

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Robson Souza Serralha

**CORRELAÇÃO ENTRE O RECEPTOR P2X₇ E OS PARÂMETROS DE
FUNÇÃO RENAL, NO ESTÁGIO PRECOCE DO *DIABETES*
MELLITUS EXPERIMENTAL**

São Paulo

2017

Robson Souza Serralha

**CORRELAÇÃO ENTRE O RECEPTOR P2X₇ E OS PARÂMETROS DE
FUNÇÃO RENAL, NO ESTÁGIO PRECOCE DO *DIABETES*
MELLITUS EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Biomedicina do Centro
Universitário São Camilo, orientado pelo Prof.
Dr. Alex Kors Vidsiunas, como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Robson Souza Serralha

**CORRELAÇÃO ENTRE O RECEPTOR P2X₇ E OS PARÂMETROS DE
FUNÇÃO RENAL, NO ESTÁGIO PRECOCE DO *DIABETES*
MELLITUS EXPERIMENTAL**

São Paulo, 30 de Outubro de 2017.

Professor Orientador Dr. Alex Kors Vidsiunas

Professor Examinador Dr. Renato Borges Tesser

Dedico este trabalho primeiramente à Jéssica: minha eterna amiga, companheira, namorada e noiva. Obrigado por todos os momentos de compreensão, paciência e luta nesta caminhada que também é sua. Te amo.

Meus familiares: Edite, Maria, Solemar, Murilo, Guilherme entre tantos outros, por todos os valores ensinados e cobrados, pelo auxílio e suporte ao longo de todos estes anos.

Aos Caras da SC, por dividirem as angústias e alegrias do ensino superior; pelas conversas, pelos momentos étlicos de descontração e pela amizade que se estendeu além do meio acadêmico. Muito obrigado Adriano, aos dois “Caio Vinícios” (rsrsrs), Caio Cardoso, Daniel, Fabrício, Itallo, Luan, Lucas, Luiz, Marcos, Matheus, Vinícius, e Dr. Piruca Cabelo. Marina não faz parte do grupo, mas é um dos caras mais legais da faculdade.

Agradeço primeiramente à todas as forças cósmicas/celestiais que em ressonância com as minhas desenvolveram as qualidades que julgo serem necessárias para o sucesso em tudo aquilo que se faz: resiliência, paciência e sapiência.

Meus mais sinceros agradecimentos e gratidão à UNIFESP e ao Laboratório de Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo, em especial à Prof.^a Dra. Elisa Higa, por ter me recebido e concedido a oportunidade de desenvolver minhas habilidades e raciocínios científicos.

Aos colegas de Laboratório: Dr. Adelson, em especial, pela paciência, correções e pelo auxílio na orientação deste trabalho. Camila, Daniela, Margaret, Deyse, Giovana e Moisés pelos auxílios nos diversos procedimentos realizados ao longo de nosso protocolo.

Ao Prof.^o Dr.^o Alex Kors, pelos conselhos dados logo no segundo semestre de curso e que me fizeram mudar de visão sobre o que realmente era estar numa faculdade. Como dito certa vez pela coordenação, “suas palavras tem o poder de mudar os alunos”. Obrigado.

“...when you lose small mind you free your live...”

System of a Down - Aerials

SERRALHA, Robson S. **Correlação entre o receptor P2X₇ e os parâmetros de função renal, no estágio precoce do *diabetes mellitus* experimental.** 2017. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que ocorre quando há falha na produção de insulina ou quando esta não é utilizada de maneira eficiente pelo organismo. Dados da Organização Mundial da Saúde, de 2016, estimam que aproximadamente 422 milhões de pessoas foram diagnosticadas com DM, número que pode duplicar até 2040. A alta concentração de ATP, como visto no DM, é responsável pela ativação de receptores P2X₇. O objetivo deste trabalho é correlacionar o conteúdo proteico de P2X₇ com os parâmetros de função renal na fase precoce do DM. Ratos *Wistar* machos foram todos uninefrectomizados para acelerar o desenvolvimento da nefropatia diabética e em seguida foram distribuídos nos grupos controle e diabético em um protocolo de 8 semanas. O DM foi induzido pela administração de estreptozotocina (60 mg/kg, i.v.), sendo que os animais controle receberam apenas o veículo da droga – tampão citrato. Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina e sangue em todas as semanas; estas amostras foram utilizadas para dosagens de ureia, creatinina, proteinúria, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e óxido nítrico (NO). Os animais foram eutanasiados após as gaiolas metabólicas e o rim remanescente foi coletado para realização de dosagens bioquímicas e moleculares. Os resultados foram descritos como média $\pm$ erro padrão. Foi feito Teste T para dados paramétricos e para os dados não paramétricos foi realizado o teste de Mann-Whitney. A análise de variância foi feita por ANOVA de medidas repetidas, com significância definida para ambos por $p < 0,05$. Foi observado aumento na ingestão de água, ração, glicemia e proteinúria nos animais diabéticos em todas as semanas quando comparados com seus respectivos controles. A ureia urinária estava reduzida em todas as semanas no grupo diabético, enquanto que a ureia plasmática estava elevada da 1^a à 7^a semana neste mesmo grupo de animais. A creatinina urinária estava reduzida em todas as semanas nos animais diabéticos, assim como os níveis plasmáticos no momento basal, 1^a, 4^a, 6^a, e 8^a semanas. TBARS urinário estava elevado em todas as semanas nos animais diabéticos, enquanto que os níveis plasmáticos estavam elevados na 4^a e 8^a semana neste mesmo grupo. Os níveis de TBARS no córtex renal estavam elevados nos ratos diabéticos na 1^a, 2^a, e 8^a semanas. NO urinário estava reduzido em todas as semanas nos animais diabéticos, com significância na 5^a semana. Não houve alterações plasmáticas. O NO do córtex renal estava reduzido na 2^a semana, mas elevado na 4^a e 6^a semanas, comparando os animais diabéticos com seus controles. Os níveis proteicos de P2X₇ se encontravam elevados na 8^a semana nos animais diabéticos. O delta destes níveis apontam para os maiores valores na 6^a e 8^a semana, quando comparados com a semana inicial de protocolo nos animais diabéticos. O receptor P2X₇ apresentou uma forte correlação com os níveis de excreção urinária de NO nos animais diabéticos; isso nos permite inferir que este receptor pode ser a causa ou o efeito dos agentes que resultam na menor biodisponibilidade de NO.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus* experimental; ratos *Wistar*; receptores purinérgicos P2X₇; testes de função renal.

SERRALHA, Robson S. **Correlation between P2X₇ and the renal function parameters on the experimental *diabetes mellitus* early stage.** 2017. 31 f. Completion coursework (Bachelor degree in Biomedical Sciences) – Centro Universitario Sao Camilo, Sao Paulo, 2017.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease who occurs when there is a failure in insulin production or when this is not used efficiently by the organism. Data from World Health Organization, from 2016, estimate that approximately 422 million people were diagnosed with DM, number that can double by 2040. The high concentrations of ATP, as seen in DM is responsible for P2X₇ receptor activation. This aim work is correlate the P2X₇ protein content with the renal function parameters on the DM early stage. Wistar male rats were all uninephrectomized to fast the diabetic nephropathy development and were distributed in control and diabetic group in a 8 weeks protocol. The DM was induced by streptozotocin administration (60 mg/kg, IV), with the control animals receiving only the drug vehicle – citrate buffer. The animals were allocated in metabolic cages to urine and blood collect in all weeks of protocol; these samples were used to urea, creatinine; proteinuria; thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and nitric oxide (NO) dosages. The animals were euthanized after metabolic cages and the remanescent kidney was collected for biochemical and molecular dosages. The results were described as $\pm$ SEM. T-test was used for parametric data and the Mann-Whitney test was performed for non-parametric data. The variance analysis was made by RM ANOVA, significance defined for both with $p < 0,05$. Was observed and increase in water ingest, food intake, glycaemia and proteinuria in diabetic animal at every weeks when compared with their respective controls. Urine urea was reduced every week in the diabetic group, whereas plasma urea was elevated from 1st to 7th weeks in this same group of animals. Urinary creatinine was reduced every week in diabetic animals, as were plasma levels at baseline, 1st, 4th, 6th, and 8th weeks. Urinary TBARS was elevated every week in diabetic animals, whereas plasma levels were elevated in the 4th and 8th weeks in the same group. Tissue levels of TBARS were elevated in diabetic rats at the 1st, 2nd, and 8th weeks. Urinary NO was reduced every week in diabetic animals, with significance at week 5. There were no plasma changes. Tissue NO was reduced in the 2nd week, but elevated in the 4th and 6th weeks, comparing the diabetic animals with their controls. Protein levels of P2X₇ were elevated at week 8 in diabetic animals. The delta of these levels points to the highest values in the 6th and 8th weeks, when compared with the initial week of protocol in diabetic animals. The P2X₇ receptor showed a strong correlation with urinary NO excretion levels in diabetic animals; this allows us to infer that this receptor may be the cause or the effect of the agents that result in the lower NO bioavailability.

Keywords: Experimental *diabetes mellitus*, Wistar rats; purinergic P2X₇ receptors; renal function tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\cdot\text{OONO}$ – peróxido nítrico

AGE/AGEs – produtos finais de glicosilação avançada

ATP – adenosina trifosfato

DNA – ácido desoxirribonucleico

DM – *diabetes mellitus*

GSH – glutathione

MDA – malondialdeído

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ND – nefropatia diabética

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

O_2^- – ânion superóxido

ROS – espécies reativas de oxigênio

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
Nefrectomia	5
Indução ao <i>diabetes mellitus</i>	5
Gaiola metabólica	6
Eutanásia.....	6
Função renal.....	7
Proteinúria	7
Homogenato do córtex renal para NO e TBARS	7
Estimativa de lipoperoxidação	7
Dosagem de NO	8
Homogenato do córtex renal para <i>Western blot</i>	8
<i>Western blot</i>	8
Análise Estatística	9
4. RESULTADOS	10
5. DISCUSSÃO	13
6. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	18
APÊNDICE.....	23

1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que se apresenta como um dos principais problemas de saúde pública ao redor do mundo atualmente. Dados da Organização Mundial de Saúde apontam que aproximadamente 422 milhões de pessoas haviam sido diagnosticadas com diabetes até o ano de 2014. Este dado representa uma prevalência global de cerca de 8,5% da população adulta. Em quadros mais avançados, os pacientes podem apresentar perda da função renal, cegueira e a amputação de membros inferiores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Ademais estes dados alarmantes, foram registrados, somente no ano de 2015, mais de 5 milhões de óbitos devido à doença ou suas complicações. Estes números ultrapassam até mesmo o número de óbitos registrados por HIV/AIDS, tuberculose e malária (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Por conta da imensa gama de complicações relacionadas à doença, diversos países aumentaram os investimentos direcionados ao combate do DM. Hoje os gastos globais ultrapassam os 825 bilhões de dólares por ano, que são divididos em ações de conscientização e prevenção, além dos tratamentos administrados em pessoas já diagnosticadas com a doença (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

Existem duas formas principais de DM, sendo classificadas como tipo 1 e 2. No tipo 1, fatores genéticos associados a ambientais levam a resposta autoimune nas ilhotas de *Langerhans*, causando a destruição das mesmas e supressão na produção de insulina (MATHIS *et al.*, 2001).

A ineficiência ou a ausência na produção de insulina resulta na perda do correto metabolismo da glicose, aumentando as concentrações plasmáticas da mesma. Este aumento acima dos níveis normais resulta em hiperglicemia, a característica mais prevalente em pacientes diabéticos e que é responsável pela maioria dos problemas vasculares relacionados ao DM, tais com a retinopatia e a nefropatia diabética (ND) (KUMAR *et al.*, 2005).

Este quadro hiperglicêmico é responsável pelo aumento de adenosina trifosfato (ATP), a mais vital fonte de energia celular para sistemas biológicos. O ATP

no meio extracelular se torna mediador multifacetado de diversas funções celulares através da sua interação com receptores denominados purinérgicos, apresentando respostas autócrinas ou parácrinas (FORBES; COOPER, 2013).

Burnstock e Kennedy (1986) propuseram uma classificação destes receptores purinérgicos, na qual aqueles sensíveis ao ATP foram qualificados de acordo com suas estruturas moleculares, forma de atuação, entre outras características. Assim, foram subdivididos em duas grandes famílias de receptores, P2X e P2Y.

Foram identificados 7 membros da família P2X, sendo o receptor P2X₇ o mais divergente entre eles por possuir diferenças estruturais peculiares: este receptor apresenta região C-terminal mais extensa, a qual quando ativada promove, entre outros efeitos, a abertura de um canal catiônico (VOLONTE *et al.*, 2012).

O receptor P2X₇ é ativado apenas em altas concentrações extracelulares de ATP, isso o relaciona a eventos patológicos como a inflamação, lesão tecidual, agregação plaquetária, trombose e outros efeitos (BARTLETT *et al.*, 2014). Além disso, ao permitir a entrada de cátions, entre eles o cálcio, o P2X₇ se torna forte indutor de apoptose, haja vista que a elevação intracelular deste cátion pode ativar processos bioquímicos tóxicos que culminam na morte celular (ADINOLFI *et al.*, 2005).

A ativação prolongada deste receptor causa o surgimento de poros na membrana que além da entrada excessiva de cálcio permite também a passagem de estruturas com peso molecular de até 900 Da, como o brometo de etídio (394 Da) e o iodeto de propídeo (668 Da) – ambos corantes orgânicos que podem ser absorvidos e que podem auxiliar nas análises de funcionalidade do receptor (PELEGRÍN, 2011). Estes eventos promovem ruptura da membrana plasmática e morte celular por necrose (LIANG, 2005).

Esses receptores P2 ativam diversos eventos fisiológicos e, talvez, estas modulações seriam o “evento chave” para o desenvolvimento de mecanismos patogênicos observados em algumas doenças agudas e crônicas, tanto que há evidências crescentes da ativação do receptor P2X₇ via ATP possa estar envolvida em diversas patologias renais, por exemplo, a nefropatia diabética (SOLINI *et al.*, 2015). Por essa razão, pesquisadores estão estudando ativamente novas estratégias para antagonizar ou bloquear esse receptor.

Chen e colaboradores (2011) utilizando camundongos diabéticos e não obesos (NOD) verificaram que era necessária a presença de receptores P2X₇ para promover o desenvolvimento mais rápido de DM tipo 1, visto que este receptor modulava parte da resposta imune causando inflamação e destruição tecidual.

Rodrigues e colaboradores (2014) usando modelos experimentais de DM tipo 1 conseguiram demonstrar forte relação entre o estresse oxidativo e o aumento de P2X₇ nos rins de ratos diabéticos, sugerindo que a manutenção da homeostase redox possa inibir esse receptor. Desta maneira, o P2X₇R se torna alvo para o desenvolvimento de supressores que venham atuar como coadjuvantes no tratamento da nefropatia diabética.

2. OBJETIVO

Analisar os parâmetros de função renal, lesão renal, homeostase oxidativa e correlacioná-los com o conteúdo proteico de P2X₇ encontrado no córtex renal com na fase precoce do diabetes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todo o projeto foi realizado utilizando as dependências do Laboratório de Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo, como da disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sendo registrado sob nº CEUA 6145060416.

Ratos Wistar machos com 7 semanas de idade foram obtidos do Biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Nesse mesmo dia ocorreu a pesagem e estes animais foram alocados em caixas coletivas, respeitando as normas do Biotério do Laboratório da Disciplina de Nefrologia (biotério 20) que permitem o número máximo de 4 animais por caixa. Este biotério apresenta temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ambiente com períodos regulares de claro e escuro de 12:12 horas, a partir das 06 horas da manhã. Receberam ração padrão LABINA, PURINA® e água *ad libitum*, sendo que a primeira semana foi a semana de adaptação destes ao ambiente.

Nefrectomia

Com o intuito de acelerar o desenvolvimento da nefropatia diabética, a nefrectomia unilateral foi realizada em todos os animais. Para este procedimento, os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (65mg/kg) (Dopalen®, Sesp, Brasil) e cloridrato de xilasina (9mg/kg) (Xilazina®, Rhobiofarma, Brasil), (ambas i.m.), logo a seguir foram tricotomizados e a limpeza da pele foi realizada com álcool etílico 70%.

A seguir, foi feita pequena incisão de aproximadamente 2 cm na região lombar e o rim esquerdo – como padronizado em nosso Laboratório – foi removido. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis e os animais permaneceram em durante uma semana. Na recuperação dos animais foi administrado analgésico opióide não esteroide – Maxicam (2mg/kg) (Maxicam®, Ouro Fino, Brasil), uma vez ao dia durante 2 dias, aplicado via subcutânea.

Indução do diabetes mellitus

Os ratos foram submetidos à uma única administração de estreptozotocina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na veia caudal na dose 60mg/kg de peso corporal, dissolvida em 0,1M de tampão citrato com pH 4,5; os animais controle receberam apenas o veículo da droga. O DM foi confirmado 48 horas após indução, sendo definido através da glicemia de jejum acima de 200mg/dL medidos por glicosímetro; os animais que falharam a esse critério foram excluídos. Formaram-se assim dois grupos: DM e controle, com n=5 ratos por grupo por semana.

Gaiola metabólica

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas na semana de confirmação do diabetes (momento basal) e ao longo das oito semanas de protocolo para a coleta de urina de 24 horas. Água e ração foram fornecidos *ad libitum*.

Posteriormente a retirada dos animais, a glicemia após jejum de 3 horas foi aferida por glicosímetro (Accu-Chek® Performa; Roche; Brasil). Neste procedimento, realizamos pequena punção na porção mais distal da cauda dos ratos com agulha descartável nas dimensões de 13 x 0,45 mm (Descarpac; São Paulo; Brasil). A gota de sangue proveniente desta punção era colocada no *slot* das tiras (Accu-Chek® Active; Roche; Brasil) e o valor da glicemia, mostrado no visor do aparelho.

Em seguida, os mesmos foram anestesiados com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilasina, para a coleta de sangue via plexo retro orbital, visto que essa via permite a retirada de pequenas quantidades de sangue. As amostras coletadas foram centrifugadas, aliquotadas e o plasma foi armazenado em freezer -20°C para posteriores análises bioquímicas.

Eutanásia

Os animais foram eutanasiados semanalmente no dia seguinte às gaiolas metabólicas recebendo doses maiores de anestésico que àquelas utilizadas no procedimento padrão. Assim, foram utilizados cloridrato de quetamina (130mg/kg) e cloridrato de xilasina (20mg/kg), via intramuscular. Os animais anestesiados passaram pelo processo de incisão cardíaca para completar o processo de

eutanásia e o rim remanescente extraído e armazenado em freezer -80°C para as devidas análises.

Função renal

Creatinina e ureia urinárias foram analisadas via kits colorimétricos correspondentes (CREATININA, Labtest, Brasil; UREA CE, Labtest, Brasil; respectivamente), seguindo as especificações do fabricante. As aferições foram realizadas em leitor de ELISA (*Sinergy HT, Biotek Instruments, Winooski, USA*).

Proteinúria

A presença de lesão renal foi averiguada através das análises de proteinúria via kit colorimétrico. (SENSIPROT, Labtest, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. As aferições foram realizadas em leitor de ELISA (*Sinergy HT, Biotek Instruments, Winooski, USA*).

Homogenato do córtex renal para TBARS e NO

As amostras de córtex renal foram colocadas em tampão de homogeneização (Tris-HCl 0,01M, Tris-básico 0,01M; KCl 0,2M) e foram processadas em velocidade média por triturador (*Tissuerruptor®*, Qiagen, Hilden, Germany) sob gelo picado. Em seguida, as mostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e armazenado em freezer -80°C.

Estimativa da lipoperoxidação

A peroxidação lipídica foi analisada tendo como base os níveis de malondialdeído (MDA) – um dos produtos finais da lipoperoxidação – através do método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de MDA é calculada através do coeficiente de extinção molar ($1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), nas amostras urinárias, plasmáticas e teciduais. As aferições foram realizadas em leitor de ELISA (*Sinergy HT, Biotek Instruments, Winooski, USA*) (SHIMIZU, 2005).

Dosagem de NO

O NO foi analisado através da reconversão de seus metabólitos – nitrito e nitrato utilizando o *Nitric Oxide Analyzer* (Sievers Instruments, Boulder, USA). Quando o NO é novamente formado, pode reagir com o ozônio, produzindo pequenas partículas de luz que são captadas através do método de quimioluminescência.

Homogenato do córtex renal para Western blot

As amostras de córtex renal foram colocadas em tampão K-HEPES com inibidor de protease e foram processadas em velocidade média por triturador (*Tissueruptor*®, Qiagen, Hilden, Germany) sob gelo picado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 2000g por 15 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e armazenado em freezer -80°C.

Western Blot

As proteínas totais do sobrenadante do homogenato de córtex renal foram determinadas pelo método de *Bradford*. O equivalente a 55µg de proteína de cada amostra foi colocado para correr em gel de poliacrilamida a 10%. Depois da corrida, foi feita a transferência por eletroeluição destas proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (BioRad, São Paulo, Brasil).

Subsequentemente, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado em pó a 10% preparado em tampão TBS-T (20mM Tris; 50mM NaCl; 1,2mM EDTA; tween20 a 0,1%). As membranas foram incubadas overnight com anticorpo policlonal anti P2X₇ (sc-25698/*rabbit*, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA) e com o anticorpo policlonal anti actina (sc-1615/*goat*, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA), diluídos em TBS-T a 1:100 e 1:1000, respectivamente.

Depois da incubação as membranas foram lavadas com tampão de TBS-T (três vezes, 10 minutos cada) e a seguir, incubadas com anticorpo secundário anti *rabbit* (AP132P, Millipore™, São Paulo, Brasil) e anti *goat* (AP106P, Millipore™, São Paulo, Brasil), diluídos em TBS-T a 1:1000 e 1:5000 respectivamente, durante 1 hora em temperatura ambiente.

Após isso, foram realizadas lavagens com tampão TBS-T. As bandas para P2X₇ foram visualizadas pelo método de quimioluminescência (ECL *Western blotting analysis system*; Amersham International, São Paulo, Brasil) e analisado pelo fotodocumentador (*Alience 4.7 Uvitec Cambridge*, Londres, Reino Unido). As expressões relativas de P2X₇ foram analisadas normalizando seus respectivos valores pela actina e foram expressos em porcentagem baseados no grupo controle.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Para análise dos grupos controle e diabéticos de cada semana foi utilizado o Teste T pra os dados paramétricos e teste de Mann-Whitney para os não paramétricos. A análise de variância entre as diferentes semanas nos grupos foi feita por ANOVA de medidas repetidas. Significância definida por $p < 0,05$ para ambos os testes. Utilizamos o software *GraphPad Prisma 5.0* (San Diego, EUA).

4. RESULTADOS

No decorrer do protocolo foram observados o aumento da diurese e da ingestão de água e ração por parte dos animais diabéticos em relação aos animais do grupo controle ao longo das oito semanas de protocolo. Inversamente, nos animais diabéticos, houve redução do peso corporal significativamente na quinta, sexta, sétima e oitava semanas. Os valores referentes à glicemia, como esperado, permaneceram elevados nos animais diabéticos ao longo das oito semanas deste experimento (Apêndice A; Tabela 1).

A ureia plasmática se encontrava significativamente elevada nos animais diabéticos da primeira à sétima semana de protocolo, quando comparados com seus respectivos controles ($67,11 \pm 3,41$ vs $51,27 \pm 9,54$; $66,88 \pm 1,60$ vs $51,35 \pm 7,39$; $76,94 \pm 9,95$ vs $53,14 \pm 8,25$; $79,91 \pm 12,99$ vs $55,33 \pm 7,82$; $83,35 \pm 22,83$ vs $31,82 \pm 8,06$; $81,04 \pm 28,73$ vs $42,84 \pm 7,04$; $73,05 \pm 20,67$ vs $37,22 \pm 4,75$; mg/dL; $p < 0,05$; respectivamente) (Apêndice B; Figura 1A). A excreção urinária de ureia nas 24 horas se encontrava significativamente reduzida em todas as semanas de protocolo, quando os valores do grupo DM eram confrontados com seus respectivos controles ($1491 \pm 165,0$ vs $6988 \pm 467,4$; $817,2 \pm 241,1$ vs $3564 \pm 407,2$; $742,9 \pm 143,0$ vs $3954 \pm 287,5$; $901,6 \pm 267,0$ vs $4133 \pm 139,0$; $671,2 \pm 49,87$ vs $4095 \pm 557,4$; $1699 \pm 236,2$ vs $6555 \pm 963,0$; $1589 \pm 215,2$ vs $5194 \pm 667,1$; $1827 \pm 148,6$ vs $5552 \pm 905,5$; $1111 \pm 72,15$ vs $6658 \pm 557,7$; mg/dL; $p < 0,05$; respectivamente, do momento basal à oitava semana) (Apêndice B; Figura 1B).

Os valores plasmáticos de creatinina se encontravam significativamente reduzidos nos animais diabéticos quando comparados com seus respectivos controles no momento basal, primeira, quarta, sexta e oitava semana ($0,26 \pm 0,03$ vs $0,64 \pm 0,03$; $0,508 \pm 0,1033$ vs $0,79 \pm 0,18$; $0,59 \pm 0,06$ vs $0,89 \pm 0,17$; $0,51 \pm 0,10$ vs $0,95 \pm 0,12$; $0,59 \pm 0,04$ vs $1,04 \pm 0,03$; mg/dL; $p < 0,05$; respectivamente). Houve significativo aumento entre os animais diabéticos da segunda e quarta semanas, quando comparados com o momento basal do protocolo ($0,68 \pm 0,08$; $0,59 \pm 0,06$ vs $0,26 \pm 0,03$, respectivamente) (Apêndice C; Figura 2A). A excreção urinária de creatinina nas 24 horas se encontrava significativamente reduzida em todas as semanas de protocolo, quando os valores do grupo DM eram confrontados com seus respectivos controles ($11,58 \pm 5,01$ vs $83,92 \pm 15,37$; $10,82 \pm 2,94$ vs $77,76 \pm 15,05$;

8,26±3,69 vs 75,63±9,21; 7,11±3,57 vs 80,22±15,90; 10,60±5,57 vs 72,61±10,10; 7,51±3,07 vs 117,90±37,62; 7,95±1,11 vs 113,70±17,58; 10,69±1,60 vs 108,30±22,94; 10,54±3,42 vs 134,70±29,59; mg/dL; $p<0,05$; respectivamente, do momento basal à oitava semana) (Apêndice C; Figura 2B).

A proteinúria estava significativamente elevada a partir da segunda até a oitava semana, nos animais diabéticos, quando comparados com seus respectivos controles (43,81±5,39 vs 22,79±1,74; 36,71±3,00 vs 22,17±1,83; 42,62±6,69 vs 21,79±2,76; 27,58±1,78 vs 21,05±1,85; 28,73±2,38 vs 19,39±2,86; 35,47±3,11 vs 21,43±2,32; 32,42±0,79 vs 18,52±1,43; mg/24 horas; $p<0,05$; respectivamente, da segunda semana à oitava semana de protocolo) (Apêndice D; Figura 3).

Os níveis plasmáticos de TBARS se encontravam significativamente reduzidos na primeira semana de protocolo (2,80±0,20 vs 3,48±0,27; nmol/dL; $p<0,05$) e elevados na quarta e oitava semana quando comparados com seus respectivos controles (2,92±0,21 vs 2,63±0,16; 2,62±0,15 vs 2,40±0,05; nmol/dL; $p<0,05$; respectivamente) (Apêndice E; Figura 4A).

Os níveis da excreção urinária de TBARS nas 24 horas se encontravam significativamente elevada em todas as semanas de protocolo, quando os valores do grupo DM eram confrontados com seus respectivos controles (228,90±32,37 vs 92,24±28,07; 318,60±88,81 vs 76,10±13,74; 428,40±122,70 vs 88,79±10,90; 464,50±116,80 vs 85,19±10,31; 413,30±172,10 vs 114,10±25,54; 353,50±102,00 vs 84,57±11,37; 369,40±76,12 vs 76,23±9,77; 366,40±90,80 vs 78,88±8,14; 393,30±67,03 vs 74,24±13,52; nmol/24 horas; $p<0,05$; respectivamente, do momento basal à oitava semana) (Apêndice E; Figura 4B).

Os níveis renais de TBARS se encontravam significativamente elevados na primeira, segunda e oitava semana de protocolo quando comparados com seus respectivos controles (1,26±0,19 vs 0,91±0,003; 1,04±0,02 vs 0,93±0,05; 1,20±0,26 vs 0,79±0,10; nmol/mg de proteína; $p<0,05$; respectivamente) (Apêndice E; Figura 4C).

Não houveram alterações significantes nos níveis plasmáticos de NO (Apêndice F; Figura 5A). A excreção urinária de NO nas 24 horas se apresentou reduzida em todo experimento nos animais diabéticos quando comparados com seus respectivos controles, mas sua significância foi alcançada na quinta semana de

protocolo ($0,0352 \pm 0,0070$ vs $0,1418 \pm 0,0031$; nmol/24 horas; $p < 0,05$). (Apêndice F; Figura 5B). Os valores renais de NO se apresentaram significativamente reduzidos segunda semana e elevados na quarta e sexta semana quando comparados com seus respectivos controles ($88,11 \pm 11,51$ vs $160,20 \pm 31,82$; $130,90 \pm 13,02$ vs $106,40 \pm 31,06$; $147,30 \pm 31,32$ vs $82,05 \pm 13,92$; nmol/mg proteína; $p < 0,05$; respectivamente) (Apêndice F; Figuras 5C).

Neste estudo foi observada elevação significativa do conteúdo proteico de P2X₇ nos animais do grupo DM na oitava semana, quando comparado com seu respectivo controle ($1,02 \pm 0,04$ vs $0,80 \pm 0,10$). Também foi observado elevação significativa na segunda, quarta, quinta e sexta semanas, em comparação com o grupo DM da primeira semana ($1,02 \pm 0,31$; $1,15 \pm 0,21$; $1,06 \pm 0,10$; $1,08 \pm 0,07$ vs $0,34 \pm 0,13$; respectivamente) (Apêndice G; Figura 6A). O delta do conteúdo proteico deste receptor apresenta seus maiores valores na sexta e oitava semanas quando comparados com a primeira semana ($0,28 \pm 0,12$; $0,21 \pm 0,05$ vs $-0,20 \pm 0,09$; respectivamente) (Apêndice G; Figura 6B). Os valores foram quantificados com base nas imagens obtidas através da fotodocumentação das membranas de *Western blot* (Apêndice G; Figura 6C).

Não observados correlação entre o delta do conteúdo proteico de P2X₇ e a excreção urinária de creatinina, ureia plasmática, proteinúria, TBARS urinário e tecidual, e NO tecidual (r de *Spearman* = $-0,1429$; $0,0476$; $-0,2857$; $-0,0714$; $0,1429$; $0,0476$; respectivamente; ambos não significantes). Foram identificadas correlações fracas entre o delta do conteúdo proteico de P2X₇ e creatinina, TBARS e NO plasmáticos e excreção urinária de ureia, (r de *Spearman* = $0,4524$; $0,3095$; $0,3810$; $0,4048$, respectivamente) e uma significativa correlação forte com NO urinário (r de *Spearman* = $0,7381$; $p = 0,0458$).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, os animais diabéticos apresentaram sinais característicos da doença, como a poliúria (HEBERT; NAIR, 2010), polifagia e polidipsia (SIPOLS *et al.*, 1995) na confirmação do DM e estes sinais foram se acentuando com o decorrer das semanas. Ao longo das oito semanas, os animais diabéticos mantiveram elevados valores de glicemia e apresentaram redução de massa corporal como é característico do DM tipo 1, quando comparados com animais saudáveis. (SILVERSTEIN *et al.*, 2005)

Segundo Szkudelski (2001), a estreptozocina é um fármaco que possui afinidade pelas células β -pancreáticas, promovendo danos ao DNA pela alquilação ou pela formação de espécies reativas de oxigênio, reduzindo o número de células funcionais, com consequente redução na produção de insulina, resultando no quadro de hiperglicemia característico do DM.

Sabe-se que o DM é uma doença crônica que pode causar danos a vários tecidos, sendo a ND a complicação mais comum entre os pacientes diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

Com base nisto, avaliamos a função renal, com as dosagens de ureia – um composto que é filtrado e reabsorvido nos túbulos contorcidos proximais dos néfrons (NAUTA *et al.*, 2011). Observamos que os animais do grupo DM possuíam redução nos níveis de ureia urinária; inicialmente pensamos que os túbulos pudessem estar danificados, mas estudos anteriores de nosso Laboratório (PUNARO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2011) mostraram que os animais diabéticos desenvolviam degeneração glicosídica e processos de vacuolização tubular, o que prejudicaria todo o processo de reabsorção da ureia, elevando assim seus níveis urinários, e ainda, sugerimos que a retenção da ureia está a nível glomerular, na qual ocorreria diminuição da filtração, fazendo com que a mesma se acumulasse na porção plasmática (MAEZAWA *et al.*, 2015).

Para confirmar estes achados, buscamos utilizar outro marcador da filtração glomerular, a creatinina. Esta foi escolhida por ser um produto do metabolismo do fosfato de creatina encontrado no músculo (HEBERT; NAIR, 2010), sendo produzida constantemente (PATEL *et al.*, 2013). A creatinina, em situações onde não há danos

renais é livremente filtrada e secretada, não sofrendo processos de reabsorção tubular. (LOPEZ-GIACOMAN; MADERO, 2015).

A redução na excreção de creatinina na urina pode ocorrer em casos de uremia, alterações glomerulares e tubulares (GOWDA *et al.*, 2010). A redução nos níveis de creatinina plasmática encontrada nos animais diabéticos quando comparados com seus respectivos controles, pode ser explicada pela drástica redução de peso observada ao longo das oito semanas de protocolo. Harita *et al.* (2009) em um estudo com pacientes diabéticos, encontraram relação entre os baixos níveis de creatinina sérica e a diminuição do volume de músculo esquelético – um dos tecidos com maior relevância na ação insulínica.

A hiperglicemia promove alterações glomerulares que colaboram com a redução na função renal, como o espessamento da membrana basal, hialinose e a perda dos podócitos - estruturas que são reguladas pela insulina e que auxiliam no controle da permeabilidade glomerular (COWARD; FORNONI, 2015). Tais modificações podem resultar na presença de proteinúria, como achado de doença renal. (VIBERTI; KEEN, 1984). Neste estudo, identificamos excreção urinária de proteína de maneira persistente e redução da função renal mostrada pela ureia e creatinina, o que colabora com o desenvolvimento da ND (GROSS *et al.*, 2005).

Com base nestes resultados, buscamos encontrar respostas para elucidar o que causaria as lesões glomerulares nos animais deste protocolo, sabendo que a hiperglicemia é responsável pela glicação não enzimática de proteínas e lipídeos. Estas glicações não-enzimáticas promovem rearranjos moleculares que resultam na geração de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) (OLENIUC *et al.*, 2011). Estes produtos quando formados podem ser responsáveis pela patofisiologia micro e macrovascular do diabetes (GOLDIN *et al.*, 2006) ao gerar ligações cruzadas através da interação com receptores específicos (RAGEs) (WAUTIER *et al.*, 1994).

A interação dos AGEs com seus receptores promove a alteração de diversas funções celulares, como o elevado consumo das enzimas NADPH (THALLAS-BONKE *et al.*, 2008). Estas servem como co-fator na geração de glutathiona reduzida (GSH), enzima responsável pela remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A elevada produção de ROS na ausência desta enzima, afeta o equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes estabelece uma situação de estresse oxidativo,

causando danos oxidativos e redução nos níveis de NO (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

O produto destes danos são as substâncias denominadas TBARS. Neste estudo, foi observada a elevação nos níveis urinários destas substâncias, confirmando a perda do equilíbrio oxidativo com a alta produção de ROS. Isso corrobora com os achados de Fernandes *et al.* (2016) o qual foi utilizado um protocolo de DM semelhante ao nosso. A maior produção de ROS está envolvida no rápido desenvolvimento da ND através de danos causados à membrana basal, ao endotélio e aos podócitos, além da ativação de citocinas pró-inflamatórias. (FAKHRUDDIN; ALANAZI; JACKSON, 2017). Outros autores (TSURUTA *et al.*, 2010) também enfatizam que as ROS – em especial o ânion superóxido (O_2^-) – poderiam causar o sequestro de óxido nítrico (NO), reduzindo a concentração deste e levando ao surgimento de outros radicais como o peróxido nitrito ($^{\cdot}OONO$). (HUIE; PADMAJA, 1993).

O NO é um radical livre que atua em diversos processos biológicos (Bucala *et al.*, 1991) como neurotransmissor, evitando agregação plaquetária e promovendo a homeostase vascular por ser um potente vasodilatador (TOUSOULIS *et al.*, 2012). Esta molécula é formada indiretamente a partir da degradação de L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima possui três isoformas que atuam em níveis neuronais, endoteliais e na resposta imune (TESSARI *et al.*, 2010). O desacoplamento da isoforma endotelial está correlacionada com diversas patologias, dentre elas o diabetes, resultando na não produção de NO e síntese de O_2^- , agravando ainda mais o estresse oxidativo (LUIKING *et al.*, 2010). Tal indicador pode ser observado neste trabalho através da redução nos níveis urinários de NO.

Com o desenvolver do DM, notamos a elevação nos níveis proteicos de P2X₇ renal logo na segunda semana, momento que coincidiu com o aumento da proteinúria. Tal achado corrobora com os resultados de Vonend *et al.* (2004), que observaram elevação no conteúdo proteico de P2X₇ na região glomerular em ratos diabéticos. Booth (2014) aponta para o aumento na expressão do receptor P2X₇ em protocolo com roedores diabéticos na 12^a semana, e que este receptor poderia estar envolvido na progressão da ND ativando processos inflamatórios. Em nosso trabalho, observamos o aumento significativo na expressão deste receptor já na sexta semana.

Sugerimos que o aumento na concentração de ATP poderia ativar este receptor permanentemente, levando à ativação de mecanismos citotóxicos ou pró-apoptóticos, reduzindo o número de células endoteliais viáveis com consequente redução da função renal, visto que o receptor P2X₇ também pode ser encontrado no endotélio das artérias pré-glomerulares e arteríolas aferentes (SATHANOORI *et al.*, 2015). Em condições normais, este receptor atuaria como um canal de íons, resultando em aumento na produção de NO (MENZIES *et al.*, 2015).

Outro agravante, é que estudos mais recentes (KREFT *et al.*, 2016) mostram que a adenosina – produto da desfosforilação do ATP – pode promover uma provável ativação alostérica de receptores P2X₇, resultando em modificações da vasculatura renal, aumento do fluxo sanguíneo cortical e redução da taxa de filtração glomerular. A alteração no funcionamento de algumas enzimas responsáveis pela hidrólise de ATP à adenosina, como a NTPDase e 5' nucleotidase, já foi documentado em experimentos *in vivo* (LARSEN *et al.*, 2005) e *in vitro* (COSTA *et al.*, 2009), sendo que estas modificações resultam no aumento da concentração de adenosina.

Estes dados corroboram com a pesquisa mais recente de Menzies *et al.* (2017) que mostram que ratos com deficiência na expressão de receptores P2X₇, ou que eram tratados com um bloqueador altamente específico para este receptor, com isso, havia redução no acúmulo de macrófagos nesta região, reduzindo o quadro de danos por conta da inflamação e paliando o desenvolvimento da ND.

6. CONCLUSÃO

Sugerimos que a hiperglicemia seja, em um primeiro momento, a responsável por causar as lesões renais e os danos oxidativos, além de causar o aumento na produção proteica dos receptores P2X₇ por conta da alta concentração de ATP extracelular. Este receptor quando ativado, poderia potencializar eventos inflamatórios causando maior progressão da nefropatia diabética. Ademais, o receptor P2X₇ pode estar correlacionado com a disfunção endotelial, uma vez que a sua alta incidência revelou baixas concentrações de óxido nítrico. Assim sendo, a utilização de inibidores destes receptores podem ser um potencial alvo terapêutico na melhora da função renal e redução dos danos vistos em uma situação de nefropatia diabética.

REFERÊNCIAS

ADINOLFI, E. et al. P2X(7) receptor: Death or life? **Purinergic Signalling**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 219-227, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2096546/> >.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35 Suppl 1, p. S64-71, Jan 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187472> >.

BARTLETT, R.; STOKES, L.; SLUYTER, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 3, p. 638-75, Jul 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24928329> >.

BOOTH, J W R. **An investigation of the role of the P2X7 purinoceptor in the pathogenesis of diabetic nephropathy**. 2014. Disponível em: <<http://discovery.ucl.ac.uk/1417097/>>

BUCALA, R.; TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 2, p. 432-438, 1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295094/> >.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. **Circ Res**, v. 58, n. 3, p. 319-30, Mar 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3013455> >.

CHEN, Y. G. et al. Testing the role of P2X7 receptors in the development of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol**, v. 186, n. 7, p. 4278-84, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357538> >.

COSTA, G. et al. High glucose changes extracellular adenosine triphosphate levels in rat retinal cultures. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 6, p. 1375-80, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084903> >.

COWARD, R.; FORNONI, A. Insulin signaling: implications for podocyte biology in diabetic kidney disease. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 24, n. 1, p. 104-110, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386894/> >.

FAKHRUDDIN, Selim; ALANAZI, Wael; JACKSON, Keith E.. Diabetes-Induced Reactive Oxygen Species: Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury. **Journal Of Diabetes Research**, [s.l.], v. 2017, p.1-30, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8379327>.

FERNANDES, Sheila Marques et al. The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Archives Of Endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 60, n. 5, p.443-449, out. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2359-3997000000188>.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 137-88, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303908> >.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M.. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.1058-1070, 28 out. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.110.223545>.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16894049> >.

GOWDA, S. et al. Markers of renal function tests. **North American Journal of Medical Sciences**, India, v. 2, n. 4, p. 170-173, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3354405/> >.

GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 164-76, Jan 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616252> >.

HARITA, N. et al. Lower serum creatinine is a new risk factor of type 2 diabetes: the Kansai healthcare study. **Diabetes Care**, v. 32, n. 3, p. 424-6, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074997> >.

HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. **Clin Nutr**, v. 29, n. 1, p. 13-7, Feb 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788950> >.

HUIE, R. E.; PADMAJA, S. The reaction of no with superoxide. **Free Radic Res Commun**, v. 18, n. 4, p. 195-9, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396550> >. x

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 7. ed., 2015. 140 p.

KREFT, E. et al. Renal vasculature reactivity to agonist of P2X7 receptor is increased in streptozotocin-induced diabetes. **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 1, p. 71-4, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26721355> >.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 2005.

LARSEN, K. I. et al. Glucose is a key metabolic regulator of osteoclasts; glucose stimulated increases in ATP/ADP ratio and calmodulin kinase II activity. **Biochem Cell Biol**, v. 83, n. 5, p. 667-73, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16234856> >.

LIANG, L.. Large pore formation uniquely associated with P2X7 purinergic receptor channels. Focus on. **Ajp: Cell Physiology**, [s.l.], v. 288, n. 2, p.240-242, 1 fev. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00532.2004>.

LOPEZ-GIACOMAN, S.; MADERO, M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 57-73, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317628/> >.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P.; DEUTZ, N. E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 1, p. 97-104, Jan 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841582> >.

MAEZAWA, Y.; TAKEMOTO, M.; YOKOTE, K. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes. **J Diabetes Investig**, v. 6, n. 1, p. 3-15, Jan 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621126> >.

MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 792-8, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742411> >.

MENZIES, R. I. et al. Hyperglycemia-induced Renal P2X7 Receptor Activation Enhances Diabetes-related Injury. **EBioMedicine**, v. 19, p. 73-83, 2017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28434946> >.

MENZIES, R. I. et al. P2X7 receptor antagonism improves renal blood flow and oxygenation in angiotensin-II infused rats. **Kidney international**, v. 88, n. 5, p. 1079-1087, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4826596/> >.

NAUTA, F. L. et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 4, p. 975-81, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307379> >.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1513-1530, 2016. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8) >. Acesso em: 2017/08/30.

OLENIUC, M. et al. Consequences of Advanced Glycation End Products Accumulation in Chronic Kidney Disease and Clinical Usefulness of Their Assessment Using a Non-invasive Technique - Skin Autofluorescence. **Maedica (Buchar)**, v. 6, n. 4, p. 298-307, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22879845> >.

PATEL, S. S. et al. Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, n. 1, p. 19-29, Mar 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777757> >.

PELEGRÍN, Pablo. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 163, n. 5, p.908-911, 8 jun. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01325.x>.

PUNARO, G. R. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p. 53-60, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406684> >.

RODRIGUES, A. M. et al. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 236, n. 10, p. 1180-7, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930716> >.

RODRIGUES, A. M. et al. P2X(7) receptor in the kidneys of diabetic rats submitted to aerobic training or to N-acetylcysteine supplementation [corrected]. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e97452, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24940871> >.

SATHANOORI, Ramasri et al. The ATP Receptors P2X7 and P2X4 Modulate High Glucose and Palmitate-Induced Inflammatory Responses in Endothelial Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.1-24, 4 maio 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125111>.

SHIMIZU, Maria Heloisa Massola. **A N-Acetilcisteína Atenua A Progressão da Doença Renal Crônica**. 2005. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde.../MariaHeloisaMassolaShimizu.pdf>. Acesso em: 21 out. 2017.

SILVERSTEIN, J. et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 186-212, Jan 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616254> >.

SIPOLS, A. J.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. **Diabetes**, v. 44, n. 2, p. 147-51, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7859932> >.

SOLINI, A.; USUELLI, V.; FIORINA, P. The dark side of extracellular ATP in kidney diseases. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, n. 5, p. 1007-16, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452669> >.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829314> >.

TESSARI, P. et al. Nitric Oxide Synthesis Is Reduced in Subjects With Type 2 Diabetes and Nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 9, p. 2152-2159, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927936/> >.

THALLAS-BONKE, V. et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 460-9, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959934> >.

TOUSOULIS, D. et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 10, n. 1, p. 4-18, Jan 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112350> >.

TSURUTA, R. et al. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. **Brain Res**, v. 1309, p. 155-63, Jan 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891961> >.

VIBERTI, G.; KEEN, H. The patterns of proteinuria in diabetes mellitus. Relevance to pathogenesis and prevention of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 33, n. 7, p. 686-92, Jul 1984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6376224> >.

VOLONTE, C. et al. P2X7 receptors: channels, pores and more. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 705-21, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963440> >.

VONEND, Oliver et al. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X7 receptor in diabetic and hypertensive rat models. **Kidney International**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.157-166, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00717.x>.

WAUTIER, J. L. et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 16, p. 7742-6, 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8052654> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Reports on Diabetes**. ORGANIZATION, W. H.: 88 p. 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela de dados metabólicos

Tabela 1 – Dados metabólicos ao longo das oito semanas de protocolo

Semanas	CTL 0	DM 0	CTL 1	DM 1	CTL 2	DM 2	CTL 3	DM 3	CTL 4	DM 4
Água	30,48 ± 1,01	96,2 ± 26,88*	35,6 ± 8,41	136,8 ± 40,33*	36,6 ± 5,94	162,6 ± 47,21*	36,6 ± 6,84	163 ± 43,45*	40,4 ± 9,07	159,4 ± 40,81*
Ração	19,86 ± 1,64	15,76 ± 1,36*	21,16 ± 2,63	31,22 ± 5,35*	21,7 ± 2,22	31,62 ± 7,68*#	20,78 ± 2,24	34,44 ± 5,34*#	20,82 ± 1,89	34,22 ± 3,54*
Peso	248,4 ± 17,99	235,2 ± 6,58	262,2 ± 22,57	247,6 ± 18,8	181,9 ± 23,16	230,7 ± 41,75	238,2 ± 56,08	196,6 ± 62,09	305,5 ± 24,68	272,3 ± 40,72
Diurese	13,76 ± 3,24	80,1 ± 22,03*	15,4 ± 2,65	106,2 ± 33,19*	16,8 ± 3,09	128,6 ± 40,21*	16 ± 2,76	132 ± 32,48*	17,4 ± 7,02	107,9 ± 30,94*
Glicemia	115 ± 9,72	375 ± 116*	107,6 ± 13,46	370,6 ± 104,9*	100,6 ± 7,16	363,4 ± 119,5*	101,6 ± 6,42	446,2 ± 67,16*	103,2 ± 3,27	447,8 ± 73,52*

Semanas	CTL 5	DM 5	CTL 6	DM 6	CTL 7	DM 7	CTL 8	DM 8
Água	30,6 ± 5,36	154,4 ± 39,42*	21,8 ± 1,48	144,8 ± 19,46*	32,28 ± 3,28	152,1 ± 54,35*	31,8 ± 8,25	151,4 ± 27,84*
Ração	17,32 ± 1,94	26,72 ± 5,16*	16,74 ± 1,75	25,34 ± 5,03*	17,28 ± 1,63	31,08 ± 6,49*	14,7 ± 1,52	31,6 ± 1,54*
Peso	348,3 ± 33,18	204,2 ± 39,81*	337,2 ± 16,31	202 ± 42,18*	347,8 ± 32,65	223 ± 40,3*	371,5 ± 41,86	182,5 ± 36*
Diurese	15,4 ± 5,34	114,9 ± 29,74*	13,94 ± 2,89	116,7 ± 27,3*	14,1 ± 2,35	111 ± 32,47*	13,7 ± 4,86	120,8 ± 31*
Glicemia	103 ± 5,47	490 ± 101,7*	107,6 ± 13,07	509,4 ± 125,6*	106,4 ± 7,70	484,2 ± 103,1*	82 ± 42,22	502,6 ± 76,86*

Parâmetros metabólicos analisados ao longo das oito semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos ou Teste-T não pareado para dados paramétricos (este aplicado apenas ao parâmetro “peso”) * vs. respectivo grupo controle. RM-ANOVA com pós-teste de Friedman # vs. semana 0. $p<0,05$ para ambos.

APÊNDICE B – Dados bioquímicos de ureia urinária e plasmática

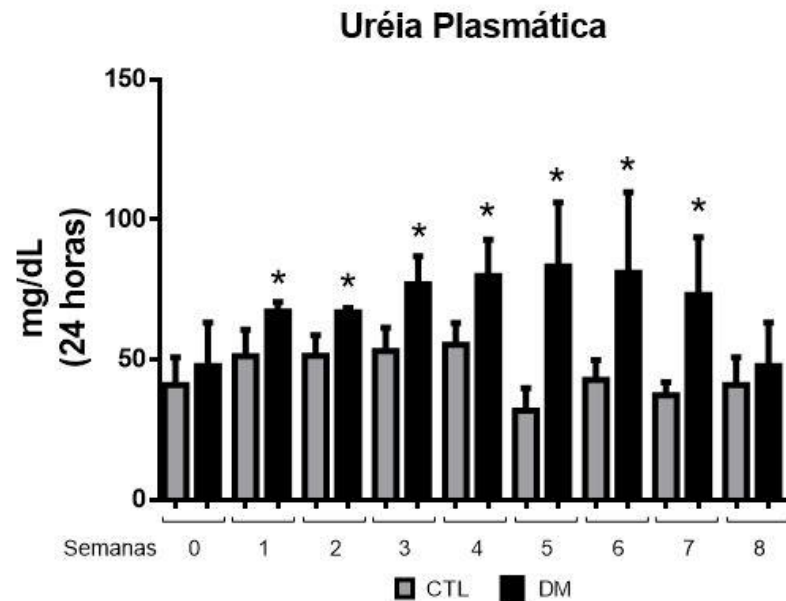


Figura 1A - Ureia plasmática ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

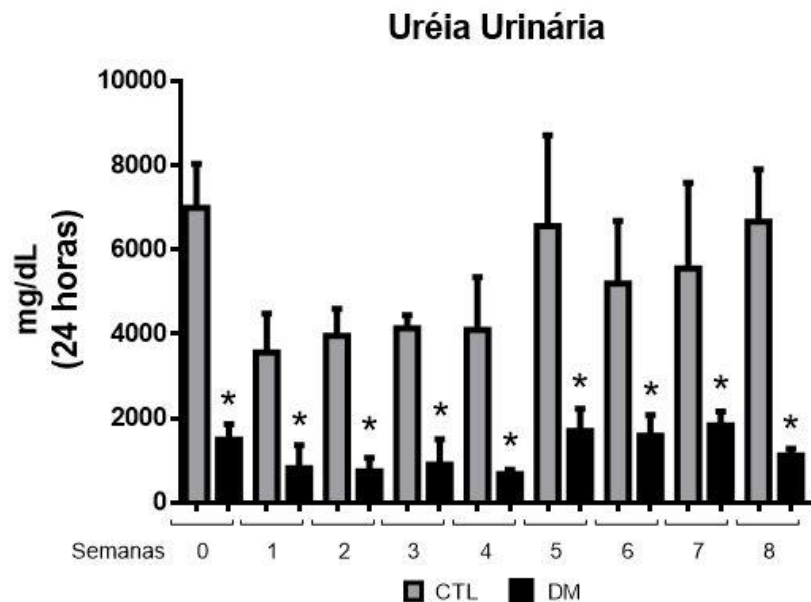


Figura 1B - Ureia urinária ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

APÊNDICE C – Dados bioquímicos de creatinina urinária e plasmática

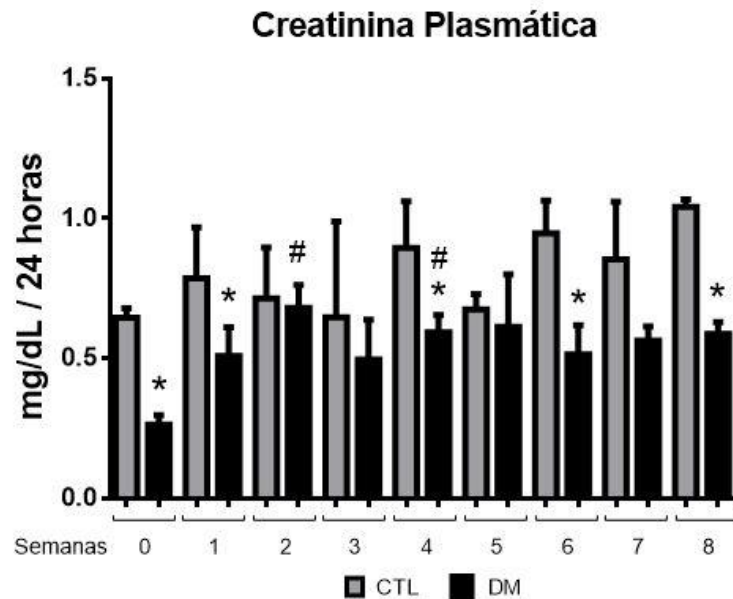


Figura 2A - Creatinina plasmática ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste-T não pareado com correção de Welch; * vs. respectivo grupo controle. ANOVA de comparações múltiplas; # vs. grupo DM da semana 0; $p<0,05$ para ambos.

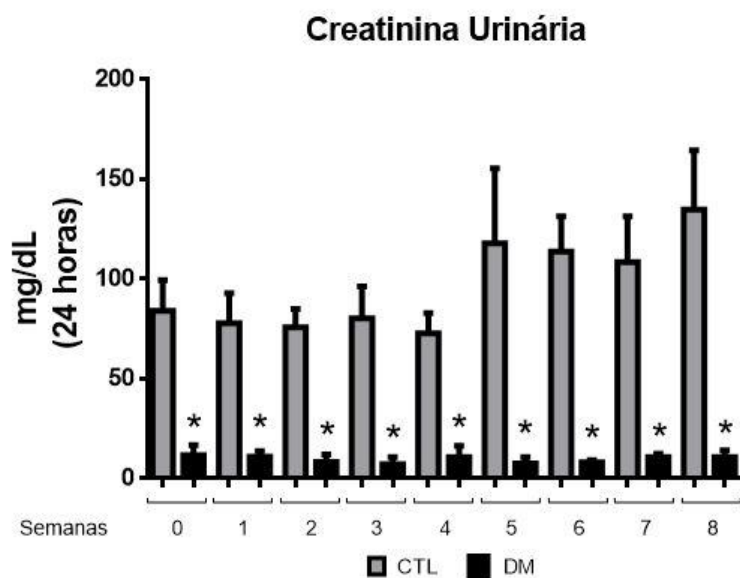


Figura 2B - Creatinina urinária ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

APÊNDICE D – Dados bioquímicos de proteinúria

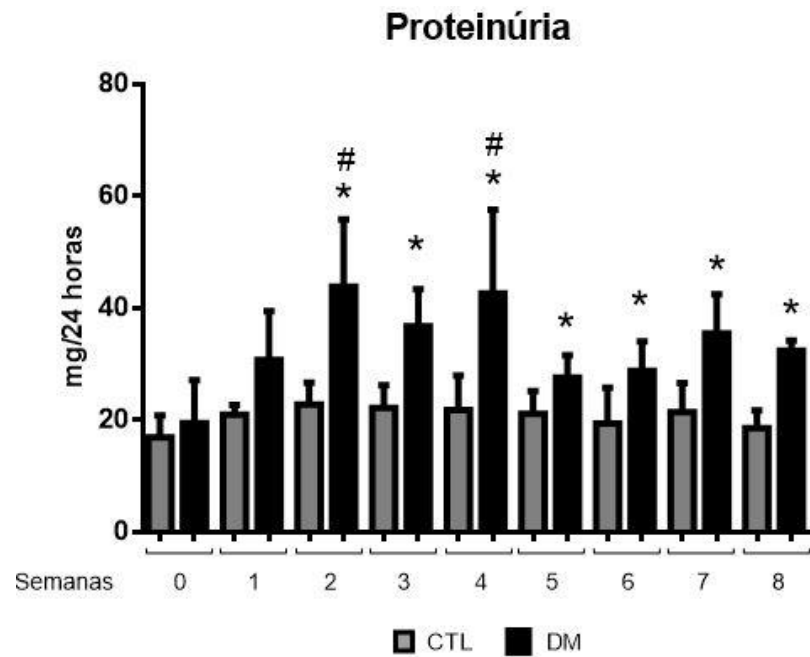


Figura 3 - Proteinúria ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste-T não pareado com correção de Welch; * vs. respectivo grupo controle. ANOVA de comparações múltiplas; # vs. grupo DM da semana 0; $p<0,05$ para ambos.

APÊNDICE E – Dados bioquímicos de TBARS urinário, plasmático e tecidual

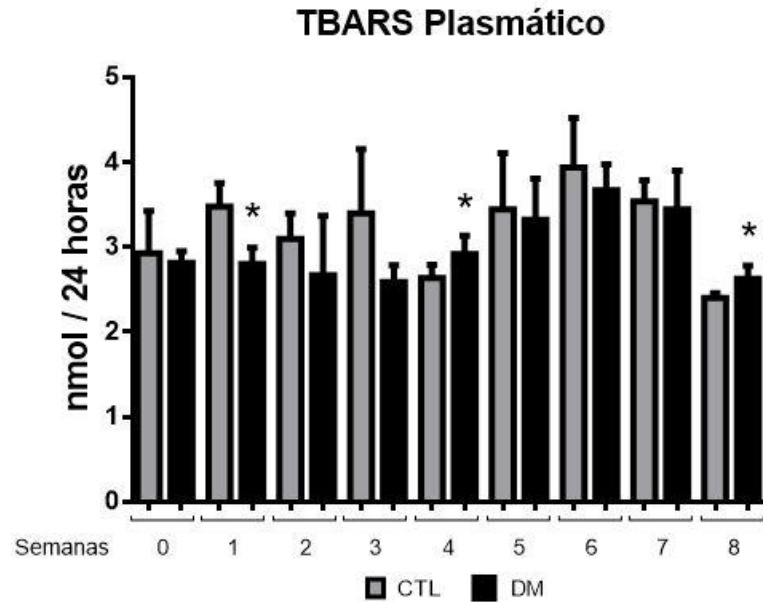


Figura 4A - TBARS plasmático ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

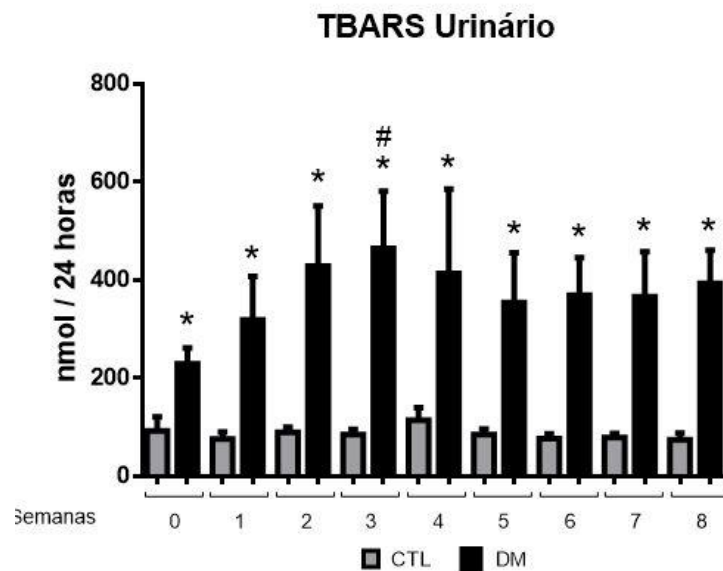


Figura 4B - TBARS urinário ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle. ANOVA de comparações múltiplas; # vs. grupo DM da semana 0; $p<0,05$ para ambos.

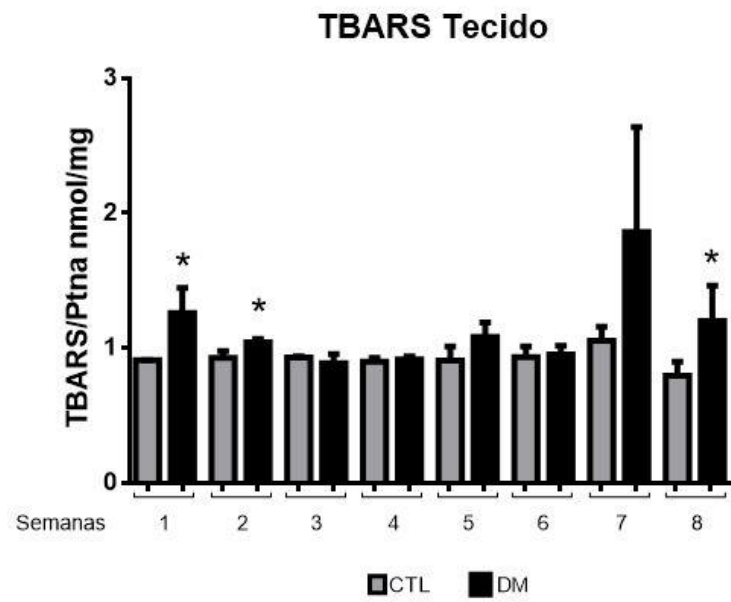


Figura 4C - TBARS tecidual ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

APÊNDICE F – Dados bioquímicos de NO urinário, plasmático e tecidual

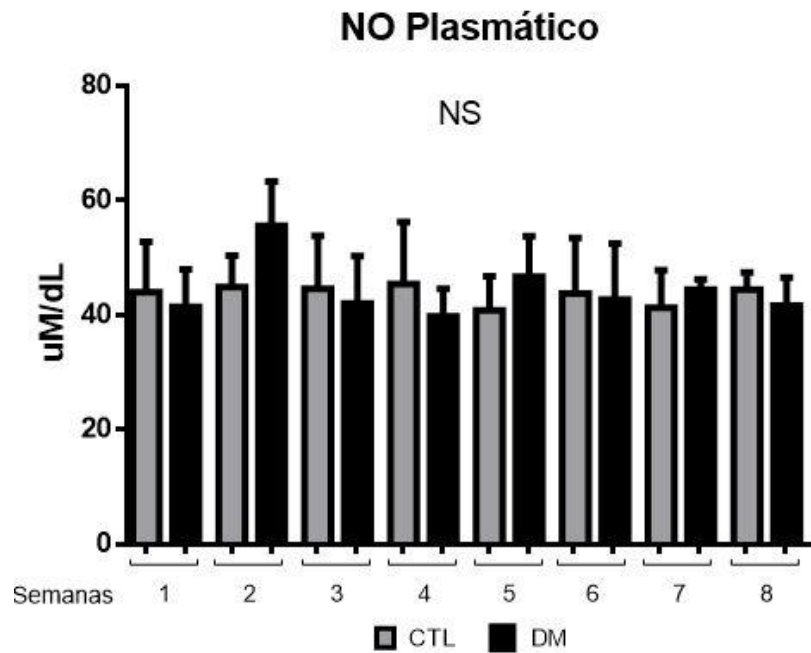


Figura 5A – NO plasmático ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

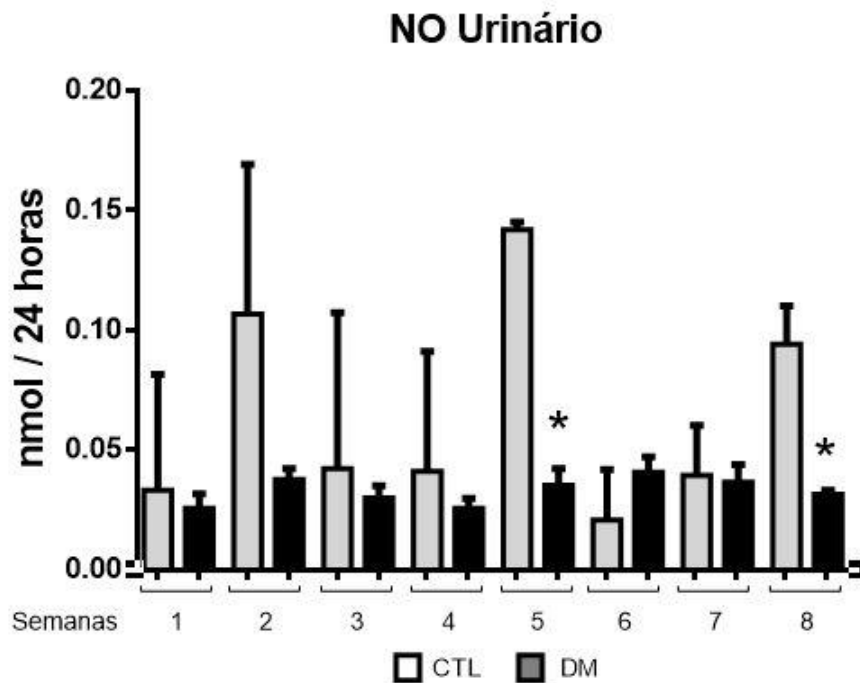


Figura 5B – NO urinário ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

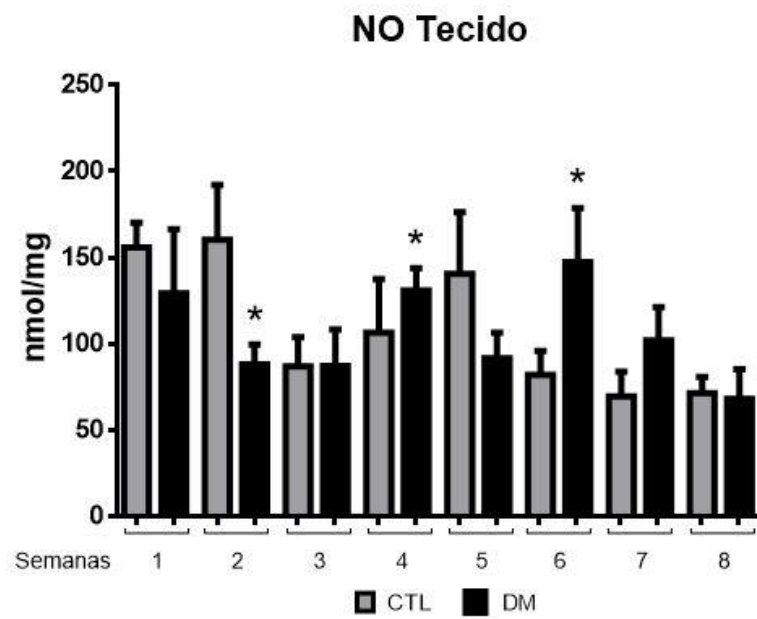


Figura 5C – NO plasmático ao longo das 8 semanas de protocolo. $n=5$ por semana, por grupo. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle; $p<0,05$.

APÊNDICE G – Avaliação do conteúdo proteico de P2X7

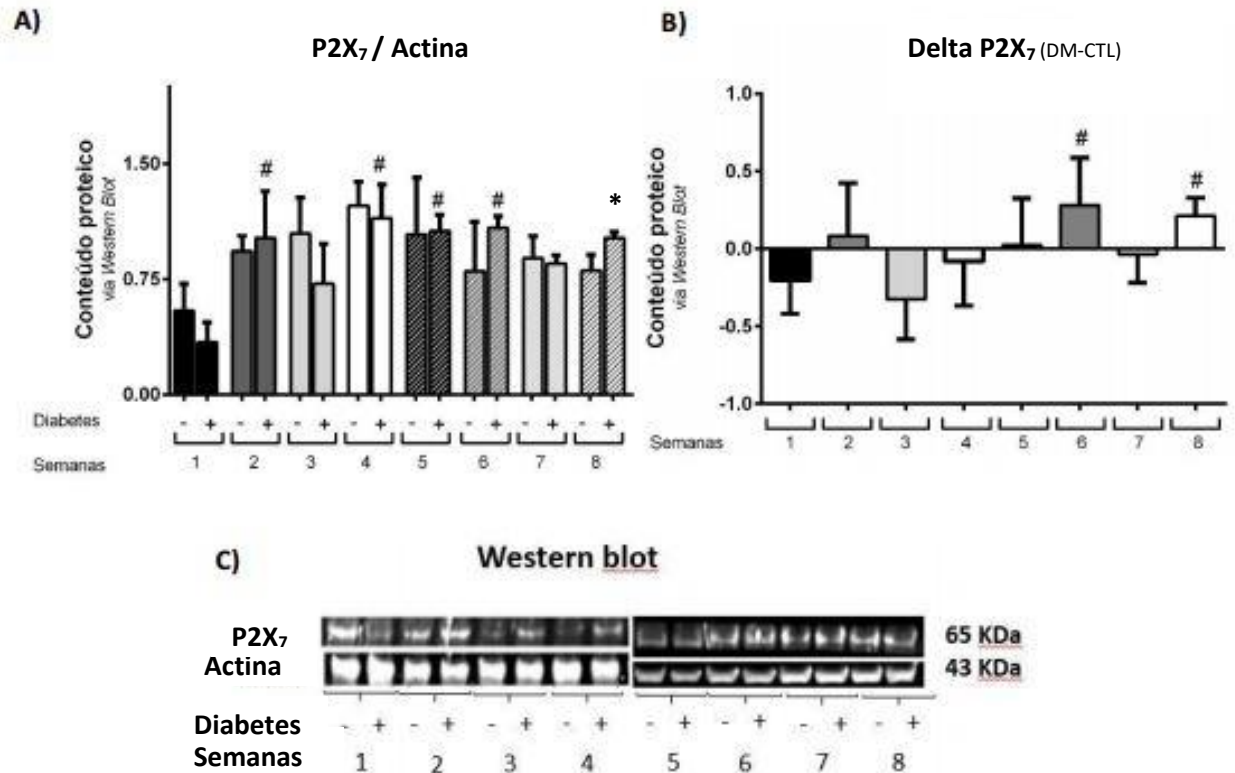


Figura 6 – Quantificação do conteúdo proteico de P2X₇. $n=5$ por semana, por grupo, em duplicata, três experimentos. **A)** P2X₇ corrigido pela actina. **B)** Delta do conteúdo proteico de P2X₇. **C)** Imagem representativa da técnica de *Western blotting*. Teste de Mann-Whitney; * vs. respectivo grupo controle. RM-ANOVA com pós-teste de Friedman; # vs. primeira semana de protocolo; $p<0,05$ para ambos.