíquotas contendo 40 μ g de DNA mitocondrial (isolado conforme descrito anteriormente) foram adicionadas a 2,85 μ L de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4), 1,6 μ L de DNase I (0,5 unidade), 3,98 μ L da solução contendo 75 fmol/ μ L do padrão [15 N₅]CEdG e 1,5 μ L da solução contendo 1000 fmol/ μ L do padrão [15 N₅]8-oxodG. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h. Após a incubação foram adicionados 1,6 μ L da enzima PDE1 (0,00025 unidade) e 2 μ L da enzima fosfatase

alcalina (1,6 unidades). As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 1 h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, o volume final da incubação (75 µL) foi centrifugado por 10 min a 9300 g e uma alíquota de 60 µL do sobrenadante foi injetada no sistema de HPLC-DAD descrito anteriormente para purificação das frações correspondentes aos adutos de interesse e também para a quantificação de 2'-desoxiguanosina (dG). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, EUA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em H₂O (Solução A) e ácido fórmico 0,1% , 50 % metanol e H₂O (Solução B), a um fluxo de 1 mL/min, 35 °C, nas seguintes condições: 0 – 26,5 min, 0 – 40 % B; 26,5 – 32 min, 40 – 75 % B; 32 – 33 min, 75 % B; 33 – 34 min, 75 – 0% B. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação de dG normal. A corrida teve um total de 46 minutos, sendo que as frações entre 24,2 – 25,8 min e 36,65 – 38,8 min, correspondendo aos intervalos nos quais eluíam os adutos 8-oxodG e CEdG, respectivamente, foram coletadas em um mesmo tubo.

As frações coletadas, contendo um volume de aproximadamente 4 mL, foram concentradas por evaporação a vácuo durante 4 horas, em um concentrador modelo miVac. Após a completa evaporação do solvente, as amostras foram ressuspensas em 60 µL de água, homogeneizadas, e uma alíquota de 50 µL foi injetada no sistema de HPLC-ESI-MS/MS para quantificação dos adutos. O sistema cromatográfico consistiu de uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, EUA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (Solução B), a um fluxo de 130 µL/min, 35 °C, nas seguintes condições: 0 – 15 min, 0 – 40 % de B; 15 – 16 min, 40 – 100 % de B; 16 – 30 min, 100 % de B. As análises no espectrômetro de massas foram realizadas em modo positivo (ESI+, [M+H]⁺), utilizando os parâmetros otimizados: CUR, 15 psi; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; CAD, Low; TEM, 650 °C; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no monitoramento de reações múltiplas (MRM) foram as mesmas aplicadas para quantificação dos adutos em DNA nuclear, conforme descrito na Tabela 2. Foram preparadas curvas de calibração no intervalo de 100 a 8000 fmol de 8-oxodG (1000 fmol de [¹⁵N₅]8-oxodGuo) e 5 a 250 fmol de CEdG (200 fmol de [¹⁵N₅]CEdG) para quantificação dos analitos nas amostras estudadas.

3.10 Análise da Expressão de Proteínas

Um extrato de proteínas foi preparado a partir da homogeneização de aproximadamente 50 mg de tecido renal em 1 mL de tampão RIPA (NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e Tris 50 mM pH 8,0) contendo 10 μ L/mL de coquetel inibidor de proteases e fosfatases. Uma vez homogeneizadas, as amostras foram mantidas por 30 minutos no gelo, com agitação a cada 10 minutos, e posteriormente centrifugadas a 13.500 g por 20 minutos. As proteínas totais foram quantificadas no sobrenadante pelo método de Bradford e alíquotas do homogenato estocadas a -80°C para posterior utilização.

50 μ g ou 70 μ g de proteínas diluídas em tampão de amostra (Tris HCl 0,25 M pH 6,8, glicerol 40%, SDS 8%, β -mercaptoetanol 4% e azul de bromofenol) foram aplicadas em cada poço de um gel de Tris-glicina-SDS-poliacrilamida composto de uma porção inicial de concentração 5% para empilhamento das proteínas e outra porção de 12% para separação eletroforética das mesmas a 150 volts por 2 horas. A eletroforese foi monitorada pela adição de um padrão de peso molecular na faixa de 10 a 260 kDa. As proteínas foram então transferidas para uma membrana de PVDF por método semi-seco. A membrana foi bloqueada com leite desnatado (5% em tampão TBS-Tween) por 1h à temperatura ambiente sob agitação constante e, ao término do bloqueio, incubada por 18 horas a 4°C sob agitação com anticorpos primários anti TGF- β (1:1000), AMPK e pAMPK (1:1000), SOD2 (1:2000) ou PGC1- α (1:1000). Os anticorpos primários foram removidos, a membrana submetida a 3 lavagens de 10 minutos com tampão TBS-Tween e novamente incubada com anticorpos secundários anti-IgG de coelho diluídos 5.000 vezes em solução de bloqueio. Após 2 horas à temperatura ambiente o anticorpo secundário foi removido e a membrana novamente lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween. Como controle endógeno utilizou-se anticorpo anti β -actina conjugado à peroxidase diluído 20.000 vezes e incubado por 1h à temperatura ambiente.

A detecção das bandas correspondentes às proteínas de interesse e à proteína constitutiva foi realizada em um fotodocumentador após adição de substrato quimioluminescente. Para quantificação utilizou-se o software ImageQuant TL (GE, Fairfield, EUA). Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de intensidade da banda em relação ao grupo controle.

3.11 Análise da Expressão Gênica do *Tgf-β*

Para avaliar a expressão gênica do *Tgf-β*, o RNA total foi extraído de homogenatos de tecido utilizando-se o RNeasy® Mini Kit, de acordo com as orientações do fabricante. O RNA total foi quantificado em um espectrofotômetro do tipo NanoDrop e sua integridade foi verificada em um sistema de eletroforese Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – CEFAP USP. Para síntese de cDNA utilizou-se o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription*, seguindo-se as instruções do fabricante. Foram utilizados 2 µg de RNA total em um volume final de reação de 20 µL. O cDNA obtido foi estocado à -20°C.

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o método Taqman® (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Os cDNAs oriundos das amostras de tecido renal foram diluídos para a concentração de 50 ng/µL. As reações foram feitas para um volume final de 10 µL, contendo 0,5 µL da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com a sonda FAM-NFQ de cada gene, 1 µL de cDNA, 5 µL de 2X Taqman® Gene Expression Master Mix e 3,5 µL de água livre de RNase. Para o ensaio, os *primers* utilizados (Rn00572010_m1 para TGF-β1, Rn00667869_m1 para actina e Rn01775763_g1 para GAPDH) foram fornecidos pelo fabricante (Life Technologies, Carlsbad, EUA), que não especificam a sequência nucleotídica, entretanto, garantem a especificidade e funcionalidade do ensaio. Para a análise do mRNA, o nível relativo da expressão gênica do *Tgf-β* foi calculado em relação à expressão dos controles endógenos (*β-actina* e *Gapdh*) utilizando o método Ct (*cycle threshold method*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

O ensaio de PCR em tempo real pelo método Taqman® foi realizado sob as seguintes condições: ativação da enzima AmpErase®UNG a 50°C por 2 minutos, seguida da desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e elongação dos *primers* e sonda a 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi analisada em duplicata técnica.

3.12 Quantificação de pAMPK por ELISA

A expressão da forma fosforilada de AMPK α (Thr172) foi avaliada por método de ELISA seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 50 mg de tecido renal foram homogeneizados em 500 μ L de tampão de lise com 1 mM de PMSF. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford e alíquotas correspondentes a 100 ou 250 μ g de proteínas foram diluídas em tampão diluente fornecido no kit comercial para serem utilizadas no ensaio. Após determinação espectrofotométrica da absorbância a 450 nm em um leitor de placas, a expressão da proteína de interesse foi calculada com base na densidade óptica obtida nas amostras dos grupos experimentais em relação aos seus respectivos controles.

3.13 Análise da atividade de Sirtuína-1

Amostras contendo 100 μ g de proteínas, extraídas do tecido renal conforme descrito no item 3.10 foram utilizadas para medida da atividade de Sirt-1 a partir de ensaio disponível comercialmente. O experimento foi conduzido de acordo com instruções do fabricante, utilizando-se 25 μ L de homogenato. Após incubação da amostra com 25 μ L de uma mistura de substrato e NAD⁺ por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de nicotinamida e um desenvolvedor de fluorescência. Procedeu-se a leitura da intensidade de fluorescência em um leitor de placas com os comprimentos de onda de excitação e emissão configurados em 360 e 460 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi preparada no intervalo de 1 a 25 μ M de peptídeo desacetilado padrão, como forma de permitir a quantificação da atividade de Sirt-1 nas amostras com base na capacidade de desacetilação do mesmo substrato acetilado adicionado na reação.

3.14 Quantificação de intermediários do ciclo de Krebs

A quantificação simultânea dos intermediários piruvato, lactato, malato, succinato, fumarato, glutamina e glutamato foi realizada no sistema de HPLC–ESI–MS/MS. O preparo das amostras foi realizado conforme o descrito por Rahman e colaboradores, 2014, com modificações. Aproximadamente 30 mg de tecido renal foram homogeneizados em 500 uL de água deionizada, sob banho de gelo. Uma alíquota de 20 uL de homogenato foi utilizada para extração dos metabólitos intracelulares, conduzida com a adição de 463,4 µL de uma solução de solvente de extração (40% acetonitrila, 40% metanol e 20% água) e 16,6 µL do padrão interno ($^{13}\text{C}_{10}$ – $^{15}\text{N}_5$ –ATP, 500 pmol). As amostras foram então homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 15 min a 20.000 g. Alíquotas de 450 µL foram transferidas para novos tubos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para secagem completa a vácuo. As amostras foram então ressuspensas em 15 µL de H_2O e centrifugadas por 5 min a 16.000 g. Por fim, foram injetados 3 µL no sistema HPLC–ESI–MS/MS.

As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI–, $[\text{M}–\text{H}]–$), utilizando-se os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 18 psi; GS1, 60 psi; GS2, 50 psi; CAD, LOW; TEM, 600 °C; EP, –10 V e IS, –4500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM são descritas na Tabela 3. As razões entre as áreas (metabólitos/ $^{15}\text{N}_5$ – $^{13}\text{C}_{10}$ –ATP) foram utilizadas para quantificação. Curvas foram injetadas nos intervalos de 0,1 a 15 pmol de succinato; 1 a 500 pmol de fumarato e malato; 5 a 1000 pmol de piruvato; 100 a 4000 pmol de lactato; 100 a 1500 pmol de glutamina e glutamato; todas corrigidas com 30 pmol de $^{13}\text{C}_{10}$ – $^{15}\text{N}_5$ –ATP no volume de injeção. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma coluna Luna C18(2) (150 x 2.0 mm i.d., 3.0 µm, 100A Phenomenex, Torrance, EUA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foi eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,1% de tributilamina, 0,03% ácido acético em água (Solução A) e 10 % da solução A em acetonitrila (Solução B), a 35 °C, com fluxo de 175 µL/min (0 – 22 min, 10 – 100 % de B; 22 – 25 min, 100 % de B; 25 – 26 min, 100 – 10 % de B; 26 – 37 min, 10 % de B). A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas durante o intervalo de 1,5 – 18 min.

Tabela 3. Fragmentações e energias utilizadas para a quantificação de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Piruvato	87.0	43.2	50	-28	-12	-6
Lactato	89.1	43.0	50	-28	-20	-6
Malato	132.9	115.1	50	-35	-16	-3
	132.9	70.9	50	-35	-23	-3
Succinato	116.9	72.9	50	-30	-16	-11
	116.9	98.9	50	-30	-16	-11
Fumarato	115.0	71.0	50	-35	-15	-11
	115.0	59.0	50	-35	-15	-9
Glutamina	145.1	126.9	50	-45	-15	-10
	145.1	101.0	50	-45	-19	-9
Glutamato	145.9	128.1	50	-45	-17	-5
	145.9	102.0	50	-45	-19	-9
[¹³ C ₁₀ ¹⁵ N ₅]-ATP	521.2	78.9	50	-75	-48	-5

3.15 Quantificação de ATP, ADP e AMP

O preparo das amostras de rim para quantificação de ATP, ADP e AMP foi realizado conforme descrito no item anterior (3.14). Ao final, 6 µL foram injetados no sistema de HPLC-ESI/MSn descrito no item 3.2.3.2. Para separação cromatográfica dos analitos utilizou-se uma coluna Luna C18 (2) de 150 x 2.0-mm-i.d., 3.0-µm, 100 Å (Phenomenex, Torrance, EUA) eluída com um gradiente de 0,1 % de tributilamina e 0,03% de ácido acético em água (solução A) e acetonitrila (solução B), sob um fluxo de 200 µL/min e temperatura de 40° conforme a seguir: 0 a 10 min, 20 - 90% B; 10 a 11 min, 90 - 20% B; 11 a 21 min, 20% B. Uma válvula foi configurada para permitir a

entrada dos eluentes no espectrômetro de massas no intervalo de 2,8 a 12 minutos. A análise foi conduzida com ionização por *electrospray* em modo negativo (ESI^- , $[\text{M}-\text{H}]^-$), empregando-se os seguintes parâmetros otimizados: *nebulizer*, 15 psi; *dry gas*, 8.0 L/min; *dry temperature*, 200 °C; *capillary* 3500 V. Os cromatogramas foram obtidos utilizando-se as seguintes fragmentações: m/z 346.0 $\rightarrow$ m/z 210.5 para detecção de AMP; m/z 426.0 $\rightarrow$ m/z 327.6 para detecção de ADP; m/z 506.0 $\rightarrow$ m/z 407.6 para detecção de ATP e m/z 521.0 $\rightarrow$ m/z 422.6 para detecção de $[\text{}^{13}\text{C}_{10}\text{}^{15}\text{N}_5]\text{ATP}$. As curvas de calibração continham AMP e ADP na faixa de 1 a 80 pmol, e ATP na faixa de 50 a 1600 pmol, bem como 60 pmol do padrão interno ($[\text{}^{13}\text{C}_{10}\text{}^{15}\text{N}_5]\text{ATP}$) no volume de injeção.

3.16 Quantificação de ácido úrico em plasma e urina

Alíquotas de 50 μL de plasma ou urina foram diluídas em 1.200 μL de água e centrifugadas a 20.000 g por 5 minutos. 10 μL de plasma ou 2 μL de urina foram injetados no Sistema de HPLC-DAD. A condição cromatográfica consistiu de uma coluna C18 (2) 250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm (Shimadzu, Kyoto, Japan) eluída com um gradiente de 5 mM de formiato de amônio (solução A) e metanol (solução B) em um fluxo de 680 $\mu\text{L}/\text{min}$ e temperatura de 20 °C, conforme a seguir: 0 – 6 min, 0% B; 6 – 7 min, 0 – 2% B; 7 – 9 min, 2 – 10% B; 9 – 15 min, 10 – 80% B; 15 – 20 min, 80% B; 20 – 21 min, 80 – 0% B; e 21 – 38 min, 0% B. Os cromatogramas foram adquiridos em 290 nm para a quantificação de ácido úrico.

3.17 Análise da metilação e hidroximetilação global do DNA mitocondrial

Uma alíquota do DNA mitocondrial extraído conforme descrito em 3.9.1 e hidrolisado enzimaticamente de acordo com o descrito no item 3.9.2 foi utilizada para a quantificação de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mC) e 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5-hmC). A um volume de DNA correspondente a 0,4 nmol de 2'-desoxicitidina

adicionou-se 2,25 μL de uma solução de $[^{15}\text{N}_5]1,N^6\text{-eteno-2'-desoxiadenosina}$ ($1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$) (1 pmol/ μL). A mistura foi homogeneizada e submetida à concentração por evaporação a vácuo a 40°C durante 30 minutos, em um concentrador modelo miVac. As amostras foram então ressuspensas em 15 μL de acetonitrila, dos quais 4 μL foram injetados no sistema de HPLC-ESI-MS/MS.

As análises foram conduzidas com ionização por electrospray em modo positivo (ESI^+ , $[\text{M}+\text{H}]^+$), utilizando os seguintes parâmetros otimizados: CUR, 15 psi; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; CAD, LOW; TEM, 650°C; EP, 10 V e IS, 5500 V. As fragmentações e energias utilizadas no MRM são descritas na Tabela 4. Foram monitoradas as transições correspondentes a 2'-desoxicitidina (dC), 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mC) e 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5-hmC). Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 5 a 400 pmol de dC; de 0,5 a 16 e de 0,01 a 2 pmol de 5-mC para quantificação de 5-mC e 5-hmC, respectivamente. Em todos os pontos das curvas, utilizou-se 60 fmol de $[^{15}\text{N}_5]1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$ como padrão interno. O seguinte sistema cromatográfico foi utilizado: Coluna *Synchronis* HILIC (2) 150 mm x 4,6 mm, 5 μm , (Thermo Scientific, USA) com uma pré-coluna HILIC 4,0 x 3,0 mm (Thermo Scientific, USA) foi eluída com um gradiente de acetonitrila (Solução A) e tampão acetato de amônio 5 mM com 0.0015% de hidróxido de amônio, pH 8,2 (Solução B), a um fluxo de 600 $\mu\text{L}/\text{min}$, 35°C, nas seguintes condições: 0 – 20 min, 2 – 24 % B; 20 – 21 min, 24 – 2 % B; 21 – 35 min, 2 % B. A válvula de comutação de fluxo foi configurada para permitir a entrada de eluentes no espectrômetro de massas durante o intervalo de 9 – 20 min.

Tabela 4. Fragmentações e energias utilizadas para análise do nível de metilação e hidroximetilação em DNA nuclear e mitocondrial de rim (DP: potencial de dissociação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula).

Analito	Q1 (amu)	Q3 (amu)	Dwell Time (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
dC	228.0	112.0	200	36	15	6
5-mC	242.0	126.0	200	36	15	6
5-hmC	258.0	142.0	200	36	15	6
$[^{15}\text{N}_5]1,N^6\text{-}\epsilon\text{dA}$	281.0	165.0	200	41	27	8

3.18 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Para variáveis que apresentaram distribuição normal, as médias entre os grupos foram comparadas por Teste t ou ANOVA de uma via, com testes de comparações múltiplas de Dunnet ou Sidak. Já para as variáveis que não assumiram distribuição normal, as médias foram comparadas com teste de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis e pós-teste de Dunns. Em ambos os casos adotou-se critério mínimo de significância de 95%.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Glicemia, peso e função renal

Após 24 horas da administração de estreptozotocina, todos os animais apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL e isso se repetiu após 48 e 72 horas, quando se confirmou a condição de diabetes. Os ratos diabéticos alcançaram o controle da glicemia de 7 a 14 dias após o início do tratamento, quando apresentaram níveis glicêmicos comparáveis àqueles do grupo controle não diabético (Figura 7). Conforme esperado, os níveis de hemoglobina glicada aumentaram nos animais diabéticos e foram reduzidos uma vez que os animais foram tratados (Tabela 5). Ratos diabéticos nos períodos de curta e longa duração apresentaram proteinúria aumentada após 8, 12, 18 e 24 semanas de hiperglicemia. O tratamento os animais no estudo de curta duração foi instituído antes do início da proteinúria e preveniu o seu desenvolvimento. Por outro lado, o tratamento dos animais no estudo de longa duração foi instituído após o início da proteinúria e reverteu-a completamente ao final do período de 24 semanas. Injúria tubular foi detectada após 12 semanas de diabetes pela medida de KIM-1 na urina, e estes níveis retornaram ao normal após o tratamento.

Em se tratando do peso dos animais ao longo do período de estudo, os dados evidenciam que todos os animais partiram de uma faixa de peso próxima e apresentaram uma tendência à perda de peso durante o período de diabetes. Nos grupos nos quais se empregou tratamento, a tendência à perda de peso foi revertida após o início do mesmo. A hiperglicemia provocou um aumento da razão massa do rim/massa corpórea, que também foi normalizado uma vez que a glicemia foi controlada (Tabela 5).

Figura 7. Glicemia (mg/dL) ao longo de 8 ou 24 semanas. O Controle glicêmico foi alcançado de 7 a 14 dias após o início do tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.

Tabela 5. O prejuízo precoce à função renal é recuperado pelo controle glicêmico após os períodos curto e longo de hiperglicemia. O peso corpóreo e a glicemia foram avaliados semanalmente ao longo do estudo, mas os valores na tabela se referem às medidas nos períodos especificados. No estudo de curta duração, a função renal e a HbA1c foram avaliadas em dois períodos (4 e 8 semanas). No estudo de longa duração estes parâmetros foram avaliados em 3 períodos (6, 18 e 24 semanas). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0.05$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0.01$ comparado com o respectivo grupo diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.

Grupos		Semanas	Peso corpóreo (g)		Glicemia (mg/dL)		HbA1c (%)		Proteinúria (mg/24 h)		Albuminúria (mg/24 h)		KIM-1 (pg/24 h)		Massa renal/massa corpórea	
Curta duração	ND8	4	394.1	± 10.4	107.9	± 0.6	2.2	± 0.1	8.2	± 0.4	-	-	-	-	-	-
		8	415.8	± 10.9	113.2	± 4.2	2.2	± 0.1	16.6	± 3.9	-	-	0.36	± 0.01	-	-
	D8	4	358.9	± 10.2*	539.1	± 21.0*	7.2	± 0.2*	14.3	± 2.8	-	-	-	-	-	-
		8	348.4	± 10.5*	590.0	± 9.6*	8.0	± 0.2*	34.8	± 2.4*	-	-	0.63	± 0.02*	-	-
	D4INS	4	351.4	± 10.5*	511.7	± 26.2*	7.0	± 0.2*	16.1	± 3.2	-	-	-	-	-	-
		8	408.2	± 13.4 ⁺	207.8	± 18.3 ⁺	3.6	± 0.1* ⁺	16.5	± 3.8 ⁺	-	-	0.42	± 0.02 ⁺	-	-
	D4MET	4	336.7	± 6.8*	560.5	± 13.1*	7.2	± 0.2*	9.5	± 2.2	-	-	-	-	-	-
		8	369.2	± 6.4*	210.8	± 34.3 ⁺	4.7	± 0.3* ⁺	9.3	± 3.6 ⁺	-	-	0.48	± 0.03 ⁺	-	-
Longa duração	ND12	12	449.7	± 10.7	118.5	± 4.0	1.8	± 0.1	-	-	6.2	± 1.0	3157	± 666.2	0.34	± 0.01
	D12	12	383.5	± 8.1*	453.8	± 21.4*	4.3	± 0.2*	-	-	39.9	± 8.6*	29722	± 6343*	0.55	± 0.02*
	ND24	6	462.2	± 10.7	113.8	± 2.6	1.8	± 0.1	-	-	7.8	± 1.4	-	-	-	-
		18	530.9	± 15.0	118.9	± 2.2	1.9	± 0.1	-	-	2.6	± 0.7	-	-	-	-
		24	558.8	± 14.3	114.3	± 2.1	1.9	± 0.1	-	-	5.5	± 1.6	2878	± 731.9	0.32	± 0.01
	D24	6	358.3	± 7.6*	457.4	± 23.5*	5.0	± 0.2*	-	-	20.6	± 5.1	-	-	-	-
		18	396.5	± 7.4*	515.5	± 19.2*	4.5	± 0.2*	-	-	31.7	± 10.1*	-	-	-	-
		24	410.9	± 8.6*	497.7	± 26.9*	4.6	± 0.3*	-	-	21.7	± 4.4*	17266	± 1829*	0.60	± 0.03*
	D12INS	6	357.8	± 6.9*	448.0	± 29.0*	5.3	± 0.2*	-	-	14.1	± 1.7	-	-	-	-
		18	466.4	± 13.1* ⁺	102.3	± 6.9 ⁺	2.3	± 0.1 ⁺	-	-	18.7	± 4.4	-	-	-	-
		24	467.5	± 13.9* ⁺	107.9	± 20.1 ⁺	2.1	± 0.1 ⁺	-	-	2.9	± 0.5 ⁺	4341	± 1856 ⁺	0.40	± 0.01 ⁺
	D12MET	6	388.0	± 10.4*	430.0	± 53.9*	4.6	± 0.1*	-	-	11.9	± 3.7	-	-	-	-
		18	484.6	± 23.1 ⁺	101.0	± 19.6 ⁺	2.2	± 0.1 ⁺	-	-	23.3	± 8.7	-	-	-	-
		24	499.5	± 22.0* ⁺	93.2	± 7.1 ⁺	2.2	± 0.1 ⁺	-	-	2.5	± 0.6 ⁺	1238	± 694.7 ⁺	0.40	± 0.02 ⁺

4.2 Marcadores de estresse oxidativo e glicação do DNA

Os níveis de malonaldeído no tecido renal, que serviram como indicadores de estresse oxidativo, aumentaram nos animais hiperglicêmicos. No estudo de curta duração, o tratamento com insulina reverteu esse aumento, mas o mesmo não ocorreu quando os animais foram tratados com insulina associada à metformina (Figura 8A). No estudo de longa duração, entretanto, o malonaldeído retornou aos níveis normais após o controle glicêmico com os dois esquemas de tratamento utilizados (Figuras 8B e 8C).

Figura 8. Níveis de malonaldeído no tecido renal (pmol/mg de proteína) no estudo de curta duração após 8 semanas (A) e no estudo de longa duração após 12 (B) e 24 semanas (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle diabético.

Após 4 semanas de diabetes os animais apresentaram excreção urinária aumentada de 8-oxodG e CEdG em comparação com os animais não diabéticos (Figuras 9A e 9C). Esses níveis foram reduzidos ao final de 8 semanas nos grupos cuja glicemia foi controlada (Figuras 9B e 9D). No estudo de longa duração, apesar de algumas diferenças pontuais terem sido observadas após 6 e 8 semanas (Figuras 10A, 10B, 10F e 10G), a excreção urinária de 8-oxodG e CEdG foi significativamente aumentada após 12 semanas de hiperglicemia (Figuras 10C e 10H) e se manteve aumentada após 18 (Figuras 10D e 10I) e 24 semanas (Figuras 10E e 10J). Uma vez que os animais tiveram a glicemia controlada, os níveis dessas lesões na urina foram normalizados.

Figura 9. 8-oxodG e CEdG (pg/24h) em urina dos animais do estudo de curta duração após 4 semanas (A e C, respectivamente), antes do início do tratamento, e após 8 semanas (B e D, respectivamente), ao final do período de tratamento. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle diabético.

A quantificação dos adutos 8-oxodG e CEdG em DNA nuclear de rim mostrou não haver diferença significativa nos níveis dessas lesões em amostras de animais diabéticos em relação aos não diabéticos em nenhum dos diferentes períodos estudados (Figuras 11A, 11B, 11C, 12A, 12B e 12C). Uma redução significativa nos níveis de 8-oxodG foi identificada nos animais tratados em relação ao grupo diabético no estudo de curta duração (Figura 11C). Em amostras de DNA mitocondrial de animais diabéticos do estudo de curta duração foi possível detectar um aumento significativo de 8-oxodG em relação ao grupo controle e os tratamentos normalizaram essa alteração (Figura 11D). Já no estudo de longa duração, observou-se aumento significativo de 8-oxodG em mtDNA apenas no grupo tratado com insulina associada à metformina (Figuras 11E e 11F).

Quanto aos níveis de CEdG, assim como observado no DNA nuclear, nenhuma diferença significativa foi detectada em mtDNA ao final de 8, 12 ou 24 semanas de estudo entre os diferentes grupos experimentais (Figuras 12D, 12E e 12F).

Figura 10. 8-oxodG e CEdG (pg/24h) em urina dos animais do estudo de longa duração após 6, 8, 12, 18 e 24 semanas. De A a E estão apresentados os dados de 8-oxodG e de F a J os dados de CEdG nos períodos mencionados, respectivamente. Em 12 semanas a quantificação foi

realizada apenas nos animais dos grupos ND12 e D12. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 10 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle diabético.

Figura 11. 8-oxodG (8-oxodG/10⁶dG) em DNA nuclear após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo e em DNA mitocondrial nos mesmos períodos (D, E e F, respectivamente). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle não diabético. + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético.

Figura 12. CE dG (CE dG/10⁶dG) em DNA nuclear após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo e em DNA mitocondrial nos mesmos períodos (D, E e F, respectivamente). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais de acordo com teste t para o experimento realizado em 12 semanas ou ANOVA e pós-teste de Sidak para os demais períodos.

Por fim, com o intuito de investigar a mitocôndria como possível fonte de estresse oxidativo, nós avaliamos a expressão proteica de SOD2. Nenhuma diferença significativa foi observada em nenhum dos períodos estudados (Figuras 13A, 13B e 13C).

Figura 13. Expressão renal de SOD2 (razão SOD2/β-actina em relação ao grupo controle não diabético em unidades arbitrárias). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais de acordo com teste t para o experimento realizado em 12 semanas ou ANOVA e pós-teste de Sidak para os demais períodos.

4.3 Expressão de pAMPK e TGF-β

A expressão de pAMPK no rim foi reduzida nos animais hiperglicêmicos em todos os períodos avaliados (8, 12 e 24 semanas) e não foi restaurada 4 ou 12 semanas após o controle da glicemia e da função renal (Figuras 14A, 14B e 14C). Os dados foram posteriormente confirmados pela quantificação de AMPK total e da fração fosforilada por *western blot* (Figuras 15A a 15F).

Figura 14. Expressão de pAMPK (Thr172) quantificada por ELISA e expressa em intensidade de absorbância a 450 nm. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao respectivo controle não diabético.

Figura 15. Níveis proteicos de AMPK e pAMPK (Thr172) quantificados por *western blot* e expressos em unidades arbitrárias após correção pelo nível de β -actina como controle endógeno. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Imagens representativas das bandas obtidas em cada um dos períodos estudados são apresentadas em D, E e F, respectivamente. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético.

Paralelamente, a expressão renal de TGF- β aumentou após 8, 12 e 24 semanas de hiperglicemia. Os tratamentos iniciados após 4 semanas de hiperglicemia foram capazes de normalizar os níveis de TGF- β ao final de 8 semanas (curta duração), mas os tratamentos iniciados após 12 semanas de hiperglicemia não reduziram a expressão proteica do TGF- β ao final de 24 semanas, ainda com a glicemia e função renal normalizadas (Figuras 16A a 16D). Nós também avaliamos a expressão gênica do *Tgf- β* e verificamos um aumento após 12 e 24 semanas de hiperglicemia, e que o controle glicêmico recuperou essa alteração (Figuras 16E e 16F).

Figura 16. Níveis proteicos de TGF- β quantificados por *western blot* e expressos em unidades arbitrárias após correção pelo nível de β -actina como controle endógeno. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Imagens representativas das bandas obtidas em cada um dos períodos estudados são apresentadas em D. Expressão gênica do *Tgf- β* (unidades arbitrárias da razão Δ CT *Tgf- β* /*Actina* em relação ao controle não diabético) após 12 (E) e 24 (F) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle não diabético. + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético.

4.4 Atividade de Sirt-1 e níveis de ácido úrico

A redução persistente da expressão de pAMPK poderia ser atribuída a diversos fatores já descritos na literatura, como estresse oxidativo, redução da atividade de SIRT-1 e/ou hiperuricemia (CICERCHI et al., 2014; LAN et al., 2008; ZHENG et al., 2012). Conforme descrito no item 4.2, os marcadores de estresse oxidativo aumentados por consequência do diabetes foram normalizados após o controle glicêmico. A atividade de Sirt-1 renal no estudo de curta duração foi ligeiramente reduzida nos animais diabéticos, apesar de não haver diferença estatística significativa, mas aumentada naqueles que receberam tratamento com insulina e metformina (Figura 17A). Nenhuma alteração

significativa na atividade de Sirt-1 foi observada nos animais do estudo de longa duração (Figuras 17B e 17C).

Figura 17. Atividade de Sirt-1 (μM de peptídeo desacetilado) no tecido renal dos animais do estudo de curta duração (A) e longa duração após 12 (B) e 24 (C) semanas. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $N = 5$ a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. ++ $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético.

Por outro lado, o clearance de ácido úrico acompanhou a tendência observada para a expressão renal de pAMPK (Figuras 18A e 18B), e uma boa correlação positiva foi observada entre estes dois fatores (Figura 18 C, $r = 0.6530$, $p < 0,0001$). Os dados de ácido úrico no plasma e na urina são apresentados na Tabela 6. Uma correlação inversa significativa foi também observada entre os níveis plasmáticos de ácido úrico e a expressão renal de pAMPK ($r = -0.3856$, $p = 0.0033$).

Figura 18. Clearance de ácido úrico (dL/h) após 8 (A) e 24 (C) semanas de estudo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $N = 5$ a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo controle não diabético. Em C é demonstrada correlação de Pearson entre pAMPK renal e clearance de ácido úrico. Foram incluídos dados dos estudos de curta e longa duração. $N = 45$.

Tabela 6. Níveis de ácido úrico no plasma (mg/dL) e urina (mg/24h) nos estudos de curta (8 semanas) e longa duração (24 semanas). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle não diabético.

Grupos		Ácido Úrico no Plasma (mg/dL)			Ácido Úrico na Urina (mg/24h)		
Curta duração	ND8	0.779	$\pm$	0.083	2.430	$\pm$	0.179
	D8	1.899*	$\pm$	0.282	1.153*	$\pm$	0.230
	D4INS	1.232	$\pm$	0.165	1.348*	$\pm$	0.250
	D4MET	1.544*	$\pm$	0.136	1.120*	$\pm$	0.404
		$p = 0.0024$			$p = 0.0148$		
Longa duração	ND24	1.567	$\pm$	0.226	3.126	$\pm$	0.127
	D24	3.109*	$\pm$	0.411	1.821*	$\pm$	0.061
	D12INS	3.202*	$\pm$	0.392	2.625	$\pm$	0.261
	D12MET	2.509	$\pm$	0.523	2.437*	$\pm$	0.177
		$p = 0.0399$			$p < 0.0001$		

4.5 AMP, ADP e ATP no tecido renal

O estado energético no tecido renal foi avaliado pela quantificação de AMP, ADP e ATP (Tabela 7). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos no estudo de curta duração. Entretanto, ambos os tratamentos (D12INS, D12MET) levaram a um aumento dos níveis de ADP e AMP, bem como das razões ADP/ATP e AMP/ATP nos animais do estudo de longa duração, o que não justifica os níveis reduzidos de pAMPK.

Tabela 7. Níveis de AMP, ADP, ATP, e razões AMP/ATP e ADP/ATP no tecido renal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média em unidades de pmol/ μ g de proteína. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ e +++ $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.

Grupos		ATP		ADP		AMP		ADP/ATP		AMP/ATP	
8 semanas	ND8	0.22	$\pm$ 0.01	0.10	$\pm$ 0.01	0.03	$\pm$ 0.004	0.46	$\pm$ 0.03	0.14	$\pm$ 0.01
	D8	0.18	$\pm$ 0.03	0.09	$\pm$ 0.01	0.02	$\pm$ 0.002	0.48	$\pm$ 0.02	0.18	$\pm$ 0.06
	D4INS	0.19	$\pm$ 0.01	0.09	$\pm$ 0.008	0.03	$\pm$ 0.005	0.48	$\pm$ 0.03	0.18	$\pm$ 0.03
	D4MET	0.22	$\pm$ 0.01	0.10	$\pm$ 0.007	0.03	$\pm$ 0.004	0.46	$\pm$ 0.03	0.13	$\pm$ 0.02
		$p = 0.3435$		$p = 0.7834$		$p = 0.5051$		$p = 0.8953$		$p = 0.5301$	
24 semanas	ND24	0.34	$\pm$ 0.05	0.15	$\pm$ 0.04	0.10	$\pm$ 0.03	0.38	$\pm$ 0.03	0.22	$\pm$ 0.02
	D24	0.38	$\pm$ 0.07	0.16	$\pm$ 0.02	0.09	$\pm$ 0.01	0.48	$\pm$ 0.09	0.25	$\pm$ 0.05
	D12INS	0.45	$\pm$ 0.10	0.36	$\pm$ 0.10	0.60**++	$\pm$ 0.19	0.80***++	$\pm$ 0.06	1.21***+++	$\pm$ 0.16
	D12MET	0.40	$\pm$ 0.09	0.37	$\pm$ 0.06	0.55*+	$\pm$ 0.13	1.00***+++	$\pm$ 0.07	1.39***+++	$\pm$ 0.10
		$p = 0.7890$		$p = 0.0114$		$p = 0.0006$		$p < 0.0001$		$p < 0.0001$	

4.6 Intermediários do ciclo de Krebs

Para avaliar o metabolismo intermediário no rim, piruvato, lactato, malato, succinato, fumarato, glutamina e glutamato foram quantificados (Tabela 8 e Figuras 19A, 19B e 19C). Após 8 semanas de estudo, nenhuma diferença significativa foi observada entre animais controle e diabéticos (Tabela 7, Figura 19A), mas uma tendência ao aumento dos níveis desses metabólitos foi observada após 24 semanas de hiperglicemia (Tabela 8). Entre os metabólitos quantificados, apenas o fumarato foi encontrado em níveis similares entre o grupo diabético e os grupos tratados. Estes níveis foram significativamente maiores do que os do grupo controle não diabético (Tabela 8, Figuras 19B e 19C).

Figura 19. Níveis de fumarato no tecido renal dos animais do estudo de curta duração (A) e longa duração após 12 (B) e 24 (C) semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média da razão de fumarato em cada grupo experimental versus o respectivo controle não diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0,01$ em relação ao respectivo controle diabético.

Tabela 8. Níveis de intermediários do ciclo de ácido tricarboxílico no tecido renal. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média em unidades de pmol/ μ g de proteína. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo não diabético. + $p < 0.05$ e +++ $p < 0.001$ comparado com o respectivo grupo diabético. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração.

Grupos		Piruvato	Lactato	Malato	Succinato	Fumarato	Glutamina	Glutamato
8 semanas	ND8	10.33 $\pm$ 1.26	32.34 $\pm$ 3.37	7.21 $\pm$ 0.55	0.35 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.15	2.17 $\pm$ 0.48	2.20 $\pm$ 0.31
	D8	7.86 $\pm$ 0.42	33.61 $\pm$ 3.76	6.35 $\pm$ 0.78	0.72 $\pm$ 0.15	2.52 $\pm$ 0.53	2.97 $\pm$ 0.37	2.29 $\pm$ 0.27
	D4INS	4.11*** ⁺ $\pm$ 0.49	21.10* ⁺ $\pm$ 1.02	4.19*** ⁺ $\pm$ 0.32	0.39 $\pm$ 0.06	1.13 ⁺ $\pm$ 0.25	2.04 $\pm$ 0.26	1.75 $\pm$ 0.15
	D4MET	6.16** $\pm$ 0.55	23.47 $\pm$ 1.40	4.65** $\pm$ 0.25	0.37 $\pm$ 0.11	1.16 ⁺ $\pm$ 0.12	1.94 $\pm$ 0.14	1.59 $\pm$ 0.09
		$p = 0.0003$	$p = 0.0081$	$p = 0.0013$	$p = 0.0646$	$p = 0.0103$	$p = 0.1435$	$p = 0.1097$
24 semanas	ND24	15.78 $\pm$ 2.36	60.88 $\pm$ 8.28	12.97 $\pm$ 2.25	3.48 $\pm$ 0.45	7.32 $\pm$ 1.06	2.94 $\pm$ 0.56	1.85 $\pm$ 0.35
	D24	21.34 $\pm$ 1.45	104.14** $\pm$ 9.79	18.59 $\pm$ 2.22	4.03 $\pm$ 0.86	13.19** $\pm$ 1.11	3.38 $\pm$ 0.29	2.11 $\pm$ 0.18
	D12INS	19.40 $\pm$ 1.99	47.82*** $\pm$ 7.09	10.36 ⁺ $\pm$ 1.78	1.46 ⁺ $\pm$ 0.27	11.86* $\pm$ 1.46	2.22 $\pm$ 0.33	1.39 $\pm$ 0.20
	D12MET	25.12* $\pm$ 2.13	66.71 ⁺ $\pm$ 8.51	15.46 $\pm$ 1.72	2.71 $\pm$ 0.44	11.88* $\pm$ 0.41	3.82 $\pm$ 0.37	2.37 $\pm$ 0.22
		$p = 0.0328$	$p = 0.0004$	$p = 0.0491$	$p = 0.0298$	$p = 0.0029$	$p = 0.0662$	$p = 0.0709$

4.7 Expressão de PGC-1 α , metilação e hidroximetilação do mtDNA

Considerando que a redução persistente de pAMPK poderia afetar a biogênese e atividade mitocondrial (DUGAN et al., 2013), nós avaliamos, além do metabolismo intermediário, a expressão de PGC-1 α . Os níveis renais de PGC-1 α não mudaram entre os grupos do estudo de curta duração (Figura 20A), ao passo que no estudo de longa duração, a expressão reduzida de PGC-1 α observada após 24 semanas de hiperglicemia não foi normalizada pelo tratamento de insulina associada à metformina. Animais tratados apenas com insulina ainda apresentaram expressão levemente reduzida de PGC-1 α , embora não tenha sido observada diferença significativa em relação aos grupos controle e diabético (Figuras 20B e 20C).

Figura 20. Níveis proteicos de PGC-1 α quantificados por *western blot* e expressos em unidades arbitrárias após correção pelo nível de β -actina como controle endógeno. São demonstrados os resultados após 8 (A), 12 (B) e 24 (C) semanas de estudo, com imagens representativas das bandas obtidas em cada um dos períodos estudados. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle não diabético.

A atividade de PGC-1 α já foi relacionada com a expressão da isoforma mitocondrial da DNA metiltransferase 1 (mtDNMT1) (SHOCK et al., 2011). Então, nós avaliamos os níveis de 5-mC e 5-hmC no mtDNA. Apesar de nenhuma diferença significativa ter sido observada entre os grupos experimentais do estudo de curta duração (Figuras 21A e 21D), níveis reduzidos de 5-hmC (mas não de 5-mC) foram observados após 12 semanas de hiperglicemia (Figuras 21B e 21E), e os níveis de

ambas 5-mC e 5-hmC foram reduzidos em mtDNA de animais diabéticos e animais diabéticos tratados no estudo de longa duração (Figuras 21C e 21F). A redução persistente da expressão de PGC-1 α , concomitante com o acúmulo de fumarato e redução dos níveis de marcas epigenéticas no mtDNA, somente após o controle glicêmico tardio, sugerem que alterações na função mitocondrial durante o curso do diabetes atuam como fatores que contribuem para a memória metabólica.

Figura 21. Níveis de 5-mC e 5-hmC (%) em DNA mitocondrial de rim dos animais do estudo de curta duração (A e D) e longa duração após 12 (B e E) e 24 (C e F) semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. N = 5 a 6 animais por grupo no estudo de curta duração e 6 a 10 animais por grupo no estudo de longa duração. *p<0.05 e **p<0.01 comparado com o respectivo grupo não diabético.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O controle precoce e estrito da glicemia em indivíduos diabéticos é de extrema importância para a redução da progressão de doença renal crônica (BIANCHI; MICCOLI; DEL PRATO, 2013). Surpreendentemente, a reversão da doença renal crônica foi observada 10 anos, mas não 5 anos após o transplante de pâncreas em 8 pacientes com diabetes tipo 1 apresentando nefropatia diabética em estágio moderado a avançado no momento do transplante (FIORETTO; BARZON, MAUER, 2014). Apesar da clara possibilidade de reversão da nefropatia diabética após a recuperação da normoglicemia, os estudos também demonstram uma demora considerável entre esses eventos (FIORETTO; BARZON, MAUER, 2014), o que mostra que alterações bioquímicas que ocorrem no rim ao longo de um período de descontrole glicêmico não são prontamente revertidas após o gerenciamento estrito da glicemia.

Diferentes componentes moleculares e mecanismos têm sido propostos para explicar a memória metabólica que ocorre nas células renais após exposição à hiperglicemia. Estresse oxidativo persistente (KOWLURU; ABBAS; ODENBACH, 2004), acúmulo de membrana basal glomerular (GOTZSCHE; GUNDERSEN; OSTERBY, 1981), expressão de proteínas da matriz extracelular (CAGLIERO et al., 1988; ROY et al., 1990), e atividade aumentada da MAPK p38 (FANG et al., 2012) foram confirmados após a normalização dos níveis de glicose em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, mecanismos epigenéticos operando na patogênese da doença renal crônica são enfatizados como eventos-chave que levam à memória metabólica, particularmente devido à sua persistência em longo prazo (KATO; NATARAJAN, 2014). De fato, além de estresse oxidativo (IHNAAT et al., 2007; SCHISANO et al., 2011), alterações epigenéticas regulando a expressão de genes pró-inflamatórios têm sido mostradas persistir em células endoteliais vasculares em diversos modelos experimentais de memória hiperglicêmica (BRASACCHIO et al., 2009; EL-OSTA et al., 2008; OKABE et al., 2012; VILLENEUVE et al., 2008).

Partindo do pressuposto de que o estresse oxidativo poderia ser um dos mecanismos envolvidos na memória metabólica, nós avaliamos os níveis de malonaldeído, 8-oxodG e expressão de SOD2 em nossos modelos experimentais. Os níveis aumentados de malonaldeído nos animais diabéticos (Figuras 8A a 8C) são condizentes com outros trabalhos já publicados (FAURE et al., 1993; ZHANG; TAN,

2000; VANTYGHM et al., 2000; KARABAS et al., 2013), inclusive no âmbito da nefropatia diabética (ELBE et al., 2014; MORSY et al., 2014). De modo semelhante, diversos trabalhos já reportaram a quantificação de 8-oxodG em indivíduos diabéticos, tanto em modelos experimentais de complicações do diabetes (FIORDALISO et al., 2006; KOWLURU; ABBAS; ODENBACH, 2004; KUZUMOTO et al., 2006) quanto em amostras de pacientes (HINOKIO et al., 2002; SAKURABA et al., 2002; WAKABAYASHI et al., 2010; WU et al., 2004; XU et al., 2004). A análise de 8-oxodG em urina de indivíduos diabéticos tem mostrado que esses pacientes apresentam excreção aumentada desse aduto em relação a indivíduos não diabéticos, e que os níveis são ainda maiores em pacientes diabéticos com complicações (BROEDBAEK et al., 2011). Os dados de 8-oxodG urinário encontrados no presente trabalho são condizentes com essa observação (Figuras 9A, 9B e 10A a 10E).

No contexto da nefropatia diabética, Ha e colaboradores (1994) encontraram níveis aumentados de 8-oxodG em DNA do córtex e da papila renal de ratos após 4 semanas de diabetes induzida por estreptozotocina. Park e colaboradores (2001) também reportaram um aumento nos níveis de 8-oxodG em DNA de rim de ratos após 4 semanas de diabetes, sendo que esses níveis foram reduzidos quando do tratamento dos animais com insulina associada a antioxidantes. Em ambos os estudos, a quantificação de 8-oxodG foi feita por HPLC com detecção por eletroquímico, sendo que no primeiro caso os níveis reportados estavam entre 3,4 e 20 8-oxodG/ 10^5 dG, o que significa um nível significativamente mais alto que os níveis encontrados no nosso estudo. Em contraste a esses trabalhos, nossos dados não mostraram aumento significativo de 8-oxodG no DNA nuclear de animais diabéticos em relação aos controles em nenhum dos períodos estudados (Figuras 11A a 11C).

É importante considerar que nós optamos por empregar um método para extração de DNA das frações nuclear e mitocondrial, separadamente. Isso se justifica pelo interesse em verificar o grau de oxidação do DNA mitocondrial nos animais diabéticos, dadas a maior suscetibilidade do DNA mitocondrial às espécies reativas de oxigênio geradas localmente; a maior probabilidade da ocorrência de mutações em regiões codificantes, em virtude da alta densidade gênica do DNA mitocondrial; e a provável relevância da disfunção mitocondrial para o desenvolvimento de complicações do diabetes (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014; RICHTER; PARK; AMES, 1988; SMITH; COVINGTON; SCHNELLNEMANN, 2012).

De fato, foi possível notar um aumento nos níveis de 8-oxodG em DNA mitocondrial de ratos diabéticos em relação ao controle após 8 semanas de estudo (Figura 11D), embora no estudo de longa duração essa alteração tenha sido observada apenas nos animais diabéticos que receberam tratamento com insulina associada à metformina (Figura 11F). Resultado semelhante foi descrito por Kakimoto e colaboradores (2002), que observaram aumento significativo de 8-oxodG em DNA mitocondrial, mas não em DNA nuclear, de córtex e papila renais de ratos após 8 semanas de diabetes induzida por estreptozotocina. Paralelamente, os autores também observaram aumento da frequência de uma deleção no DNA mitocondrial desses animais. O tratamento com insulina normalizou rapidamente os níveis desse produto de oxidação do DNA mitocondrial.

Os níveis de 8-oxodG no DNA mitocondrial encontrados no nosso estudo são pelo menos quarenta vezes superiores aos detectados em DNA nuclear (Figuras 11A a 11F), o que pode ser devido ao fato de a mitocôndria ser um compartimento subcelular muito oxidante, em virtude da sua alta taxa de consumo de oxigênio. Além disso, o fato de, ao contrário do DNA nuclear, o DNA mitocondrial não estar associado a histonas torna-o mais suscetível ao ataque de oxidantes, o que também explicaria os níveis maiores dessa lesão no DNA. Richter e colaboradores (1988) publicaram o primeiro estudo comparando os níveis de 8-oxodG em DNA nuclear e mitocondrial de fígado de ratos e encontraram cerca de dezesseis vezes mais adutos no DNA mitocondrial em relação ao DNA nuclear. Outros trabalhos também reportaram níveis de 8-oxodG até 23 vezes maiores no DNA mitocondrial quando comparados ao DNA nuclear em diferentes tecidos (HAMILTON et al., 2001; ZASTAWNY et al., 1998).

A observação de um aumento nos níveis de 8-oxodG em mtDNA apenas após 8, mas não em 12 e 24 semanas de diabetes, concomitante com o aumento progressivo da excreção desse aduto na urina ao longo dos períodos estudados, pode ser um indicativo da ocorrência de reparo da lesão ou de degradação do mtDNA. O principal mecanismo de remoção da 8-oxodG é o reparo por excisão de bases (*base excision repair* – BER), que neste caso, resultaria no aparecimento de 8-oxoguanina, e não 8-oxodG, em fluidos biológicos como a urina (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014). A detecção de 8-oxodG na urina pode ser uma consequência da ocorrência de reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER) (LUNEC et al., 2002). Apesar de parecer ter uma função menos expressiva na remoção de produtos de oxidação do DNA, o reparo por excisão de nucleotídeos já foi descrito na remoção de 8-

oxodG (COOKE et al., 2001; REARDON et al., 1997). Outra possível explicação para a detecção de 8-oxodG na urina seria a degradação seletiva de moléculas de mtDNA altamente danificadas (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014). Independente do mecanismo envolvido, os dados sugerem que essa modificação do DNA ocorre em estágios precoces de diabetes e é prontamente recuperada após o controle da glicemia.

Em se tratando da quantificação de CEdG, nenhuma alteração nos níveis dessa lesão foi observada em DNA nuclear ou mitocondrial em nenhum dos períodos estudados (Figuras 12A a 12F). Essa lesão, avaliada por imunoensaio, foi encontrada aumentada em células epiteliais, endoteliais e mesangiais glomerulares de pacientes com nefropatia diabética comparados a pacientes saudáveis (LI et al., 2006). Também já foram reportados níveis aumentados de CEdG em urina de ratos diabéticos e em plasma de pacientes com diabetes tipo 2 em relação a indivíduos não diabéticos (SYNOLD et al., 2008; WARIS et al., 2015). Nossos dados mostraram que após 8 semanas de diabetes já havia um aumento significativo da excreção de CEdG na urina, que se tornou ainda mais acentuado após 12 e 18 semanas de estudo, o que sugere a ocorrência do reparo dessa lesão do DNA e pode explicar o fato de não terem sido encontradas diferenças significativas nas análises realizadas em DNA nuclear e mitocondrial. Uma vez que NER parece ser o mecanismo primário de reparo de CEdG, isso justificaria a sua detecção em urina (TAMAE et al., 2011).

Considerando o papel de alterações mitocondriais no desenvolvimento de complicações do diabetes (BROWNLEE, 2001; CERIELLO; IHNAT; THORPE, 2009), nós avaliamos a expressão de SOD2 como forma de investigar um possível desequilíbrio desse mecanismo de defesa antioxidante mitocondrial. SOD2 é a isoforma mitocondrial da superóxido dismutase que, assim como as isoformas 1 e 3 (citoplasmática e extracelular, respectivamente), catalisa a dismutação do ânion radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (FARACI; DIDION, 2004; FRIDOVICH, 1997). Estudos em pacientes com nefropatia diabética mostram redução na atividade da SOD em células de sangue periférico desses indivíduos quando comparados a pacientes diabéticos sem complicações (BHATIA et al., 2003; KEDZIORA-KORNATOWSKA et al., 1998). Além disso, outros estudos de genotipagem apontam polimorfismos na SOD1 e SOD2 como fatores de risco para o desenvolvimento de nefropatia diabética (LEE et al., 2006; MOHAMMEDI et al., 2014; MÖLLSTEN et al., 2007).

No nosso estudo não foi observada alteração na expressão de SOD2 em nenhum dos períodos estudados (Figuras 13A a 13C). Resultado semelhante foi reportado por Fujita e colaboradores (2009). Ao avaliarem a expressão das 3 isoformas da SOD em dois modelos experimentais de nefropatia diabética, os autores observaram redução na expressão de SOD1 e SOD3 no modelo de nefropatia progressiva, mas nenhuma alteração na expressão de SOD2. Nesse mesmo modelo foi observada também redução da atividade da SOD e melhora das alterações renais quando do tratamento com tempol, um mimético da atividade da SOD. Munusamy e MacMillan-Crow (2009) também não observaram alteração na atividade de SOD2 em células tubulares renais expostas a alta concentração de glicose *in vitro*, nem em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, apesar de outras evidências de disfunção mitocondrial terem sido descritas nesses modelos. Esse resultado também é condizente com a observação de Dugan e colaboradores (2013) que, ao avaliar a produção de ânion radical superóxido em tempo real no rim de camundongos diabéticos, detectaram uma redução na produção dessa espécie reativa em relação a animais não diabéticos. Os autores confirmaram essa observação posteriormente em experimentos *ex vivo*.

A constatação de uma redução na produção de superóxido e supressão na atividade mitocondrial no rim de animais diabéticos (DUGAN et al., 2013) contraria a teoria que implica a superprodução mitocondrial de superóxido como base do desenvolvimento de complicações do diabetes (BROWNLEE, 2001). De modo semelhante, em nosso modelo experimental, nós observamos que o controle glicêmico iniciado após 4 ou 12 semanas de diabetes é capaz de reverter o dano em biomoléculas relacionado ao estresse oxidativo, o que a princípio contraria a ideia de que o estresse oxidativo seria um dos mecanismos chave envolvidos na memória hiperglicêmica (CERIELLO; IHNAT; THORPE, 2009; KOWLURU, 2003). Em contrapartida, não se pode desconsiderar a possibilidade de que um desequilíbrio sutil do estado redox, diferente do que é observado pelo dano direto em biomoléculas, possa participar da desregulação persistente de vias importantes para o desenvolvimento de complicações do diabetes no contexto da memória metabólica (IHNAT et al., 2007; KOWULURU; ABBAS; ODENBACH, 2004), uma vez que, sabidamente, espécies reativas de oxigênio também atuam como moduladores de diversas vias de sinalização (ALLEN; TRESINI, 2000; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007).

Nós passamos então a investigar se componentes sequenciais de uma via fibrogênica implicada no desenvolvimento de doença renal crônica estariam envolvidos

com a memória hiperglicêmica, o que ainda não havia sido descrito na literatura. Nós identificamos uma via que é gradualmente alterada no rim de ratos diabéticos após a normalização da glicemia e que depende do período prévio de hiperglicemia ao qual o animal foi submetido.

Inicialmente nós observamos que um período de quatro semanas de hiperglicemia é suficientemente longo para iniciar a memória metabólica da expressão reduzida de pAMPK no rim, que não retornou ao nível basal após 4 semanas de controle glicêmico. O mesmo achado foi observado em animais que permaneceram 12 semanas hiperglicêmicos seguidas de 12 semanas de controle glicêmico (Figuras 14A e 14C). Apesar de ser bem conhecido que a hiperglicemia leva à redução da expressão de pAMPK (DUGAN et al., 2013), esse estudo provê a primeira linha de evidência demonstrando que o reestabelecimento da normoglicemia não é suficiente para reverter prontamente os níveis renais de pAMPK. Esse efeito da hiperglicemia na redução persistente da atividade da AMPK após o controle glicêmico foi observado previamente somente em células endoteliais capilares de retinas bovinas (BRECs) *in vitro* e retinas de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (ZHENG et al., 2012).

Possíveis moduladores da ativação de AMPK são um aumento da razão AMP/ATP e atividades aumentadas das proteínas quinase hepática B1 (LKB1) e da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (ZHENG et al., 2012). A sirtuína 1 (Sirt-1, desacetilase dependente de NAD^+ da classe III) foi identificada como um regulador positivo da atividade da via LKB1/AMPK em células renais embrionárias 293T e outras células (LAN et al., 2008). A redução da expressão de Sirt-1 em resposta à ativação de poli(ADP-ribose)polimerase (PARP) em BRECs e células de retina de ratos expostos à alta concentração de glicose ou estresse oxidativo foi crucial para o entendimento dos altos níveis persistentes de moléculas relacionadas à inflamação (NF- κ B), apoptose (Bax) e respostas a danos (PAR) observados após a restauração dos níveis normais de glicose, que foram efeitos mediados pela atividade persistentemente diminuída da via LKB1/AMPK e geração aumentada de ROS (ZHENG et al., 2012).

Contrariamente, nós observamos aqui que a hiperglicemia não afetou significativamente a atividade renal de Sirt-1 (Figuras 17A, 17B e 17C). Essa observação, entretanto, não elimina a possibilidade de que a atividade de Sirt-1 diminua em alguns tipos celulares específicos, como células epiteliais tubulares proximais e podócitos, um efeito que pode ter sido diluído nos homogenatos de rim utilizados nesse estudo (WAKINO; HASEGAWA; ITOH, 2015). É possível identificar um leve, apesar

de não significativo, declínio da atividade renal de Sirt-1 após 8 semanas de hiperglicemia (Figura 17A). Entretanto, a atividade aumentada de Sirt-1 detectada nos animais diabéticos que receberam tratamento com metformina (Figura 17A) e estresse oxidativo reduzido nos animais diabéticos tratados (Figuras 8, 9 e 10) não foram acompanhados por uma recuperação dos níveis renais de pAMPK. De fato, contrariando o esperado (LEE et al., 2007; LI et al., 2016; SATRIANO et al., 2013; ZHENG et al., 2012; ZHOU et al., 2001), metformina não foi capaz de restaurar os níveis renais de pAMPK.

Metformina atua em parte aumentando a atividade de AMPK (ZHOU et al., 2001). Diferentes mecanismos, incluindo uma inibição moderada do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial seguida de um aumento da razão AMP/ATP, ativação de LKB1 e inibição da AMP deaminase, uma enzima da via de degradação de AMP para ácido úrico, têm sido propostos para explicar esta ativação (BOST et al., 2016; OUYANG; PARAKHIA; OCHS, 2011). Dada a sua polaridade, a metformina entra nas células através de transportadores de cátions orgânicos ligados à membrana (OCT) (HIGGINS; BEDWELL; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2012). As isoformas humanas OCT1 e OCT2 são importantes para a captação hepática e secreção renal de metformina, respectivamente (HIGGINS; BEDWELL; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2012). Ambos, Oct1 e Oct2, são expressos nos rins de roedores (HIGGINS; BEDWELL; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2012), sendo que Oct1 e Oct2 constituem aproximadamente 23% e 75% de todos os Oct em ratos (THOMAS et al., 2004). Tem sido estimado que 76% da captação hepática e 60% da captação renal de metformina são mediadas por Oct1 e Oct1/Oct2, respectivamente, em camundongos (HIGGINS; BEDWELL; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2012). Entretanto, a expressão de Oct na superfície basolateral de túbulos proximais é reduzida no diabetes experimental (THOMAS et al., 2004). De fato, uma redução de aproximadamente 50% da expressão proteica renal de Oct1 e Oct2 foi observada 4 semanas após a indução de diabetes com estreptozotocina em ratos Sprague-Dawley, e essa redução não foi prevenida pela administração de um tratamento com insulina em baixa dose (THOMAS et al., 2004). Em um modelo de diabetes tipo 2 em ratos, a expressão renal de Oct2 também foi reduzida em 50% em relação à observada no rim de ratos controle (NOWICKI et al., 2008). Assim, é provável que a redução precoce da expressão de Oct no rim de ratos diabéticos reduz a captação renal de metformina e a sua capacidade de ativar a AMPK no rim. Doses maiores de metformina do que a utilizada no presente trabalho (100

mg/kd/dia) provavelmente seriam necessárias para alcançar o mesmo efeito na ativação de AMPK renal observado em modelos de injúria renal não diabética em roedores (LI et al., 2016; SATRIANO et al., 2013). Nós não encontramos um estudo que quantificou pAMPK no rim de roedores diabéticos quando metformina foi administrada após pelo menos 4 semanas de hiperglicemia.

Independentemente da hiperglicemia, a hiperuricemia é um fator que também leva a uma redução pronunciada da expressão renal de Oct2 em ratos (HABU et al., 2003). Clearance renal de ácido úrico reduzido com aumento resultante dos níveis de ácido úrico no plasma ou soro tem sido observado em ratos após 3 ou 7 semanas de diabetes induzida por estreptozotocina (MALARDÉ et al., 2015; WANG et al., 2012). Portanto, nós avaliamos os níveis de ácido úrico em plasma e urina (Tabela 6) e observamos que o clearance renal de ácido úrico reduzido nos ratos hiperglicêmicos não foi recuperado nos animais diabéticos tratados em ambos os estudos de curta e longa duração (Figuras 18A, 18B e 18C). Além de ajudar a entender a falta de efeito da metformina nos níveis de pAMPK no rim mesmo após 12 semanas de controle glicêmico, a redução sustentada do clearance de ácido úrico se assemelhou à redução sustentada da expressão renal de pAMPK (Figuras 14A, 14B e 14C). Apesar de nós não podermos estabelecer uma relação causal entre esses eventos, uma boa correlação foi demonstrada (Figura 18C). Pelo menos em fígado de camundongos e em células humanas HepG2, foi demonstrado que a atividade aumentada da AMP desaminase e um consequente aumento na produção de ácido úrico, que são observados no diabetes, mediam a gliconeogênese hepática via redução de pAMPK (CICERCHI et al., 2014).

Um aumento de ácido úrico sérico em pacientes com diabetes tipo 1 foi observado como um preditor independente para o desenvolvimento de nefropatia diabética (HOVIND; ROSSING; TARNOW, 2009) e tem sido indicado como um importante e recente mediador desse processo (HOVIND et al., 2011; JALAL et al., 2011). Hiperuricemia moderada em ratos, correspondendo a um aumento de 1,5 a 2 vezes do ácido úrico induzido pelo ácido oxônico, um inibidor de uricase, causou fibrose intersticial renal após 7 semanas, com depósito de colágeno intersticial e infiltração de macrófagos, mas não depósito de cristais de ácido úrico. A fibrose foi prevenida pela administração de alopurinol concomitante com a dieta contendo ácido oxônico (MAZZALI et al., 2001). O papel da hiperuricemia assintomática na indução de fibrose renal em pacientes com doença renal crônica foi evidenciado pelo aumento de TGF- β 1 urinário após a retirada de alopurinol (TALLAT; EL-SHEIKH, 2007). A

redução persistente do clearance de ácido úrico observada no nosso trabalho em ratos diabéticos sob adequado controle glicêmico é a primeira evidência de que esse efeito pode ser um importante fator na memória metabólica do diabetes, levando ao desenvolvimento de doença renal crônica.

Um papel crucial para a atividade de AMPK de regular a função mitocondrial e o acúmulo de matriz no rim diabético foi demonstrado em diferentes modelos de diabetes (DUGAN et al., 2013). Atividade reduzida de AMPK no rim de camundongos diabéticos (16 semanas de hiperglicemia) foi relacionada com biogênese mitocondrial reduzida, entrada reduzida de piruvato no ciclo de Krebs, e menor geração de radical superóxido mitocondrial concomitante com aumento da expressão glomerular de fibronectina, colágeno tipo IV e TGF- β (DUGAN et al., 2013). Todos esses efeitos deletérios observados nos animais diabéticos foram revertidos pela ativação de AMPK por administração intraperitoneal de 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosida (AICAR) (DUGAN et al., 2013).

Neste estudo, nós observamos que a redução sustentada da expressão renal de pAMPK foi acompanhada por um aumento persistente da expressão proteica de TGF- β no estudo de longa duração, apesar da normalização da expressão gênica de TGF- β 1, do estabelecimento do controle glicêmico e melhora da função renal. Em contraste, a normalização da glicemia no estudo de curta duração reverteu o aumento da expressão proteica de TGF- β induzida pela hiperglicemia (Figuras 16A a 16F). Assim, outros elementos, além da redução da atividade de AMPK, parecem ser necessários para manter a expressão proteica de TGF- β aumentada, conforme considerado a seguir.

O aumento da expressão de TGF- β em condições de alta glicose é bem descrito (HAN et al., 1999; PARK et al., 1997; SHARMA et al., 1996; ZIYADEH et al., 1994). A respeito do seu papel na memória hiperglicêmica, ratos Lewis machos mantidos em estado hiperglicêmico por duas semanas ou 4 meses (aproximadamente 16 semanas) e posteriormente submetidos a um controle glicêmico estrito por meio de transplante de ilhotas pancreáticas (por um período adicional de 12 meses ou 4 meses, respectivamente) exibiram expressão gênica glomerular de TGF- β 1 normal, apesar de um aumento na expressão gênica de TGF- β ter sido observado após 4, 8 ou 12 meses de hiperglicemia. Entretanto, a irreversibilidade foi alcançada pelo transplante de ilhotas após 8 meses (aproximadamente 32 semanas) de hiperglicemia, e a expressão gênica glomerular de TGF- β 1 permaneceu aumentada até o final do estudo (12 meses após o início do diabetes), acompanhada de aumento da expressão gênica de fibronectina e

colágeno tipo IV, albuminúria, proteinúria e expansão mesangial (PUGLIESE et al., 1997). Os pesquisadores não avaliaram a expressão proteica de TGF- β .

Em experimentos *in vitro* com células epiteliais tubulares proximais humanas foi verificado que um curto período de exposição à alta concentração de glicose estimula a transcrição de TGF- β 1, mas o mRNA é pobremente traduzido (FRASER; WAKEFIELD; PHILLIPS, 2002). O estímulo subsequente das células com fator de crescimento derivado de plaquetas, uma citocina derivada de macrófagos (FRASER; WAKEFIELD; PHILLIPS, 2002), ou interleucina-1 β (PHILLIPS et al., 1996) estabilizou o mRNA do TGF- β 1 e sinergisticamente aumentou a sua eficiência traducional, levando à síntese *de novo* sustentada da proteína TGF- β 1 (FRASER; WAKEFIELD; PHILLIPS, 2002; PHILLIPS et al., 1996). Uma possível explicação para esse efeito é que a glicose prima o rim para a síntese proteica de TGF- β 1 por um estímulo externo (FRASER; WAKEFIELD; PHILLIPS, 2002). A infiltração renal de macrófagos é um evento precoce em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (SASSY-PRIGENT et al., 2000) e foi demonstrada em pacientes com diabetes tipo 2 (FURUTA et al., 1993). A hiperuricemia parece contribuir para a inflamação no rim mediada pela NLRP3 (*NOD-like receptor protein 3*) do inflamassoma, resultando na expressão aumentada de interleucina-1 β e interleucina 18 em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (WANG et al., 2012). Agentes redutores de urato, como alopurinol e quercetina, suprimem a ativação do inflamassoma NLRP3 renal, aumentando a proteção de ratos diabéticos contra a injúria renal (WANG et al., 2012). Portanto, nós sugerimos que a hiperuricemia persistente observada neste estudo pode desempenhar um papel na elevação persistente da expressão proteica de TGF- β nos rins dos animais diabéticos tratados no período de longa duração.

Uma vez que a atividade reduzida de AMPK no rim é associada com redução da biogênese e função mitocondrial (DUGAN et al, 2013), nós avaliamos se a expressão de PGC-1 α , marcas epigenéticas (5-mC e 5-hmC) no mtDNA e alguns metabólitos intermediários (piruvato, lactato, malato, succinato, fumarato, glutamina e glutamato) são persistentemente alterados no rim de ratos diabéticos tratados. Como observado para a expressão proteica de TGF- β , alterações persistentes ocorreram somente após o controle glicêmico tardio (Figuras 19 a 21 e Tabela 8).

PGC-1 α é um coativador da família de fatores de transcrição FoxO (*forkhead box O*), atuando com um regulador do metabolismo oxidativo e biogênese mitocondrial (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2006). A atividade de PGC-1 α também tem sido

correlacionada com a expressão de uma isoforma mitocondrial da DNA metiltransferase 1 (mtDNMT1) (SHOCK et al., 2011). No presente estudo, nós observamos uma redução persistente da expressão renal de PGC-1 α concomitante com uma redução persistente de 5-mC no mtDNA após o controle glicêmico tardio (Figuras 20 e 21A a 21C).

A metilação do mtDNA ainda é pouco compreendida, e níveis de 5-mC no mtDNA na faixa de 2 a 5% têm sido reportados em fibroblastos humanos e de roedores (POLLACK et al., 1984; REIS; GOLDSTEIN, 1983). Shock e colaboradores (2011) mostraram que a mtDNMT1 se transloca para a mitocôndria, se liga ao mtDNA de maneira proporcional à densidade de dinucleotídeos CpG, e regula a expressão gênica mitocondrial. Hipermetilação do mtDNA foi observada em células endoteliais de retina expostas à alta concentração de glicose e em microvasculatura de retina de doadores humanos com retinopatia diabética (MISHRA; KOWLURU, 2015). Por outro lado, hipometilação do mtDNA no fígado de ratos alimentados com alta quantidade de frutose foi proposta como um novo mecanismo envolvido no desenvolvimento de síndrome metabólica (YAMAZAKI et al., 2016). Neste trabalho, nós avaliamos o conteúdo global de 5-mC em mtDNA de rim, e esse parece ser o primeiro dado de metilação do mtDNA em rim diabético disponível na literatura.

A hidroximetilação do DNA mitocondrial (5-hmC) foi descrita pela primeira vez por Shock e colaboradores (2011), e a sua função no genoma mitocondrial ainda não é clara. Uma via proposta para a hidroximetilação do mtDNA é a adição direta de grupos 5-hidroximetil a resíduos de citosina, catalisada pela mtDNMT1 (LIUTKEVICIUTE et al., 2009; SHOCK et al., 2011). Nesse caso, nossa observação de uma redução persistente de 5-hmC no mtDNA (Figuras 21D a 21F) poderia ser também devida à redução da expressão de PGC-1 α . Yamazaki e colaboradores (2016) reportaram níveis reduzidos de 5-hmC mitocondrial em ratos alimentados com alta quantidade de frutose em relação a ratos controle. A investigação das implicações de níveis reduzidos de 5-mC e 5-hmC no mtDNA para o desenvolvimento de doença renal crônica é importante em estudos futuros.

Entre os metabólitos intermediários analisados, o fumarato foi notado como o único a se manter aumentado em ratos diabéticos não tratados e tratados após 12 semanas (Figuras 19A a 19C e Tabela 8). Durante o período de insuficiência da insulina, um aumento no catabolismo de aminoácidos, bem como atividade aumentada do ciclo da ureia no fígado, e rápido consumo de arginina é esperado. O rim desempenha um papel na síntese de arginina a partir da citrulina para manter o *pool*

corpóreo de arginina para funções não relacionadas ao ciclo da ureia. A via de síntese consome ATP e aspartato e libera pirofosfato inorgânico, AMP e fumarato (WATFORD et al., 2003); portanto, esta via é uma possível fonte de altos níveis de fumarato observados nos animais hiperglicêmicos. O controle glicêmico precoce, mas não tardio, aparentemente restaurou o metabolismo normal. De acordo com dados recentes (EID et al., 2010; PAPADIMITRIOU et al., 2014; YOU et al., 2016), a via compreendendo alta glicose → atividade de AMPK diminuída → Nox4 aumentada → atividade da fumarato hidratase reduzida → níveis aumentados de fumarato → expressão aumentada de TGF- β desempenha um papel importante no desenvolvimento de doença renal diabética. Nós observamos que componentes dessa via (atividade reduzida de AMPK, níveis aumentados de fumarato e expressão aumentada de TGF- β) constituem parte da memória metabólica do diabetes. As alterações observadas foram agrupadas em uma via mostrada na Figura 22.

Figura 22. A hiperglicemia ativa uma via fibrogênica no rim que permanece alterada após a recuperação da glicemia normal, dependendo do período prévio de hiperglicemia vivenciado pelo animal. Os componentes coloridos na imagem foram quantificados nesse estudo e permaneceram alterados após o controle glicêmico tardio, indicando que eles participam da memória metabólica no rim diabético. O aumento persistente do ácido úrico plasmático pode alimentar as alterações bioquímicas renais prolongadas, observadas após o controle glicêmico. A demonstração desse desarranjo metabólico sustentado pode ajudar a esclarecer o longo intervalo requerido entre o estabelecimento do controle glicêmico em indivíduos diabéticos e a redução do risco de desenvolvimento de doença renal crônica.

Conclusão e Perspectivas

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente estudo mostrou que alguns marcadores de estresse oxidativo em biomoléculas são aumentados em animais diabéticos, mas normalizados após o controle da glicemia. Um período curto de hiperglicemia (4 semanas) induziu redução persistente do clearance de ácido úrico e dos níveis renais de pAMPK após as 4 semanas subsequentes de controle glicêmico. Os ratos submetidos a um período mais longo de hiperglicemia desenvolveram mais alterações metabólicas no rim que não foram revertidas nas 12 semanas seguintes de controle glicêmico, como acúmulo de fumarato, expressão proteica aumentada de TGF- β , redução da expressão de PGC-1 α , e redução da metilação e hidroximetilação do mtDNA, e esses efeitos foram concomitantes com a redução sustentada do clearance de ácido úrico e dos níveis de pAMPK, o que sugere que esses componentes participam da memória metabólica no rim diabético.

Uma vez que a hiperuricemia é um fator de risco independente para o desenvolvimento de nefropatia diabética (HOVIND; ROSSING; TARNOW, 2009; HOVIND et al., 2011; JALAL et al., 2011; MAZZALI et al., 2001; TALLAT; EL-SHEIKH, 2007; ZOPPINI et al., 2012) a redução sustentada do clearance de ácido úrico no diabetes tratado, pode alimentar alterações bioquímicas renais prolongadas observadas após o controle glicêmico ter sido alcançado. Estudos intervencionais posteriores para avaliar o papel do excesso de ácido úrico plasmático em sustentar as alterações bioquímicas observadas no rim diabético no presente estudo utilizando, por exemplo, alopurinol, são necessários. Outra questão levantada pelos achados observados neste trabalho é a possível interação entre a hiperglicemia e o clearance reduzido de ácido úrico na indução de alterações metabólicas que levam a complicações do diabetes, o que poderia aumentar o risco de complicações em indivíduos com controle glicêmico inadequado. O monitoramento dos níveis de ácido úrico em estudos clínicos objetivando avaliar o risco de complicações em diferentes alvos de controle glicêmico pode ajudar a entender algumas lacunas no fenômeno da memória metabólica.

Referências

REFERÊNCIAS

AHMED, M. U.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Identification of N^{ϵ} carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 4889-4894, 1986.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. G. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, p. 539-553, 1998.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 463-499, 2000.

ALVAREZ, M. L.; DISTEFANO, J. K. Towards microRNAs-based therapeutics for diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 56, p. 444-456, 2013.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, p. 350-355, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2013. **Diabetes Care**, v. 36, p. S11-S66, 2013.

ANDERSON, S. et al. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 612-619, 1985.

BARRES, R.; ZIERATH, J. R. DNA methylation in metabolic disorders. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 897S-900S, 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanisms, and function. **Cell**, v. 116, p. 281-297, 2004.

BELL, C. G. et al. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. **BMC medical genomics**, v. 3, p. 33, 2010.

BHATIA, S. et al. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 557–562, 2003.

BIANCHI, C.; MICCOLI, R.; DEL PRATO, S. Hyperglycemia and vascular metabolic memory: Truth or fiction? **Current Diabetes Reports**, v. 13, p. 403–410, 2013.

BIANCHINI, F. et al. Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 885–890, 2001.

BICHU, P. et al. Angiotensin receptor blockers for the reduction of proteinuria in diabetic patients with overt proteinuria: results from the AMADEO study. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 129–140, 2009.

BIEMEL, K. M. et al. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 23405–23412, 2001.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, p. 396–398, 2007.

BISWAS, S.K. et al. Hypertension increases pro-oxidant generation and decreases antioxidant defense in the kidney in early diabetes. **American Journal of Nephrology**, v. 28, p. 133–142, 2008.

BJORCK, S. et al. Renal protective effect of enalapril in diabetic nephropathy. **British Medical Journal**, v. 304, p. 339–343, 1992.

BOLTON, W. K. et al. Randomized Trial of an Inhibitor of Formation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. **American Journal of Nephrology**, v. 24, p. 32–40, 2004.

BOST, F. et al. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? **Oncogenesis**, v. 4, p. e188, 2016.

BRASACCHIO, D. et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. **Diabetes**, v. 58, p. 1229–1236, 2009.

BRENNER, B. M. et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 861-869, 2001.

BROEDBAEK, K et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1473-1479, 2011.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. Nonenzymatic Glycosylation and the Pathogenesis of Diabetic Complications. **Annals of Internal Medicine**, v. 101, p. 527-537, 1984.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of Diabetic Complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, p. 1075-1083, 2008.

CAGLIERO, E. et al. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, p. 735–738, 1988.

CERIELLO, A. et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. **Diabetes**, v. 49, p. 2170-2177, 2000.

CERIELLO, A.; IHNAT, M. A.; THORPE, J. E. The “Metabolic Memory”: Is More Than Just Tight Glucose Control Necessary to Prevent Diabetic Complications? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, p. 410-415, 2009.

CHEN, Y. et al. Sp1 Sites Mediate Activation of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter by Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 8225-8231, 1998.

CICERCHI, C. et al. Uric acid-dependent inhibition of AMP kinase induces hepatic glucose production in diabetes and starvation: Evolutionary implications of the uricase loss in hominids. **FASEB Journal**, v. 28, p. 3339–3350, 2014.

COOKE, M. S. et al. Monoclonal antibody to single-stranded DNA: A potential tool for DNA repair studies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, p. 232-238, 2001.

COOPER, M. E.; EL-OSTA, A. Epigenetic mechanisms and implications for diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, p. 1403-1413, 2010.

D’AGATI, V. et al. RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: Roles in podocytes and endothelial cells. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, p. 50-56, 2009.

DANIEL, C. et al. Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF- β in experimental diabetic nephropathy in vivo. **Diabetes**, v. 56, p. 2982-2989, 2007.

D’AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 813-824, 2007.

DCCT - THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 977–986, 1993.

DCCT - THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, p. 1307-1316, 2009.

DE VRIESSE, A. S. et al. Diabetes-induced microvascular dysfunction in the hydronephrotic kidney: role of nitric oxide. **Kidney International**, v. 60, p. 202-210, 2001.

DERUBERTIS, F. R.; CRAVEN, P. A. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. **Diabetes**, v. 43, p. 1-8, 1994.

DESHPANDE, S.D. et al. Transforming growth factor- β -induced cross talk between p53 and microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 62, p. 3151-3162, 2013.

DREL, V. R. et al. Aldose reductase inhibition counteracts nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic rat kidney and high-glucose-exposed human mesangial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 1454-1465, 2006.

DUGAN, L. L. et al. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 4888-4899, 2013.

DU, X. L. et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 12222-12226, 2000.

DU, X. L. et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1341-1348, 2001.

DU, X. L. et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1049-1057, 2003.

EDIC - WRITING TEAM FOR THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. **The Journal of American Medical Association**, v. 287, p. 2563–2569, 2002.

EDIC - WRITING TEAM FOR THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. **The Journal of American Medical Association**, v. 290, p. 2159–2167, 2003.

EID, A. A. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 37503–37512, 2010.

ELBE, H. et al. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 34, p. 100–113, 2014.

ELMARAKBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, p. 49–59, 2012.

EL-OSTA, A. et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 2409–2417, 2008.

ENGERMAN, R. L.; KERN, T. S. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. **Diabetes**, v. 36, p. 808–812, 1987.

FANG, D. et al. Early intensive insulin therapy attenuates p38 pathway in the renal cortex and indices of nephropathy in diabetic rats. **Endocrine Journal**, v. 59, p. 81–90, 2012.

FARACI, F. M.; DIDION, S. P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 1367–1373, 2004.

FAURE, P. et al. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy, **Clinical Chemistry**, v. 39, p. 789–793, 1993.

FIORDALISO, F. et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 37, p. 959-968, 2004.

FIORETTO, P.; BARZON, I.; MAUER, M. Is diabetic nephropathy reversible? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 104, p. 323–328, 2014.

FRANKEN, A. A. et al. High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, p. 1008-1015, 1990.

FRASER, D.; WAKEFIELD, L.; PHILLIPS, A. Independent regulation of transforming growth factor- β 1 transcription and translation by glucose and platelet-derived growth factor. **American Journal of Pathology**, v. 161, p. 1039–1049, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 18515–18517, 1997.

FUJITA, H. et al. Reduction of Renal Superoxide Dismutase in Progressive Diabetic Nephropathy. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 20, p. 1303-1313, 2009.

FU, M. et al. The advanced glycation end product, N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9982-9986, 1996.

FURUTA, T. et al. The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 21, p. 480–485, 1993.

GABBAY, K. H.; MEROLA, L. O.; FIELD, R. A. Sorbitol pathway: Presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. **Science**, v. 151, p. 209-210, 1966.

GALLO, M.A. History and scope of toxicology. In: Klaassen, C.D. (Ed). **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 8th ed. New York: Mc Graw Hill, 2013. 3-11 p.

GARUD, M. S.; KULKARNI, Y. A. Hyperglycemia to Nephropathy *via* Transforming Growth Factor Beta. **Current Diabetes Reviews**, v. 10, p. 182-189, 2014.

GIACCO, F.; BROWNLIE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 29, p. 1058-1070, 2010.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v. 19, p. 257-267, 1996.

GOTZSCHE, O.; GUNDERSEN, H. J. G.; OSTERBY, R. Irreversibility of glomerular basement membrane accumulation despite reversibility of renal hypertrophy with islet transplantation in early experimental diabetes. **Diabetes**, v. 30, p. 481–485, 1981.

GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, p. 164-176, 2005.

GUIJARRO, C.; EGIDO, J. Transcription factor-kB (NF-kB) and renal disease. **Kidney International**, v. 59, p. 415-424, 2001.

HABU, Y. et al. Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: Roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1107–1114, 2003.

HA, H. et al. DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, p. 271-274, 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., **Free radicals in Biology and Medicine**, 4th ed. New York: Oxford, 2007.

HAMILTON, M. L. et al. A reliable assessment of 8-oxo-2- deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2117-2126, 2001.

HAMMES, H. et al. Islet Transplantation Inhibits Diabetic Retinopathy in the Sucrose-fed Diabetic Cohen Rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 34, p. 2092-2096, 1993.

HAN, D. C. et al. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF-beta. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, p. 1891–1899, 1999.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 728–735, 2006.

HANEDA, M. et al. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. **Diabetes**, v. 46, p. 847-853, 1997.

HANEDA, M.; KOYA, D.; KIKKAWA, R. Cellular mechanisms in the development and progression of diabetic nephropathy: activation of the DAG-PKC-ERK pathway. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 38, p. S178-S181, 2001.

HIGGINS, J. W.; BEDWELL, D. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. Ablation of both organic cation transporter (oct)1 and oct2 alters metformin pharmacokinetics but has no effect on tissue drug exposure and pharmacodynamics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, p. 1170–1177, 2012.

HINOKIO, Y. et al. Urinary excretion of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 45, p. 877-882, 2002.

HIRST, J. A. et al. The impact of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors on type 1 and type 2 diabetic patients with and without early diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 81, p. 674-683, 2012.

HODGKINSON, A. D. et al. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 846-851, 2003.

HOHENSTEIN, B. et al. Correlation of enhanced thrombospondin-1 expression, TGF- β signalling and proteinuria in human type-2 diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, p. 3880-3887, 2008.

HOLMAN, R. R. et al. 10-Year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, 359, 1565–1576, 2008.

HOSTETTER, T. H. et al. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **American Journal of Physiology**, v. 241, p. F85-F93, 1981.

HOTTA, N. et al. Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1538-1544, 2006.

HOTTA, N. et al. Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on progression of diabetic neuropathy and other microvascular complications: multivariate epidemiological analysis based on patient background factors and severity of diabetic neuropathy. **Diabetic Medicine**, v. 29, p. 1529-1533, 2012.

HOVIND, P. et al. Serum uric acid as a new player in the development of diabetic nephropathy. **Journal of Renal Nutrition**, v. 21, p. 124–127, 2011.

HOVIND, P.; ROSSING, P.; TARNOW, L. Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. **Diabetes** v. 58, p. 2–5, 2009.

IHNAT, M. A. *et al.* Reactive oxygen species mediate a cellular ‘memory’ of high glucose stress signalling. **Diabetologia**, v. 50, p. 1523–1531, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF diabetes atlas, 7^a edição*. Bruxelas: **International Diabetes Federation**, 2015.

JACOBS, A.T.; MARNETT, L.J. The future of Toxicology – Wrap up. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 983-985, 2007.

JALAL, D. I. et al. Uric acid as a mediator of diabetic nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 31, p. 459–465, 2011.

JOHNSON, B. F. et al. Cardiac Abnormalities in Diabetic Patients With Neuropathy. Effects of aldose reductase inhibitor administration. **Diabetes Care**, v. 27, p. 448-454, 2004.

JEPPSSON, J. et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 78-89, 2002.

JUHAN-VAGUE, I.; ALESSI, M. C.; VAGUE, P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. **Diabetologia**, v. 34, p. 457-462, 1991.

KAISER, N. et al. Differential Regulation of Glucose Transport and Transporters by Glucose in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. **Diabetes**, v. 42, p. 80-89, 1993.

KAKIMOTO, M. et al. Accumulation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. **Diabetes**, v. 51, p. 1588-1595, 2002.

KAMIYAMA, M. et al. Oxidative stress/angiotensinogen/renin-angiotensin system axis in patients with diabetic nephropathy. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 23045-23062, 2013.

KANWAR, Y. S. et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 395-423, 2011.

KARABAS, M. K. et al. The effect of pioglitazone on antioxidant levels and renal histopathology in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Endocrinology**, article ID 858690, 2013.

KATO, M.; CASTRO, N. E.; NATARAJAN, R. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 64, p. 85-94, 2013.

KATO, M.; NATARAJAN, R. Diabetic nephropathy – emerging epigenetic mechanisms. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, p.517-530, 2014.

KATO, M. et al. TGF- β activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. **Nature Cell Biology**, v. 11, p. 881-889, 2009.

KATO, M. et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- β -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, v. 104, p. 3432-3437, 2007.

KEDZIORA-KORNATOWSKA, K. Z. et al. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p. 2829–2832, 1998.

KEOGH, R. J.; DUNLOP, M. E.; LARKINS, R. G. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A₂ activation. **Metabolism**, v. 46, p. 41-47, 1997.

KLAHR, S. et al. The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 877-884, 1994.

KOLM-LITTY, V. et al. High Glucose-induced Transforming Growth Factor β 1 Production Is Mediated by the Hexosamine Pathway in Porcine Glomerular Mesangial Cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 160-169, 1998.

KOMERS, R.; ALLEN, T. J.; COOPER, M. E. Role of endothelium-derived nitric oxide in the pathogenesis of renal hemodynamic changes of experimental diabetes. **Diabetes**, v. 43, p. 1190-1197, 1994.

KOMERS, R.; ANDERSON, S. Paradoxes of nitric oxide in diabetic kidney. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 284, p. F1121-F1137, 2003.

KOYA, D. et al. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC β inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. **The FASEB Journal**, v. 14, p. 439-447, 2000.

KOWLURU, R. A.; ABBAS, S. N.; ODENBACH, S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: Effect of reinstitution of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. **Journal of Diabetes Complications**, v. 18, p. 282–288, 2004.

KOWLURU, R. A. Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrative stress in diabetic rats. **Diabetes**, v. 52, p. 818-823, 2003.

KOWLURU, R. A.; CHAKRABARTI, S.; CHEN, S. Re-institution of good metabolic control in diabetic rats and activation of caspase-3 and nuclear transcriptional factor (NF- κ B) in the retina. **Acta Diabetologica**, v. 41, p. 194-199, 2004.

KRAMER, H. J. et al. Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. **The Journal of American Medical Association**, v. 289, p. 3273-3277, 2003.

KUNKEL, H. G.; WALLENIOUS, G. New hemoglobin in normal adult blood. **Science**, v. 122, p. 288, 1955.

KUZUMOTO, Y. et al. Effect of the aldose reductase inhibitor fidarestat on experimental diabetic neuropathy in the rat. **Diabetologia**, v. 49, p. 3085-3093, 2006.

LACHIN, J. M. et al. Effect of Glycemic Exposure on the Risk of Microvascular Complications in the Diabetes Control and Complications Trial—Revisited. **Diabetes**, v. 57, p. 995-1001, 2008.

LAN, F. et al. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1: Possible role in AMP-activated protein kinase activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 27628–27635, 2008.

LEE, A. Y. W.; CHUNG, S. S. M. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 23-30, 1999.

LEE, M. J. et al. A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 292, p. F617–F627, 2007.

LEE, S. J. et al. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with stages of albuminuria in Korean type 2 diabetic patients. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 55, p. 1-7, 2006.

LEWIS, E. J. et al. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1456-1462, 1993.

LIAO, T. D. et al. Role of inflammation in development of renal damage and dysfunction of angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 52, p. 256-263, 2008.

LIEBLER, D. C. The poisons within: Application of toxicity mechanisms to fundamental disease processes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 610-613, 2006.

LI, H. et al. *N*²-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine, a DNA glycation marker, in kidneys and aortas of diabetic and uremic patients. **Kidney International**, v. 69, p. 388-392, 2006.

LI, J. et al. Metformin protects against cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury via AMPK α -regulated autophagy induction. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23975, 2016.

LING, C. et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. **Diabetologia**, v. 51, p. 615-622, 2008.

LIUTKEVICIUTE, Z. et al. Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 400-402, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, p. 777-793, 2002.

LUNEC, J. et al. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 875-885, 2002.

MA, F. Y.; LIU, J.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 29-37, 2009.

MACISAAC, R. J. et al. Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 195-200, 2004.

MACKINNON, M. et al. Combination therapy with angiotensin receptor blocker and an ACE inhibitor in proteinuric renal disease: A systematic review of efficacy and safety data. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 48, p. 8-20, 2006.

MALARDÉ, L. et al. Fermented soy permeate reduces cytokine level and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, p. 67–75, 2015.

MARNETT, L. J.; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 214–221, 2001.

MARRERO, M. B. et al. Angiotensin II-Induced Signaling Pathways in Diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 1, p. 197-202, 2005.

MASSY, Z. A. et al. The central role of nuclear factor-kB in mesangial cell activation. **Kidney International**, v. 56, p. S76-S79, 1999.

MAZZALI, M. *et al.* Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. **Hypertension**, v. 38, p. 1101–1106, 2001.

MEISSNER, A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 1079-1088, 2010.

MISHRA, M.; KOWLURU, R. A. Epigenetic modification of mitochondrial DNA in the development of diabetic retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, p. 5133–5142, 2015.

MOHAMMEDI, K. et al. Manganese Superoxide Dismutase (SOD2) Polymorphisms, Plasma Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) Concentration and Risk of Kidney Complications in Subjects with Type 1 Diabetes. **Plos One**, v. 9, e96916, 2014.

MOLLSTEN, A. et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 56, p. 265–269, 2007.

MORSY, M. A. et al. Carvedilol Ameliorates Early Diabetic Nephropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **BioMed Research International**, Article ID 105214, 1-8, 2014.

MUFTUOGLU, M.; MORI, M. P.; SOUZA-PINTO, N. C. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. **Mitochondrion**, v. 17, p. 164-181, 2014.

MUNUSAMY, S.; MACMILLAN-CROW, L. A. Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of mitochondrial dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 1149-1157, 2009.

MURPHY, M.; MCGINTY, A.; GODSON, C. Protein kinases C: potential targets for intervention in diabetic nephropathy. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 7, p. 563–570, 1998.

NAKAMURA, S. et al. Progression of Nephropathy in Spontaneous Diabetic Rats Is Prevented by OPB-9195, a Novel Inhibitor of Advanced Glycation. **Diabetes**, v. 46, p. 895-899, 1997.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-790, 2000.

NOWICKI, M. T. et al. Renal and hepatic transporter expression in type 2 diabetic rats. **Drug Metabolism Letters**, v. 2, p. 11–17, 2008.

OBROSOVA, I. et al. Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. **Diabetes**, v. 54, p. 234-242, 2005.

O'CONNOR, A. S.; SCHELLING, J. R. Diabetes and the kidney. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 46, p. 766-773, 2005.

OKABE, J. et al. Distinguishing hyperglycemic changes by set7 in vascular endothelial cells. **Circulation Research**, v. 110, p. 1067–1076, 2012.

OLSSON, A. H. et al. Decreased expression of genes involved in oxidative phosphorylation in human pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 589-595, 2011.

OSAWA, T.; KATO, Y. Protective Role of Antioxidant Food Factors in Oxidative Stress Caused by Hyperglycemia. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 440-451, 2005.

OUYANG, J.; PARAKHIA, R. A.; OCHS, R. S. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 1–11, 2011.

PAPADIMITRIOU, A. et al. Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGF β -1 signaling. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 773–784, 2014.

PARK, I. et al. Expression of transforming growth factor- β and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes**, v. 46, p. 473–480, 1997.

PARK, K. S. et al. Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 50, p. 2837–2841, 2001.

PHILLIPS, A. O. et al. Induction of TGF-beta 1 synthesis in D-glucose primed human proximal tubular cells by IL-1 beta and TNF alpha. **Kidney International**, v. 50, p. 1546–1554, 1996.

PICONI, L.; QUAGLIARI, L.; CERIello, A. Oxidative Stress in Diabetes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, p. 1144–1149, 2003.

PFLUEFGER, A. C. et al. Role of nitric oxide in intrarenal hemodynamics in experimental diabetes mellitus in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, p. R725–R733, 1999.

POLLACK, Y. et al. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4811–4824, 1984.

POTTER VAN LOON, B. J. et al. The Cardiovascular Risk Factor Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 is Related to Insulin Resistance. **Metabolism**, v. 42, p. 945–949, 1993.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 1057–1068, 2010.

PUGLIESE, G. et al. Early, but not advanced, glomerulopathy is reversed by pancreatic islet transplants in experimental diabetic rats: correlation with glomerular extracellular matrix mRNA levels. **Diabetes**, v. 46, p. 1198–1206, 1997.

RAHBAR, S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. **Clinica Chimica Acta**, v. 22, p. 296–298, 1968.

RAHMAN, A. M. A. et al. Targeted metabolomics in cultured cells and tissues by mass spectrometry: method development and validation. **Analytica Chimica Acta**. V. 845, p. 53–61, 2014.

RAMASAMY, R. et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, v. 15, p. 16R–28T, 2005.

REARDON, J. T. et al. *In vitro* repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 9463–9468, 1997.

REIS, R. J. S.; GOLDSTEIN, S. Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 9078–9085, 1983.

REMUZZI, A. et al. Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 541–549, 1990.

RICHTER, C.; PARK, J. W.; AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 85, p. 6465–6467, 1988.

RITZ, E. Diabetic nephropathy. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 17, p. 481–490, 2006.

ROSENBERG, M. E.; CHMIELEWSKI, D.; HOSTETTER, T. H. Effect of dietary protein on rat renin and angiotensin gene expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 1144–1149, 1990.

ROY, S. et al. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: Phenomenon with a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 404-408, 1990.

SAKURABA, H. et al. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, p. 85-96, 2002.

SAPIENZA, C. et al. DNA methylation profile identifies epigenetic differences between diabetes patients with ESRD and diabetes patients without nephropathy. **Epigenetics**, v. 6, p. 20-28, 2011.

SASSY-PRIGENT, C. et al. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 49, p. 466–475, 2000.

SATRIANO, J. et al. Induction of AMPK activity corrects early pathophysiological alterations in the subtotal nephrectomy model of chronic kidney disease. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 305, p. F727–733, 2013.

SHARMA, K. et al. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 45, p. 522–530, 1996.

SCHISANO, B. et al. Glucose oscillations, more than constant high glucose, induce p53 activation and a metabolic memory in human endothelial cells. **Diabetologia**, v. 54, p. 1219–1226, 2011.

SELL, D. R. et al. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 12310-12315, 2005.

SHAH, I. M.; MACKAY, S. P.; MCKAY, G. A. Therapeutic strategies in the treatment of diabetic nephropathy – a translational medicine approach. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 997-1016, 2009.

SHAPIRO, R. et al. On the reaction of guanine with glyoxal, pyruvaldehyde, and kethoxal, and the structure of the acylguanines. A new synthesis of N^2 -alkylguanines. **Biochemistry**, v. 8, p. 238-245, 1969.

SHOCK, L. S. et al. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, p. 3630–3635, 2011.

SMITH, M. A.; COVINGTON, M. D.; SCHNELLEMANN, R. G. Loss of calpain 10 causes mitochondrial dysfunction during chronic hyperglycemia. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, p. 161-168, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2015/2016**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

SOULIS-LIPAROTA, T. et al. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. **Diabetes**, v. 40, p. 1328-1334, 1991.

SUZEN, S.; BUYUKBINGOL, E. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1329-1352, 2003.

SYNOLD, T. et al. Advanced glycation end products of DNA: Quantification of N^2 -(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 2148-2155, 2008.

TALAAT, K. M.; EL-SHEIKH, A. R. The effect of mild hyperuricemia on urinary transforming growth factor beta and the progression of chronic kidney disease. **American Journal of Nephrology**, v. 27, p. 435–440, 2007.

TAMAE, D. et al. Mutagenesis and repair induced by the DNA advanced glycation end product N^2 -(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in human cells. **Biochemistry**, v. 50, p. 2321-2329, 2011.

TAN, A. L. Y.; FORBES, J. M.; COOPER, M. E. AGE, RAGE, and ROS in Diabetic nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 27, p. 130-143, 2007.

TESSIER, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. **Pathologie Biologie**, v. 58, p. 214-219, 2010.

THOMAS, M. C. et al. The Role of Advanced Glycation in Reduced Organic Cation Transport Associated with Experimental Diabetes. **Journal of Pharmacology and**

Experimental Therapeutics, v. 311, p. 456–466, 2004.

TITAN, S. M. O. **Efeito da associação de enalapril e losartan sobre proteinúria e marcadores inflamatórios na nefropatia diabética: ensaio clínico em DM tipo 2.** Tese (Doutorado em Nefrologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

THORNALLEY, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. **The Biochemistry Journal**, v. 269, p. 1-11, 1990.

TURGUT, F.; BOLTON, W. K. Potential New Therapeutic Agents for Diabetic Kidney Disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 55, p. 928-940, 2010.

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

VAN DYK, D. J. et al. Increased serum angiotensin converting enzyme activity in type I insulin-dependent diabetes mellitus: its relation to metabolic control and diabetic complications. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24, p. 463-467, 1994.

VANTYGHM, M. C. et al. Oxidative markers in diabetic ketoacidosis, **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 23, p. 732–736, 2000.

VEJAKAMA, P. et al. Reno-protective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetic patients: a systematic review and network meta-analysis. **Diabetologia**, v. 55, p. 566-578, 2012.

VILLENEUVE, L. M. *et al.* Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 9047–52, 2008.

VILLENEUVE, L. M.; REDDY, M. A.; NATARAJAN, R. Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, p. 451-459, 2011.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, p. 3-27, 2013.

WAKABAYASHI, Y. et al. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 89, p. e59-e61, 2010.

WAKI, H.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. The epigenome and its role in diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 12, p. 673-685, 2012.

WAKINO, S.; HASEGAWA, K.; ITOH, H. Sirtuin and metabolic kidney disease. **Kidney International**, v. 88, p. 691-698, 2015.

WANG, C. et al. Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. **PLoS One**, v. 7, e38285, 2012.

WARIS, S. et al. Increased DNA dicarbonyl glycation and oxidation markers in patients with type 2 diabetes and link to diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, Article ID 915486, 2015.

WATFORD, M. The urea cycle: Teaching intermediary metabolism in a physiological setting. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 31, p. 289-297, 2003.

WEI, J. et al. Aldose reductase regulates miR-200a-3p/141-3p to coordinate Keap1-Nrf2, Tgf β 1/2, and Zeb1/2 signaling in renal mesangial cells and the renal cortex of diabetic mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 91-102, 2014.

WELLS-KNECHT, K. J. et al. Mechanism of Autoxidative Glycosylation: Identification of Glyoxal and Arabinose as Intermediates in the Autoxidative Modification of Proteins by Glucose. **Biochemistry**, v. 34, p. 3702-3709, 1995.

WILLIAMSON, J. R. et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes**, v. 42, p. 801-813, 1993.

WUENSCHALL, G. E. et al. Mutagenic potential of DNA glycation: Miscoding by (*R*)- and (*S*)-*N*²-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine. **Biochemistry**, v. 49, p. 1814-1821, 2010.

WU, L.L. et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clinica Quimica Acta**, v. 339, p. 1-9, 2004.

XU, G.W. et al. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 36, 101-104, 2004.

YAMAZAKI, M. et al. Fructose consumption induces hypomethylation of hepatic mitochondrial DNA in rats. **Life Sciences**, v. 149, p. 146–152, 2016.

YOU, Y. et al. Metabolomics Reveals a Key Role for Fumarate in Mediating the Effects of NADPH Oxidase 4 in Diabetic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, p. 466-481, 2016.

ZASTAWNY, T. H. et al. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 722-725, 1998.

ZATZ, R. et al. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 5963-5967, 1985.

ZATZ, R. et al. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 77, p. 1925-1930, 1986.

ZIYADEH, F. N. et al. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 536–542, 1994.

ZIYADEH, F. N.; SHARMA, K. Overview: Combating diabetic nephropathy. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 14, p. 1355-1357, 2003.

ZHANG, X. F.; TAN, B. K. H. Antihyperglycaemic and antioxidante properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 358–363, 2000.

ZHENG, Z. et al. Sirtuin 1-Mediated Cellular Metabolic Memory of High Glucose Via the LKB1/AMPK/ROS Pathway and Therapeutic Effects of Metformin. **Diabetes**, v. 61, p. 217-228, 2012.

ZHOU, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1167–1174, 2001.

ZOPPINI, G. et al. Serum uric acid levels and incident chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and preserved kidney function. **Diabetes Care**, v. 35, p. 99–104, 2012.

Anexos

ANEXO A

Validação do método de quantificação de HbA1c

O método desenvolvido mostrou-se linear, preciso e exato. Foi obtida uma ótima correlação entre a quantidade de peptídeo glicado adicionado às amostras e a quantidade detectada, de modo que a exatidão manteve-se dentro dos níveis aceitáveis para as três concentrações validadas, conforme mostrado na Tabela suplementar 1. De acordo com o esperado, o maior coeficiente de variação foi obtido para a menor concentração validada. Ainda assim, obteve-se uma variação inferior a 12% (Tabela suplementar 1). A linearidade do método pode ser observada na Figura suplementar 1, que mostra curvas de calibração para o heptapeptídeo glicado e não glicado.

Tabela suplementar 1 Dados obtidos na a validação do método para quantificação de hemoglobina glicada.

Validação de Método – Quantificação de HbA1c						
HbA1c basal (ng/média±DP)	HbA1c adicionado (ng)	HbA1c detectado (ng/média±DP)	Média (-basal) (ng HbA1c)	Exatidão (%)	C.V. (%)	
0,4960 ± 0,0570	0	0,4960 ± 0,0570	0,00	-	11,50	
0,7024 ± 0,1402	1,11	1,9850 ± 0,2072	1,28	115,5	10,43	
0,6610 ± 0,2772	2,52	3,4993 ± 0,3400	2,84	112,7	9,71	
0,7481 ± 0,2406	4,65	5,5497 ± 0,1932	4,80	103,2	3,47	

Figura suplementar 1 Curvas de calibração obtidas para validação do método de quantificação de hemoglobina glicada. São demonstradas as curvas para quantificação do heptapeptídeos glicado (HbA_{1c}) e não glicado (HbA₀), respectivamente.

ANEXO B

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA FCF

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/51 /2012**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Variáveis no controle glicêmico e patogênese da nefropatia diabética: investigação do fenômeno da memória metabólica"** (Protocolo CEUA/FCF/363), de responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 02 de julho de 2012.

São Paulo, 03 de julho de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO C

Currículo Lattes

Antonio Anax Falcão de Oliveira

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Antonio Anax Falcão de Oliveira

Nome em citações bibliográficas

OLIVEIRA, A. A. F.;DE OLIVEIRA, ANTONIO ANAX FALCÃO;OLIVEIRA, ANTONIO ANAX FALCÃO DE;DE OLIVEIRA, ANTONIO ANAX F.

Endereço profissional

Rodovia Presidente Dutra, Km 222,2
Porto da Igreja - Guarulhos
07034904, SP - Brasil
Telefone: 11 26086539

Formação acadêmica/titulação

- 2012 - 2017** Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
com período sanduíche em University of Cambridge (Orientador : Susan Ozanne)
Título: A memória hiperglicêmica no rim diabético: marcas metabólicas, moleculares e epigenéticas, Ano de obtenção: 2017
Orientador: Ana Paula de Melo Loureiro
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008 - 2012** Graduação em Farmácia.
Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Sao Paulo, Brasil

Formação complementar

- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Free Radical School.
Society for Redox Biology and Medicine, SFRBM, Estados Unidos
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Young Scientists Training Course. (Carga horária: 50h).
European Association for the Study of Diabetes, EASD, Alemanha
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Free Radical School.
Society for Free Radical Biology and Medicine, South America Group, SFRBM-SAG, Argentina
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Interpreting oral fluid drug concentration.
Sociedade Brasileira de Toxicologia, SBTOx, Sao Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Manuseio/Descarte/Transporte de Resíduos Químicos. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Epigenética. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2011 - 2011	Curso de curta duração em LC-MS/MS - Fundamentos e Quantificação. Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, BRMASS, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em Toxicologia Clínica. (Carga horária: 40h). Instituto da Criança - Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina USP, ICHC - FMUSP, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em Análise Instrumental. (Carga horária: 40h). Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Sao Paulo, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em Iniciativa e Proatividade. (Carga horária: 8h). Franquality, FQ, Brasil
2010 - 2010	Extensão universitária em Atenção Farmacêutica ao Paciente Diabético. (Carga horária: 30h) Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Sao Paulo, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em A Construção Coletiva do Conhecimento. (Carga horária: 20h). Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Sao Paulo, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Economia, Ecologia e Ser Humano. (Carga horária: 20h). Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Aché Laboratórios Farmacêuticos - ACHÉ

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Especialista em Toxicologia , Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:

Monitor do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino - PAE, na Disciplina Fisiopatologia e Farmacologia II

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:

Programa de Aperfeiçoamento do Ensino - Disciplina: Fisiopatologia e Toxicologia II

2012 - Atual Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno de Pós-Graduação (Doutorado) , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:

Aluno do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas - FCF/USP

2011 - 2012 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

3. Bayer - BAYER S.A.

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30,
Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação no Serviço de Atendimento ao Consumidor nas Divisões Consumer Care e Diabetes Care

4. Universidade Anhembi Morumbi - UAM

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 10,
Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação no Centro de Informações sobre Medicamentos e Cosméticos Anhembi Morumbi - CIMAM

Áreas de atuação

1. Toxicologia
2. Metabolismo e Bioenergética
3. Fisiopatologia

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos

2015	Menção Honrosa - Apresentação Oral na categoria de Doutorado durante a L SUPFAB, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
2015	Travel Grant 51st EASD Annual Meeting, European Association for the Study of Diabetes
2014	Travel Grant 50th EASD Annual Meeting, European Association for the Study of Diabetes
2012	Prêmio Paulo Minami - Melhor Aluno do Curso de Farmácia - Universidade Anhembi Morumbi, Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo
2006	Menção Honrosa - Olimpíada brasileira de Matemática das escolas públicas/OBMEP, Ministério da Ciência e Tecnologia
2005	Menção Honrosa - Olimpíada brasileira de Matemática das escolas públicas/OBMEP, Ministério da Ciência e Tecnologia

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. CARVALHO, ALINE MARTINS DE; **OLIVEIRA, ANTONIO ANAX FALCÃO DE**; LOUREIRO, ANA PAULA DE MELO; GATTÁS, GILKA JORGE FIGARO; FISBERG, REGINA MARA; MARCHIONI, DIRCE MARIA Arginine intake is associated with oxidative stress in a general population. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.). , v.33, p.211 - 215, 2016.

Referências adicionais : Inglês.

2. DE OLIVEIRA, TIAGO FRANCO; DA SILVA, AMANDA LUCILA MEDEIROS; DE MOURA, RAFAELA ALVES; BAGATTINI, RAQUEL; **DE OLIVEIRA, ANTONIO ANAX FALCÃO**; DE MEDEIROS, MARISA HELENA GENNARI; DI MASCIO, PAOLO; DE ARRUDA CAMPOS, IVAN PÉRSIO; BARRETTO, FABIANO PRADO; BECHARA, ETELVINO JOSÉ HENRIQUES; DE MELO LOUREIRO, ANA PAULA Luminescent threat: toxicity of light stick attractors used in pelagic fishery. Scientific Reports. , v.4, p.5359 - , 2014.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.nature.com/srep/2014/140619/srep05359/full/srep05359.html][doi:10.1038/srep05359]

Artigos aceitos para publicação

1. **DE OLIVEIRA, ANTONIO ANAX F.**; DE OLIVEIRA, TIAGO F.; BOBADILLA, LARISSA L.; GARCIA, CAMILA C. M.; BERRA, CAROLINA MARIA; DE SOUZA-PINTO, NADJA C.; MEDEIROS, MARISA H. G.; DI MASCIO, PAOLO; ZATZ, ROBERTO; DE M. LOUREIRO, ANA PAULA Sustained kidney biochemical derangement in treated experimental diabetes: a clue to metabolic memory. Scientific Reports. , 2017.

Referências adicionais : Inglês.

Capítulos de livros publicados

1. LOUREIRO, A.P.M.; **OLIVEIRA, A. A. F.**; OLIVEIRA, T. F. Sistemas Antioxidantes In: Genômica Nutricional: Dos fundamentos à nutrição molecular.1 ed. : Manole, 2016, v.1, p. 387-408.

Referências adicionais : Brasil/Português. ISBN: 9788520440155

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **OLIVEIRA, A. A. F.**; BOBADILLA, L. L.; DE OLIVEIRA, TIAGO FRANCO; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P.; LOUREIRO, A.P.M.

Fumarate and TGF- β as mediators of metabolic memory in diabetic kidney disease In: 22nd Annual Meeting of Society for Redox Biology and Medicine, 2015, Boston.

SFRBM's 22nd Annual Meeting - Program and Abstracts. Philadelphia: Elsevier, 2015. v.87. p.S26 - S26
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [http://ac.els-cdn.com/S0891584915006826/1-s2.0-S0891584915006826-main.pdf?_tid=9c36694c-dbeb-11e5-9f37-00000aacb360&acd=1456424249_8d4eee3518656505bd0a9d25b01039ec]

2. **OLIVEIRA, A. A. F.**; BOBADILLA, L. L.; OLIVEIRA, T. F.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P.; LOUREIRO, A.P.M.

New insights for an old marker: TGF- β , diabetic nephropathy and metabolic memory In: 51st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2015, Estocolmo.

Diabetologia - Abstracts of 51st EASD Annual Meeting. Springer, 2015. v.58. p.S562 - S562

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

3. **OLIVEIRA, A. A. F.**; BOBADILLA, L. L.; OLIVEIRA, T. F.; MEDEIROS, M. H. G.; LOUREIRO, A.P.M.

Inflammation and oxidative stress markers related to renal damage due to diabetes mellitus In: 50th EASD Annual Meeting, 2014, Vienna.

Diabetologia. , 2014. v.57. p.S483 - S484

Referências adicionais : Grã-Bretanha/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4. OLIVEIRA, A. A. F.; BOBADILLA, L. L.; OLIVEIRA, T. F.; SOUZA, M. O.; LOUREIRO, A.P.M.
Kidney oxidative stress persists despite glycemic control in diabetic rats: An approach about metabolic memory In: XIX Semana Farmacêutica De Ciência E Tecnologia, XLIX Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2014, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2014.
Referências adicionais : Brasil/Inglês.
5. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; SANTOS, F. A.; LOUREIRO, A.P.M.
APPLICATION OF LC-MS/MS FOR ANALYSIS OF DNA ADDUCTS RELATED TO OXIDATIVE STRESS AND ADVANCED GLYCATION In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2013, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2013. v.49. p.44 -
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
6. RIBEIRO, A. L. T.; SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; FOCK, R. A.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A.P.M.
BPA EXPOSURE DISRUPTS BONE MARROW CELL COUNT IN VIVO AND INDUCES OXIDATIVE STRESS AND EPIGENETIC ALTERATIONS IN VITRO In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTox, 2013, Porto Alegre.
Anais CBTox. , 2013.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
7. SANTOS, F. A.; DURAO, A. C. C.; SILVA, A. M. O.; RIBEIRO, A. L. T.; OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A.P.M.
EVALUATION OF MALONALDEHYDE IN PLASMA AND DNA LESIONS OF DIABETICS RATS In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLVIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2013, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2013. v.49. p.43 -
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
8. SANTOS, F. A.; LOIOLA, J. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; DURAO, A. C. C.; MARCOURAKIS, T.; SILVA, A. M. O.; OLIVEIRA, T. F.; RIBEIRO, A. L. T.; LOUREIRO, A.P.M.
EVALUATION OF OXIDATIVE AND GLYCATION DAMAGE IN A MODEL OF DIABETIC RATS In: Antioxidants and Redox Process in Health, 2013, São Paulo.
Program and Abstracts ARPH 2013. , 2013. v.1. p.69 -
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
9. OLIVEIRA, A. A. F.; BOBADILLA, L. L.; LOUREIRO, A.P.M.
GLYCEMIC CONTROL IS NOT SUFFICIENT TO REVERT KIDNEY OXIDATIVE STRESS IN DIABETIC RATS In: Antioxidants and Redox Process in Health, 2013, São Paulo.
Program and Abstracts ARPH 2013. , 2013. v.1. p.68 -
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
10. OLIVEIRA, A. A. F.; BOBADILLA, L. L.; LOUREIRO, A.P.M.
INSULIN PRESENTS PROINFLAMMATORY AND PROOXIDANT EFFECTS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETES In: World Diabetes Congress, 2013, Melbourne.
Annals of World Diabetes Congress. , 2013. p.P-1098 -
Referências adicionais : Austrália/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
11. OLIVEIRA, T. F.; BASTOS, A. S.; SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P.; ORRICO, S. R. P.; LOUREIRO, A.P.M.
MASS SPECTROMETRY AS AN EFFICIENT TOOL FOR BIOMONITORING OF REDOX-MODIFIED DNA BASES IN SALIVA In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas BrMASS, 2013, Campinas.
Anais IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas - BrMASS. , 2013.
Referências adicionais : Brasil/Inglês.
12. SANTOS, F. A.; DURAO, A. C. C.; MARCOURAKIS, T.; SILVA, A. M. O.; OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; RIBEIRO, A. L. T.; LOUREIRO, A.P.M.
OXIDATIVE AND ADVANCED GLYCATION DAMAGE IN A MODEL OF DIABETIC RATS In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTox, 2013, Porto Alegre.
Anais do CBTox. , 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

13. SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; RIBEIRO, A. L. T.; DURAO, A. C. C.; SILVA, A. M. O.; MARCOURAKIS, T.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A.P.M.
OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND ADVANCED GLYCATION AS DAMAGE PATHWAYS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETES In: VIII International Congress of Society for Free Radical Biology and Medicine - South American Group, 2013, Buenos Aires.

Program and Abstracts SFRM-SAG. , 2013. v.1. p.93 -

Referências adicionais : Argentina/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

14. OLIVEIRA, A. A. F.; BOBADILLA, L. L.; DIAS, M. F. R. S.; MARCOURAKIS, T.; LOUREIRO, A.P.M.
OXIDATIVE STRESS PERSISTS DESPITE GLYCEMIC CONTROL IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETES In: VIII International Congress of Society for Free Radical Biology and Medicine - South American Group, 2013, Buenos Aires.

Program and Abstracts SFRM-SAG. , 2013. v.1. p.91 -

Referências adicionais : Argentina/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

15. OLIVEIRA, T. F.; BASTOS, A. S.; SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P.; ORRICO, S. R. P.; LOUREIRO, A.P.M.

SALIVA AS PROMISING MATRIX FOR BIOMONITORING OF REDOX-MODIFIED DNA BASES In: Antioxidants and Redox Process in Health, 2013, São Paulo.

Program and Abstracts ARPH 2013. , 2013. v.1. p.15 -

Referências adicionais : Brasil/Bretão. Meio de divulgação: Impresso

16. OLIVEIRA, A. A. F.; SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A.P.M.
VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATION OF DNA LESIONS RELATED TO OXIDATIVE STRESS AND ADVANCED GLYCATION In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTox, 2013, Porto Alegre.

Anais do CBTox. , 2013.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

17. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; LEMOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; LOUREIRO, A.P.M.
DNA DAMAGE AND DNA METHYLATION PATTERN CHANGE IN MICE EXPOSED TO AIR POLLUTANT FROM SÃO PAULO/SP, BRAZIL In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2012, Porto de Galinhas.

Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. , 2012.

Áreas do conhecimento : TOXICOLOGIA

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

18. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; LEMOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; LOUREIRO, A.P.M.
GENOTOXIC AND EPIGENETIC ALTERATIONS IN MICE CHRONICALLY EXPOSED TO AIR POLLUTANTS. In: XVII Technology and Pharmaceutical Science Week, 2012, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Inglês.

19. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.; LEMOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; LOUREIRO, A.P.M.
ALTERAÇÕES GENOTÓXICAS E EPIGENÉTICAS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS A POLUENTES ATMOSFÉRICOS DA CIDADE DE SÃO PAULO In: IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas - BrMASS, 2011, Campinas.

Anais IV Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas - BrMASS. , 2011.

Referências adicionais : Brasil/Português.

Apresentação de trabalho e palestra

1. OLIVEIRA, A. A. F.

Epigenética: Bases moleculares e implicações para a saúde humana, 2016. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Cidade: São Paulo; Evento: 7º Encontro da Escola de Ciências da Saúde; Inst.promotora/financiadora: Universidade Anhembí Morumbi

2. OLIVEIRA, A. A. F.

Metabolismo Redox em Toxicologia, 2016. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Cidade: São Paulo; Evento: V Escola de Inverno em Toxicologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

3. OLIVEIRA, A. A. F.

About Telomeres and tea - My scientific experience abroad, 2015. (Simpósio, Apresentação de

Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Auditório István Jancsó - Biblioteca Brasileira Guita e José Mindlin; Cidade: São Paulo; Evento: VI Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas - I Symposium on Pathophysiology and Toxicology; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - FCF USP

4. OLIVEIRA, A. A. F.

Metabolismo Redox: Mecanismos Epigenéticos, 2015. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: IV Escola de Inverno em Toxicologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

5. OLIVEIRA, A. A. F.

Estresse Oxidativo - Aspectos Básicos, 2014. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: III Escola de Inverno em Toxicologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

6. OLIVEIRA, A. A. F.; LOUREIRO, A.P.M.

Variables on glycemic control and pathogenesis of diabetic nephropathy: Research on the phenomenon of metabolic memory, 2014. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Holanda/Inglês; Local: The Netherlands; Cidade: Maastricht; Evento: Young Scientists Training Course; Inst.promotora/financiadora: European Association for the Study of Diabetes

7. OLIVEIRA, A. A. F.

Definindo estresse oxidativo e o dano gerado oxidativamente, 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : TOXICOLOGIA

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: II Escola de Inverno em Toxicologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

8. OLIVEIRA, A. A. F.

Epigenética e as complicações crônicas do diabetes, 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Câmpus Centro - Universidade Anhembi Morumbi; Cidade: São Paulo; Evento: 4º Encontro da Escola de Ciências da Saúde; Inst.promotora/financiadora: Universidade Anhembi Morumbi

Demais produções bibliográficas

1. OLIVEIRA, A. A. F.; DUARTE, B. C. S.; SOARES, K. A.; VERONESI, M. C. R.

Ativos Antiacne. São Paulo:Pharmabooks, 2010. (Introdução, Prefácio, Posfácio)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. OLIVEIRA, A. A. F.

Como é a carreira acadêmica no Brasil? Conheça a história de um jovem pesquisador, 2015

Referências adicionais : Brasil/Português. Home page: <https://www.napratica.org.br/como-e-a-carreira-academica-no-brasil-conheca-a-historia-de-um-jovem-pesquisador/>

Demais produções técnicas

1. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.

Aula Prática: Quantificação de Malonaldeído em Plasma, 2016. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas.

2. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.

Aula Prática: Avaliação de Biomarcadores de Exposição, 2015. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas.

3. OLIVEIRA, A. A. F.

Epigenética, 2015. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas.

4. OLIVEIRA, A. A. F.

23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - Mostra de Destaques, 2015.

(Outra produção técnica)

Referências adicionais : Brasil/Português.

5. OLIVEIRA, A. A. F.; OLIVEIRA, T. F.

Aula Prática: Abordagem Interdisciplinar da Intoxicação por um poluente ambiental, 2014. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas.

Produção artística/cultural

Artes Visuais

1. OLIVEIRA, A. A. F.

Evento: **XX Semana de Artes da FCF USP**, 2015. Local Evento: FCF USP. Cidade do evento: São Paulo. País: Brasil. Instituição promotora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Tipo de evento: Exposição Coletiva.

Atividade dos autores: Outra.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Educação e Popularização de C&T

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. OLIVEIRA, A. A. F.

Como é a carreira acadêmica no Brasil? Conheça a história de um jovem pesquisador, 2015. (Entrevista, Programa de Rádio ou TV)

Referências adicionais : Brasil/Português. Home page: <https://www.napratica.org.br/como-e-a-carreira-academica-no-brasil-conheca-a-historia-de-um-jovem-pesquisador/>

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras e olimpíadas

1. OLIVEIRA, A. A. F.

Programa USP e as Profissões - Visita Monitorada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português.

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Conferencista no(a) **VI Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas - I Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2015. (Simpósio)

About telomeres and tea - My scientific experience abroad.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **22nd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine**, 2015. (Congresso)
Fumarate and TGF-beta as mediators of metabolic memory in diabetic kidney disease.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **51st EASD Annual Meeting**, 2015. (Congresso)
New insights for an old marker: TGF-beta, diabetic nephropathy and metabolic memory.
3. Apresentação Oral no(a) **L Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica - SUPFAB**, 2015. (Congresso)
TGF-beta as a mediator of metabolic memory in diabetic kidney disease.
4. Conferencista no(a) **VI Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas - I Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2015. (Simpósio)
About telomeres and tea - My scientific experience abroad.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Antioxidants and Redox Process in Health**, 2013. (Congresso)
GLYCEMIC CONTROL OS NOT SUFFICIENT TO REVERT KIDNEY OXIDATIVE STRESS IN DIABETIC RATS.
6. Conferencista no(a) **II Escola de Inverno em Toxicologia**, 2013. (Outra)
Definindo estresse oxidativo e o dano gerado oxidativamente.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII International Congress of Society for Free Radical Biology and Medicine - South America Group**, 2013. (Congresso)
OXIDATIVE STRESS PERSISTS DESPITE GLYCEMIC CONTROL IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETES.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTox**, 2013. (Congresso)
VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATION OF DNA LESIONS RELATED TO OXIDATIVE STRESS AND ADVANCED GLYCATION.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2013. (Congresso)
APPLICATION OF LC-MS/MS FOR ANALISYS OF DNA ADDUCTS RELATED TO OXIDATIVE STRESS AND ADVANCED GLYCATION.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 2012. (Congresso)
DNA damage and DNA methylation pattern change in mice exposed to air pollutants from São Paulo/SP, Brazil.
11. **Biomarcadores: Emprego em Pesquisa, Clínica e Área Regulatória**, 2011. (Simpósio)
12. **II Encontro da Escola de Ciências da Saúde**, 2011. (Encontro)
13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas**, 2011. (Congresso)
Alterações genotóxicas e epigenéticas em camundongos expostos a poluentes atmosféricos da cidade de São Paulo.
14. **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2011. (Outra)
15. **20ª Semana Racine**, 2010. (Congresso)

16. **I Encontro da Escola de Ciências da Saúde**, 2010. (Encontro)
.
17. **Jornada Paulista de Análises Clínicas e Gestão da Qualidade Laboratorial**, 2010. (Simpósio)
.
18. **Seminário Ativos Dermatológicos**, 2010. (Seminário)
.
19. **Toxicidade das Plantas Domésticas: Identificação e Cuidado**, 2010. (Oficina)
.
20. **II Fórum da Qualidade do Curso de Farmácia - Universidade Anhembi Morumbi**, 2009. (Outra)
.
21. **XII Semanda de Farmácia - Universidade Anhembi Morumbi**, 2009. (Outra)
.
22. **Semana de Farmácia- Universidade Anhembi Morumbi**, 2008. (Outra)
.
23. **XXII Congresso Brasileiro de Cosmetologia - ABC**, 2008. (Congresso)
.
24. **Capacitação do Tema Rádio do Projeto Selo Unicef Município aprovado- Edição 2006**, 2006. (Outra)
.
25. Apresentação Oral no(a) **Fórum Estadual de Experiências Exitosas no Ensino Médio**, 2006. (Outra)
Educação e Saúde: Aprender para conviver.

Organização de evento

1. **OLIVEIRA, A. A. F.; PANTALEAO, L. N.; SILVEIRA, G. O.; UDO, M. S. B.; OLIVEIRA, T. F.; ELLER, S. C. W. S.**
IV Escola de Inverno em Toxicologia, 2015. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português.
2. **OLIVEIRA, A. A. F.**
Programa USP e as Profissões - Visita Monitorada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.
(Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português.
3. **OLIVEIRA, A. A. F.; ELLER, S. C. W. S.; BELTRAN, J. S. O.; SILVA, G. B.; SANTOS, A. C. A.; BARIONI, E. D.; HASTREITER, A.; DIAS, C. C.; BONEZI, V.; OLIVEIRA, D. C.**
VI Simpósio de Pós-graduação em Análises Clínicas - I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology, 2015. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português.
4. **DREWES, C. C.; ELLER, S. C. W. S.; OLIVEIRA, A. A. F.; DURAO, A. C. C.; BARIONI, E. C.; OLIVEIRA, T. F.; RIBEIRO, A. L. T.**
III Escola de Inverno em Toxicologia, 2014. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	2
Artigos aceitos para publicação.....	1
Capítulos de livros publicados.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	19
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	7
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	1
Introduções (Livro).....	1
Produção técnica	
Curso de curta duração ministrado (extensão).....	3
Curso de curta duração ministrado (outro).....	1
Programa de Rádio ou TV (entrevista).....	1
Outra produção técnica.....	1
Eventos	
Participações em eventos (congresso).....	11
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	3
Participações em eventos (oficina).....	1
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	7
Organização de evento (outro).....	4
Produção cultural	
Artes Visuais(Fotografia).....	1

Outras informações relevantes

1 Representante dos alunos do Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas junto à Comissão Coordenadora do Programa e à Comissão de Bolsas no período de Novembro de 2013 a Julho de 2014 como Titular e de Agosto de 2014

Representante discente junto à Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Março de 2015 a Março de 2016.

Membro da European Association for the Study of Diabetes - EASD, Society for Free Radicals in Biology and Medicine - SFRBM e Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas - BrMass.

ANEXO D

Ficha do Aluno

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/07/2012
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 17/07/2016 até 14/11/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 17/07/2012
 Prorrogação em 30/05/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 10/11/2016 14:23:28

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 8183034/1 - Antonio Anax Falcão de Oliveira

Email: antonioanax@usp.br
Data de Nascimento: 03/09/1991
Cédula de Identidade: RG - 53.131.119-3 - SP
Local de Nascimento: Estado de Rio Grande do Norte
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Anhembi Morumbi - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Doutorado Direto
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 17/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 17/07/2012
Data Limite para o Depósito: 16/11/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Paula de Melo Loureiro - 17/07/2012 até o presente.
 Email: apmlou@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/07/2012
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 17/07/2016 até 14/11/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 8183034/1 - Antonio Anax Falcão de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/9	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	30/11/2012	120	8	100	A	N	Concluída
BMB5818-1/3	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/08/2012	13/09/2012	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BIO5787-3/3	Radicais Livres em Sistemas Biológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	21/08/2012	23/10/2012	60	4	86	A	N	Concluída
FBC5818-1/1	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	24/10/2012	28/11/2012	45	3	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0416 Fisiopatologia II, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	17/02/2013	07/07/2013	-	3	-	-	-	-
MCM5741-6/2	Temas Avançados em Fisiologia e Fisiopatologia Renal (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/03/2013	28/04/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	80	A	N	Concluída
FBC5752-2/4	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	05/06/2013	09/07/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/2	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	06/08/2013	19/08/2013	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5818-1/4	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/08/2013	04/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5753-1/1	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	29/10/2013	04/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
QBQ5802-4/2	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5784-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia II	11/03/2014	23/06/2014	15	1	100	A	N	Concluída
QFL5627-2/4	Filosofia da Ciência (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	19/03/2014	01/07/2014	120	8	91	A	N	Concluída
FBC5748-4/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	05/04/2016	17/05/2016	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	25	57
Estágios:			
Total:	10	25	57

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 09/12/2013.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 10/11/2016 14:23:28