

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Camila Farias**

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O RECEPTOR P2X<sub>7</sub> E  
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA PROGRESSÃO DA  
NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATOS**

**São Paulo**

**2018**

**Camila Farias**

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O RECEPTOR P2X<sub>7</sub> E  
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA PROGRESSÃO DA  
NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo, e coorientado pela Dr.<sup>a</sup> Giovana Rita Punaro, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2018**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani**

Farias, Camila

Estudo da correlação entre o receptor P2X7 e marcadores inflamatórios na progressão da nefropatia diabética em ratos/ Camila Farias. – São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.  
45 p.

Orientação de Maria Anete Lallo

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Diabetes Mellitus 2. Inflamação 3. Ratos B 4. Receptores purinérgicos P2X7 5. Rim I. Lallo, Maria Anete II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.462

**Camila Farias**

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O RECEPTOR P2X<sub>7</sub> E  
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA PROGRESSÃO DA  
NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATOS**

São Paulo, 24 de Maio de 2018.

---

Professor Orientador - Profa. Dra. Maria Anete Lallo

---

Professor Examinador - Prof. Dr. Adriano Pereira

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e me deram forças para nunca desistir dos meus objetivos, se estou concluindo esta etapa na minha vida é graças a eles que acreditaram em mim e transmitiram toda sabedoria deles a mim, obrigada mãe, obrigada pai, amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por ter me dado sabedoria, determinação, saúde, e por ter colocado as pessoas certas em minha vida.*

*Agradeço a minha família que teve muita paciência comigo, que aguentou minhas reclamações, meus momentos de raiva, mas que também sempre estiveram comigo me mostrando que todo bom sonho exige muita luta.*

*Aos professores do Centro Universitário São Camilo, que transmitiram todo seu conhecimento da melhor forma possível e fizeram eu me apaixonar cada vez mais por este curso, e que hoje não estão formando apenas uma nova biomédica mas uma nova pessoa.*

*Um agradecimento especial à professora Juliana Bianchi que me introduziu no mundo da pesquisa, acreditou em mim desde o início e até hoje me demonstra muita confiança, muito obrigada por sempre me ajudar e confiar em mim.*

*Outro, a professora Maria Anete que rapidamente aceitou meu convite para ser minha orientadora e demonstrou muita confiança em meu trabalho.*

*Agradeço aos meus queridos amigos Marcos e Júlia que estiveram comigo desde o início da faculdade que viveram comigo tantos momentos de sufoco, de reclamação, de desabafo, mas também muitos momentos bons, sei que se estou concluindo esta etapa é muito graças a vocês que estiveram comigo toda essa caminhada.*

*Tenho imensa gratidão a toda equipe do Laboratório de Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo, à prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisa Higa que abriu as portas do seu laboratório para mim e me deu autonomia para desenvolver meu trabalho. Agradeço à mais que orientadora uma verdadeira amiga, Giovana Punaro, que me passou tanto conhecimento, que tem uma paciência divina de ensinar e lidar com os alunos, e que sem dúvida esta mais que presente neste trabalho. Ao Adelson que apesar das diversas piadinhas de velho, é um*

*grande amigo, que esta sempre disposto a ensinar e a ajudar. A Meg que foi um verdadeira mãe, que esteve presente em todos momentos, que ficava feliz em cada vitória e que não hesitava em ajudar em nenhum momento.*

*Aos demais integrantes do laboratório Deyse, Daniela, Robson e Moisés, pois por trás de todo bom trabalho tem uma boa equipe, e vocês sem dúvida me mostraram o quão maravilhosa é esta equipe.*

*Agradeço a todos que participaram do meu desenvolvimento e crescimento pessoal e profissional.*

FARIAS, C. **Estudo da correlação entre o receptor P2X<sub>7</sub> e marcadores inflamatórios na progressão da nefropatia diabética em ratos.** 2018. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica e metabólica caracterizada pela hiperglicemia, a qual ocorre devido à ausência da secreção ou por deficiência na ação da insulina. A hiperglicemia, entre outras ações, é responsável pelo aumento da síntese de ATP; este interage com o receptor P2X<sub>7</sub>, e sua ativação promove a abertura de poros na membrana plasmática das células, podendo liberar diversas substâncias como as citocinas e levar à morte celular. A presença de citocinas inflamatórias no DM pode ter relação com a expressão e ativação do P2X<sub>7</sub>. O objetivo deste trabalho foi estudar a correlação entre o receptor P2X<sub>7</sub> e o perfil inflamatório em ratos diabéticos durante a progressão da nefropatia diabética. Para isso, ratos Wistar machos foram nefrectomizados unilateralmente, após uma semana metade dos animais foi submetida à administração de estreptozotocina (60 mg/kg) para indução do diabetes constituindo o grupo diabético (DM); a outra metade recebeu o veículo da droga, formando o grupo controle (CTL). No final das 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas após a indução do DM, foi aferida a glicemia e a massa corporal dos animais, em seguida estes foram eutanasiados sob anestesia, e o rim remanescente foi coletado para realização do *Western blot* para análise do conteúdo proteico de IL-6, IL-10 e P2X<sub>7</sub>. Os resultados foram descritos como média ±EP, com significância para p<0,05; a análise de variância realizada pelo teste T de *Student* não pareado, e as correlações foram realizadas pela análise de *Spearman*, utilizando o *software GraphPad Prisma 5.0*. Os níveis de glicemia dos animais DM estavam significativamente elevados nas 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de protocolo, assim como a massa corporal estava significativamente reduzida em todas as semanas. Em relação às citocinas, verificou-se que a IL-6 aumentou progressivamente até a 8<sup>a</sup> semana, enquanto a IL-10 mostrou uma diminuição gradativa com o avanço da doença. O conteúdo proteico do receptor P2X<sub>7</sub> encontrava-se aumentado no grupo DM, em todas as semanas analisadas. Os dados de correlação indicaram associação significativa durante as 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes, sendo que entre o receptor P2X<sub>7</sub> e a glicemia houve uma correlação forte e positiva; entre o receptor e a massa corporal houve uma correlação forte e negativa; e entre o receptor e a citocina IL-6 uma correlação moderada e positiva; sem demonstrar correlação significativa para a citocina IL-10. Concluímos que há uma participação do P2X<sub>7</sub> no quadro inflamatório da nefropatia diabética, uma vez que observamos a elevação e correlação desse receptor e da citocina IL-6, acompanhado da redução da citocina IL-10, sugere-se que o controle do estado inflamatório pode retardar e/ou amenizar os danos causados pelo receptor, tornando-o um potencial alvo terapêutico na doença.

**Palavras-chave:** *Diabetes Mellitus*. Inflamação. Ratos. Receptores purinérgicos P2X<sub>7</sub>. Rim

FARIAS, C. **Study of correlation between the P2X<sub>7</sub> receptor and inflammatory markers in the progression of diabetic nephropathy in rats.** 2018. 45f. Completion coursework (Bachelor degree in Biomedicine) - Centro Universitario São Camilo, São Paulo, 2018.

*Diabetes mellitus* is a chronic and metabolic disease characterized by hyperglycemia, which occurs due to lack of secretion or deficiency in insulin action. Hyperglycemia, among other actions, is responsible for increase ATP synthesis; this interacts with the receptor P2X<sub>7</sub>, and its activation promotes the opening of pores in the plasmatic membrane of cells, leading to death and/or release of cytokines. The presence of inflammatory cytokines in DM may be related to the expression and activation of P2X<sub>7</sub>. The objective of this study was to study the correlation between the P2X<sub>7</sub> receptor and the inflammatory profile in diabetic rats during the progression of diabetic nephropathy. For this, male Wistar rats were unilaterally nephrectomized, after one week, a group of the animals were submitted to the administration of streptozotocin (60 mg / kg) for induction of diabetes constituting the diabetic group (DM); the other group received the drug vehicle, forming the control group (CTL). At the end of the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks after diabetes induction, the blood glucose and weight of the animals were evaluated, then the animals were euthanized under anesthesia, and the remaining kidney was collected for Western blot analysis for protein content of IL-6, IL-10 and P2X<sub>7</sub>. The results were described as mean ± SD, with significance for p <0.05; the analysis of variance was performed by unpaired Student T test, and correlations were performed by Spearman's analysis using GraphPad Prisma 5.0 software. The glycemia levels of DM animals were significantly elevated at the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks, as weight was significantly reduced at all weeks. Regarding the cytokines, it was verified that IL-6 increased progressively until the 8<sup>th</sup> week, while IL-10 showed a gradual decrease with the disease progression. The protein content of the P2X<sub>7</sub> receptor was increased in the DM group, in all analyzed weeks. The correlation data indicated a significant association during the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks of diabetes, and between the P2X<sub>7</sub> receptor and glycemia there was a strong and positive correlation; between receptor and weight there was a strong and negative correlation; and between the receptor and the IL-6 cytokine a moderate and positive correlation; without showing a significant correlation for IL-10 cytokine. We concluded that there is a participation of P2X<sub>7</sub> in the inflammatory picture of diabetic nephropathy, since we observed the elevation and correlation of this receptor and IL-6 cytokine, accompanied by the reduction of the IL-10 cytokine, it is suggested that the inflammatory state control can delay and / or ameliorate the damage caused by the receptor, making it a potential therapeutic target in the disease.

Keywords: *Diabetes Mellitus*. Inflammation. Rats. Purinergic receptors P2X<sub>7</sub>. Kidney.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do modelo de sinalização purinérgica proposto por Burnstock (Burnstock, 2006a). .....	16
Figura 2 - Modelo de ativação do inflamassoma NLRP3 na produção de IL-1 $\beta$ e IL-18 (Scarpioni <i>et al.</i> , 2016) .....	19
Figura 3 - Valores de glicemia dos animais nas 5 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas de diabetes.....	26
Figura 4 - Massa corporal dos animais nas 5 <sup>a</sup> , 6 <sup>a</sup> , 7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas de diabetes.....	27
Figura 5. Ilustração da massa corporal referente aos animais controle (esquerda) e diabético (direita).....	27
Figura 6 - Avaliação do conteúdo proteico da IL-6 no córtex renal dos animais .....	28
Figura 7 - Avaliação do conteúdo proteico da IL-10 no córtex renal dos animais.....	29
Figura 8 - Avaliação do conteúdo proteico do P2X <sub>7</sub> no córtex renal dos animais.....	30
Figura 9 - Correlação linear do receptor P2X <sub>7</sub> com a glicemia dos ratos nas 7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas de diabetes .....	31
Figura 10 - Correlação linear do receptor P2X <sub>7</sub> com a massa corporal dos ratos nas 7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas de diabetes .....	31
Figura 11 - Correlação linear do receptor P2X <sub>7</sub> com a citocina IL-6 dos ratos nas 7 <sup>a</sup> e 8 <sup>a</sup> semanas de diabetes.....	32

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A1 – Receptores de adenosina

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

AP4A – Diadenosinatetrafosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CEDEME – Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DECH - Doença do enxerto contra o hospedeiro

DM – Diabetes *mellitus*

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

EP – Erro Padrão

GTP – Trifosfato de guanosina

i.m – Intramuscular

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL-10 – Interleucina-10

IL-18 – Interleucina-18

IL-1RA – Antagonista do receptor interleucina1

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-6 – Interleucina-6

K<sup>+</sup> - Potássio

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPKs – Proteína quinase ativada por mitógeno

Na<sup>+</sup> - Sódio

ND – Nefropatia diabética

NLRP3 – Proteína da família do receptor NOD-*like* contendo domínio pirina 3

OMS – Organização Mundial de Saúde

P1 – Receptor purinérgico responsivo a adenosina

P2 – Receptor purinérgico responsivo a ATP/ADP

P2X – Receptor purinérgico ligado a canais iônicos

P2Y – Receptor purinérgico acoplado a proteína G

p-38 MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos p-38

PKC – Proteína quinase C

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento tecidual beta

Th2 – Linfócito T helper2

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral- $\alpha$

Vs – *Versus*

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	Diabetes .....	14
1.2	Receptores Purinérgicos .....	15
1.3	Receptor P2X <sub>7</sub> no rim.....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
3.1	Animais .....	23
3.2	Nefrectomia unilateral .....	23
3.3	Indução ao diabetes tipo 1 .....	24
3.4	Controle glicêmico e massa corporal .....	24
3.5	Eutanásia e dissecação renal .....	24
3.6	<i>Western Blotting</i> .....	25
3.7	Análise Estatística .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1	Glicemia e massa corporal dos animais.....	26
4.2	Análise protéica de IL-6, IL-10 e P2X <sub>7</sub> .....	28
4.3	Correlação entre P2X <sub>7</sub> , glicemia, massa corporal e citocinas .....	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>39</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Diabetes

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica e metabólica caracterizada pela hiperglicemia, a qual ocorre devido à ausência de insulina ou por deficiência na ação deste hormônio, resultando em menor captação de glicose pelas células e reduzindo a fonte de energia para os tecidos (Ministério da Saúde, 2015). É uma doença com incidência e prevalência cada vez maior, isso se deve ao envelhecimento populacional e principalmente ao estilo de vida atual caracterizado por alimentação inadequada e falta de atividade física, resultando em sobrepeso e obesidade (Ferreira e Pititto, 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que em 1995 havia 135 milhões de pessoas com diabetes; em 2005, 240 milhões e, em 2014, 422 milhões de pessoas estavam convivendo com essa doença; sendo que destes, 13 milhões são brasileiros. Isso mostra que apesar dos avanços na saúde, a estatística dessa doença só aumenta com o passar dos anos. Em 2015, cerca de 1,6 milhão de óbitos foram causados diretamente pelo diabetes ou pela hiperglicemia (Who, 2017).

Existem dois tipos principais de DM, tipo 1 e tipo 2. No tipo 1, fatores genéticos associados a ambientais levam a resposta autoimune nas ilhotas de *Langerhans*, culminando em destruição destas células e como resultado a interrupção da produção de insulina (Forbes e Cooper, 2013). No tipo 2, há alteração na sinalização de moléculas intracelulares do receptor de insulina, a qual pode ser ocasionada por fatores como estilo de vida, sobrepeso, hipertensão, inflamação, entre outros. A ausência de captação de glicose no organismo provoca danos que contribuem para a lesão de vários tecidos e órgãos; sendo a disfunção endotelial uma dessas principais alterações. Os problemas vasculares relacionados ao diabetes resultam em complicações como retinopatia e nefropatia diabética (ND) (Forbes e Cooper, 2013).

A hiperglicemia é também responsável pelo aumento na concentração extracelular e liberação de adenosina trifosfato (ATP), principal fonte de energia

celular; isto ocorre principalmente porque a glicose leva a uma redução do catabolismo do ATP por meio da inibição de enzimas ectonucleotidases (enzimas que degradam os nucleotídeos) (Costa *et al.*, 2009). O ATP encontrado no meio extracelular torna-se mediador de diversas funções celulares, através de sua ação agonista nos receptores purinérgicos (Rang *et al.*, 2007).

As principais complicações diabéticas como retinopatia e nefropatia vêm cada vez mais sendo relacionadas com os receptores purinérgicos; em pacientes diabéticos foi observado aumento na expressão do receptor purinérgico P2X<sub>7</sub> no rim provocando lesões inflamatórias e ocasionando a glomeruloesclerose. Foi sugerido ainda, que este receptor tem a capacidade de atrair macrófagos para a região lesionada, agravando o quadro, visto que quando foi utilizado inibidor do receptor, houve diminuição no número de macrófagos e na deposição de colágeno IV (Menzies *et al.*, 2017). No estudo de Sugiyama *et al.*, (2004) foi demonstrado que houve aumento do P2X<sub>7</sub> e da formação de poros nos microvasos retinianos em animais diabéticos que desenvolveram a retinopatia.

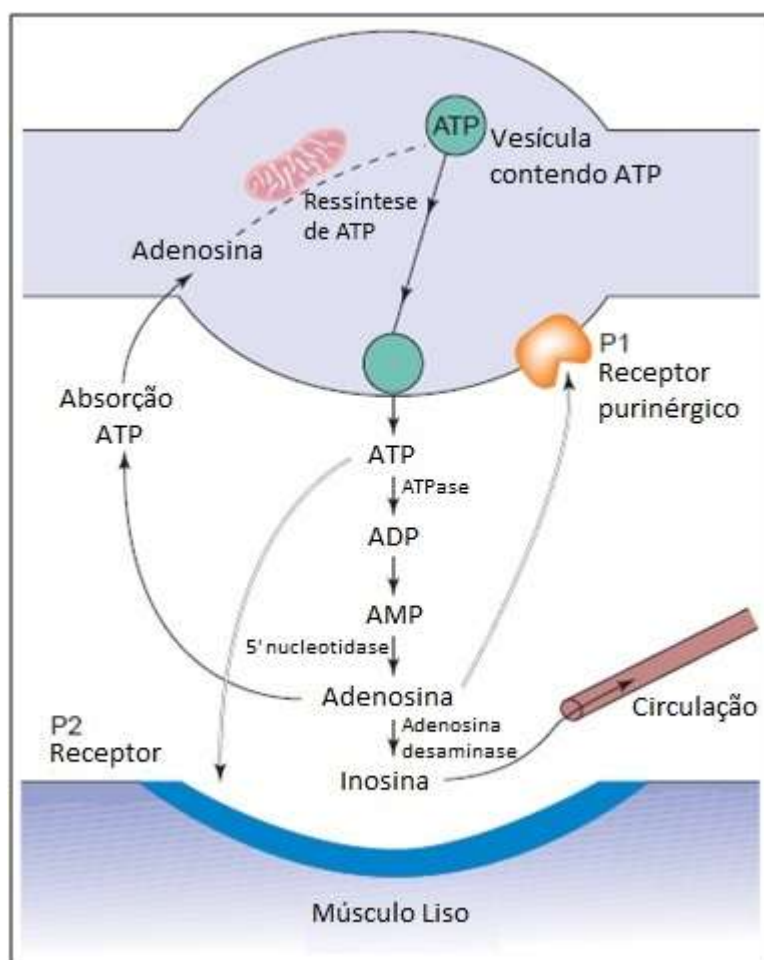
## 1.2 Receptores Purinérgicos

O estudo da sinalização purinérgica teve início com um projeto dos pesquisadores Drury e Szent-Györgyi (1929) que observaram o efeito dos compostos nucleosídeos extraídos de músculo cardíaco na diminuição dos batimentos cardíacos de animais. A partir deste achado diversos estudos foram realizados a fim de compreender a ação dos nucleosídeos. Em 1948, Emmelin e Feldberg aplicaram ATP em cérebro de gatos e observaram que estes apresentaram fraqueza muscular, ataxia e sedação, nestes animais ocorreram alterações bioquímicas e eletrofisiológicas que foram relacionadas à ação neurotransmissora do ATP.

Porém somente em 1972 Burnstock propôs o primeiro modelo da sinalização purinérgica; que foi assim chamado devido à presença das bases purinas dos nucleotídeos; neste modelo, foi contemplada toda a teoria de como o ATP era armazenado, liberado, ligando-se aos receptores e sendo por fim hidrolisado (Figura 1) (Burnstock, 2006a).

Inicialmente, a liberação do ATP para o meio extracelular foi relacionada a situações patológicas onde ocorria lise celular e todo o conteúdo do interior da célula era liberado. Atualmente, sabe-se que essa liberação pode ser decorrente de um mecanismo fisiológico ou fisiopatológico, como em situações de estresse mecânico, hipóxia e inflamação, sem necessidade de morte celular (Burnstock, 2006b). O ATP intracelular fica armazenado em vesículas no citoplasma em concentrações entre 2 e 5 mM, podendo ser liberado através de canais de conexina, panexina, aniônico ou por exocitose das vesículas. Além do ATP, outros nucleotídeos podem ser armazenados como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), diadenosina tetrafosfato (Ap4A), e trifosfato de guanosina (GTP), porém em menores concentrações (Burnstock, 2007).

**Figura 1 - Representação do modelo de sinalização purinérgica proposto por Burnstock**



Fonte: (Adaptado de Burnstock, 2006a)

Quando livre no meio extracelular, o ATP pode atuar de maneira autócrina ou parácrina ligando-se a receptores e gerando estímulos para diversas funções como transmissão neurológica, modulação da dor, relaxamento muscular, entre outras (Burnstock, 2007). Pode ainda, ser metabolizado por enzimas da classe das ectonucleotidases em suas formas di- ou monofosfato (ADP ou AMP) e por fim em adenosina, podendo esta ser reutilizada para formação de mais ATP, esta etapa é importante para controlar os níveis de ATP e para a renovação do estoque citoplasmático (Zimmermann, 2001; Abbracchio *et al.*, 2009).

Em 1978, Burnstock formalizou a existência de receptores de membrana plasmática específicos para os nucleotídeos extracelulares, sendo denominados receptores purinérgicos (P2), passando a serem alvos de vários estudos (Burnstock, 2006b). Com as novas descobertas os receptores purinérgicos passaram a receber novas classificações, sendo primeiramente classificados em dois subtipos: P1 e P2, sendo que o receptor P1 tem como agonista a molécula de adenosina e o P2 é responsivo as moléculas de ATP e ADP. Os receptores P2 foram ainda divididos em duas subfamílias: receptor P2Y e P2X, sendo que o P2Y é acoplado à proteína G e o P2X ligado a canais iônicos. Dentro da família P2Y já foram identificados oito subtipos (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>), e da família P2X sete subtipos (P2X<sub>1-7</sub>) (Ralevic e Burnstock, 1998). Estruturalmente os receptores do tipo P2X são muito semelhantes, apresentam duas regiões transmembranas com as terminações N- e C- localizadas no meio intracelular e uma alça extracelular, onde se localiza o sítio de ligação para o ATP (Jiang *et al.*, 2000).

Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos seletivos para os cátions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, após a ligação do agonista no receptor ocorre uma rápida abertura do canal (menos de 10 milissegundos) levando à despolarização da membrana e ao aumento na concentração de Ca<sup>2+</sup> no meio intracelular, desencadeando a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKs), proteína quinase C (PKC) e calmodulina, gerando a resposta celular. Essa família de receptores já foi identificada em diversos tecidos como: nervoso, ósseo, muscular, endotelial, urinário e hematopoiético (Erb *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2008).

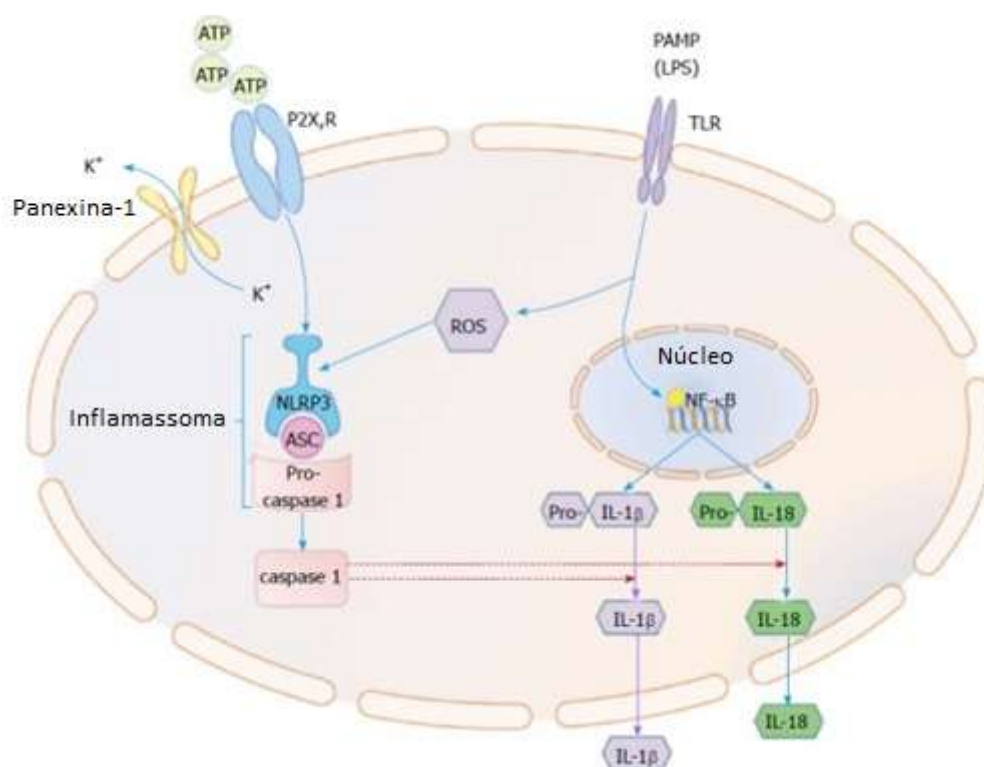
Dentre os receptores do tipo P2X, o P2X<sub>7</sub> é o mais divergente, pois possui uma porção C-terminal intracelular mais longa, a qual está relacionada à formação

de poros na célula (Burnstock, 2006a). Esses poros são formados frente a altas concentrações do agonista (ATP) ou exposição prolongada ao receptor, permitindo assim, a passagem de moléculas de alto peso molecular de até 900Da, caracterizando aumento da permeabilidade celular. Pelo fato do receptor P2X<sub>7</sub> não sofrer dessensibilização, o poro permanece aberto enquanto o ATP estiver ligado ao receptor e, quando esse tempo de abertura é prolongado (cerca de 15 a 30 minutos), a célula pode sofrer danos irreversíveis, podendo culminar em morte celular (Yan *et al.*, 2008).

O P2X<sub>7</sub> já foi também relacionado a quadros inflamatórios, nessa situação, ocorre intensa liberação de ATP das células lesionadas e das células imunológicas presentes e, este ATP atuará como molécula sinalizadora de perigo e ativadora do receptor purinérgico. Além disso, a formação do poro provocada pelo receptor P2X<sub>7</sub> parece ser necessária para ativar a cascata do inflamassoma (Burnstock, 2016). O inflamassoma é um complexo multiproteico que impulsiona a maturação de citocinas pró-inflamatórias em resposta a infecções e lesões nos tecidos (Scarpioni *et al.*, 2016).

O principal inflamassoma ativado pelo P2X<sub>7</sub> é o NLRP3 (Proteína da família do receptor NOD-*like* contendo domínio pirina 3), este tem importante papel na produção e liberação da interleucina (IL) IL-1 $\beta$ . Mariathasan *et al.* (2006), mostraram que o P2X<sub>7</sub> estimula a cascata de sinalização do inflamassoma, ativando a caspase-1 e, conseqüentemente induzindo a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18. Além disso, a diminuição na concentração citoplasmática de K<sup>+</sup> provocada pelo P2X<sub>7</sub> também contribui para a maturação de IL-1 $\beta$ , ou seja, a mudança na concentração de K<sup>+</sup> leva ao estímulo da enzima caspase-1 para clivagem da pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$ , que é então secretada para o meio extracelular (Figura 2); isto sugere que a inibição da ativação do inflamassoma por antagonista do P2X<sub>7</sub> poderia interferir nessa cascata inflamatória (Lister *et al.*, 2007).

Figura 2 - Modelo de ativação do inflamassoma NLRP3 na produção de IL-1 $\beta$  e IL-18



Fonte: (Adaptado de Scarpioni et al., 2016)

### 1.3 Receptor P2X<sub>7</sub> no rim

No tecido renal saudável, inicialmente foi visto que a expressão do receptor P2X<sub>7</sub> era reduzida, porém, com o avanço dos estudos notou-se alteração na expressão desse receptor em todo sistema urinário principalmente nos podócitos, células mesangiais, epitélio do ducto coletor e ureter. Contudo, as funções biológicas, o potencial patológico e a cascata sinalizadora do receptor P2X<sub>7</sub> especificamente no rim, ainda não foram totalmente esclarecida (Hillman *et al.*, 2005).

Um estudo elaborado por Harada *et al.*, (2000) mostrou que os receptores P2X<sub>7</sub> estão pouco expressos no tecido renal em condições normais, porém, quando cultura de células mesangiais foram expostas a mediadores inflamatórios como lipopolissacarídeo (LPS), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ocorreu aumento na expressão desses receptores, indicando que estão envolvidos em processos patológicos.

Para ocorrer ativação do receptor P2X<sub>7</sub> no rim, é necessária a presença de ATP nesse tecido. Dentro desse contexto, estudos mostraram que o ATP é constitutivamente liberado no epitélio tubular normal em concentrações micromolares (Burnstock e Knight, 2004), e que essas concentrações encontravam-se aumentadas quando analisadas em células epiteliais císticas anormais, provenientes de rins policísticos (Wilson *et al.*, 1999). Além disso, a diminuição da ação das ectonucleotidases poderia resultar em aumento dos níveis de ATP em condições como inflamação e hipóxia, contribuindo para ativação desse receptor no rim comprometido (Hillman *et al.*, 2005).

O aumento na liberação de ATP, induzida pela hiperglicemia pode contribuir para a elevação da expressão dos receptores P2X<sub>7</sub> em células mesangiais, como foi mostrado em modelo de rato diabético, induzido por estreptozotocina no estudo de Vonend *et al.* (2004) demonstrando que essa expressão foi crescente com a progressão do diabetes; observando-se também maior grau de apoptose renal. Nesse mesmo estudo, notaram-se efeitos similares em animais hipertensos.

Utilizando células mesangiais cultivadas em meio com elevada concentração de glicose, avaliou-se o papel do sistema purinérgico na modulação da produção de matriz mesangial extracelular e do fator transformador de crescimento beta (TGF-β), demonstrando que as células em meio com elevada glicose liberavam muito mais ATP em comparação ao meio com concentração normal de glicose, contribuindo para maior expressão dos receptores purinérgicos, principalmente do tipo P2X. No meio com glicose elevada, também se observou maior produção de proteínas de matriz e TGF-β, mesmo quando foram utilizados inibidores de ectonucleotidases (Solini *et al.*, 2005).

Uma relação positiva entre os receptores purinérgicos e a ND foi observada no estudo de Elsherbiny *et al.*, (2012), neste estudo notou-se que o tratamento com agonistas de receptores de adenosina (A1) protegeram os ratos diabéticos das complicações da nefropatia, reduzindo a albuminúria e os níveis séricos de creatinina e ureia, inibindo vias de ativação apoptótica, obtendo ainda efeitos antioxidantes, além de reduzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias.

Diante das evidências da presença do receptor P2X<sub>7</sub> em vários tipos celulares, inclusive no trato urinário, e dos efeitos ainda não elucidados dos receptores purinérgicos, torna-se cada vez mais importante, estudos que relatem como seria o funcionamento desse receptor no rim qual seria o seu efeito biológico e, ainda se poderia ser um futuro alvo terapêutico (Hillman *et al.*, 2004). Por esse motivo, procurou-se investigar os possíveis efeitos do receptor P2X<sub>7</sub> em animais diabéticos e sua associação com marcadores inflamatórios.

## **2 OBJETIVO**

Estudar a correlação entre o receptor P2X<sub>7</sub> e o perfil inflamatório em ratos diabéticos durante a progressão da nefropatia diabética.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo na Universidade Federal de São Paulo, sob aprovação do CEUA nº 2063030317.

Foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos com 7 semanas de idade obtidos do Biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Em seguida, a massa corporal (g) dos animais foi aferida em balança digital, os quais pesavam entre 170-210g; e permaneceram em caixas coletivas, sendo dividido 4 animais por caixa, no Biotério do Laboratório da Disciplina de Nefrologia, com temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , em ambiente com períodos regulares de claro e escuro de 12:12 horas. Os animais receberam ração padrão (Nuvital CR-1, Nuvilab, PR, Brasil) e água *ad libitum*, permanecendo em adaptação ao ambiente durante a 1ª semana do protocolo.

#### 3.2 Nefrectomia unilateral

Após o término da semana de adaptação dos animais ao Biotério, foi realizada a nefrectomia unilateral do rim esquerdo a fim de acelerar o desenvolvimento da nefropatia diabética. Após tricotomia e limpeza da pele com álcool etílico a 70% e solução a 50% de polivinilpirrolidona (Povidine), os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (65mg/kg) e cloridrato de xilazina (9mg/kg), ambas i.m. A seguir, foi realizada uma pequena incisão de  $\pm 2$  cm na região lombar e o rim esquerdo foi removido. Os animais receberam analgésico (Meloxicam) pós-cirúrgico no período de 48hs, via s.c. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis e os animais permaneceram em repouso durante uma semana (Rodrigues *et al.*, 2014).

### **3.3 Indução ao diabetes tipo 1**

Após a recuperação da cirurgia, os animais foram distribuídos em 2 grupos, um grupo recebeu estreptozotocina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) na veia caudal, na dose de 60mg/kg dissolvida em 0,1M de tampão citrato com pH 4,5, formando assim o grupo diabético (DM, N=16). O outro grupo recebeu apenas o veículo da droga (tampão citrato) na veia caudal, sendo caracterizado como grupo controle (CTL, N=16). O diabetes foi confirmado após 48 horas da indução, com o uso de um glicosímetro, sendo definido como glicemia de jejum  $\geq 200$ mg/dL, e os animais que falharam nesse critério foram excluídos do protocolo (Punaro *et al.*, 2014).

### **3.4 Controle glicêmico e massa corporal**

No final de cada semana estudada, isto é a 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes, os animais permaneceram em jejum por período de 3 horas para aferição da glicemia, a qual foi obtida através de glicosímetro em pequenas alíquotas de sangue, coletadas da veia caudal (sem necessidade de anestésico); em seguida, os animais foram pesados em balança digital para aferição da massa corporal.

### **3.5 Eutanásia e dissecação renal**

Os animais foram eutanasiados em diferentes semanas para análise da progressão da doença, sendo esse procedimento realizado nas 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas, após a confirmação do DM (N= 4 animais por semana e por grupo).

A eutanásia foi realizada com uma supra dose de anestésicos, cloridrato de quetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (12mg/kg), ambos via i.m. e, após ser observada a completa sedação do animal, realizou-se a perfuração do diafragma. Em seguida, a cavidade abdominal foi exposta e o rim direito remanescente foi extraído. Com o auxílio de um bisturi, o rim foi cortado transversalmente e o córtex renal foi separado da medula renal, ambos foram armazenados em freezer a -80° para análise posterior.

### 3.6 Western Blotting

O córtex renal foi homogeneizado em tampão K-HEPES (200mM manitol; 80mM HEPES; 41mM KOH; pH 7,5) contendo coquetel de inibidores de proteases (Millipore Corporation, São Paulo, Brasil); este homogenato foi centrifugado em 2000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a técnica de *Western blotting*. As proteínas totais obtidas no sobrenadante foram determinadas pelo método de Bradford. O equivalente a 40µg de proteínas de cada amostra foi utilizado em gel de poliacrilamida a 10%. Em seguida, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, São Paulo, Brasil). Subsequentemente, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 10% em tampão TBS-T (20mM Tris; 50mM NaCl; 1,2mM EDTA; tween20 a 0,1%) por 1 hora. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos contra IL-6, IL-10, P2X<sub>7</sub> ou actina, diluídos em TBS-T. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com os respectivos anticorpos secundários durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após realizada lavagem com TBS-T, as bandas foram visualizadas utilizando-se imobilon (Millipore Corporation MA, EUA) pelo método de quimioluminescência em um fotodocumentador (Alliance 4.7 Uvitec Cambridge, Londres, Reino Unido). A quantificação proteica foi realizada no programa *Image J* e a actina foi utilizada como um normalizador endógeno.

### 3.7 Análise Estatística

Os resultados foram descritos como média e erro padrão (EP); com significância estatística para  $p < 0,05$ . Para a comparação entre os dois grupos foi realizado o Teste *T* não pareado. As correlações foram realizadas pela análise de *Spearman*, utilizando o software *GraphPad Prisma 5.0* (San Diego, EUA).

## 4 RESULTADOS

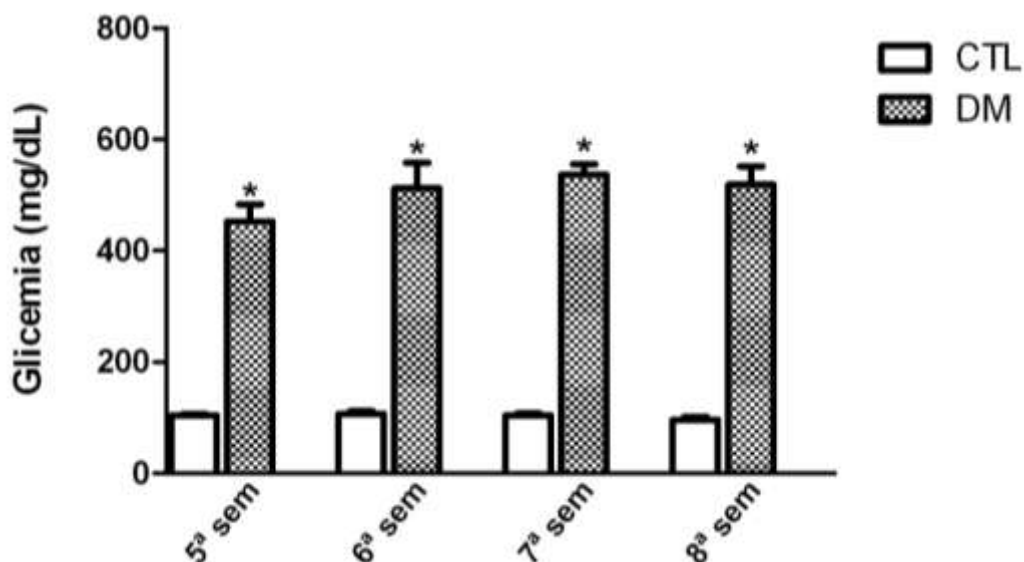
### 4.1 Glicemia e massa corporal dos animais

Os níveis de glicemia de jejum (mg/dL) dos animais do grupo DM estavam significativamente elevados nas 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de protocolo ( $453 \pm 30,4$ ;  $512 \pm 45,9$ ;  $536 \pm 18,9$ ;  $519 \pm 32,5$ , respectivamente) em relação ao grupo CTL ( $104 \pm 2,4$ ;  $106 \pm 4,8$ ;  $104 \pm 3,5$ ;  $96 \pm 5,3$ ), revelando um aumento em média de 4,9 vezes em todas as semanas analisadas (Figura 3).

A massa corporal (g) dos animais do grupo DM ( $188 \pm 21,3$ ;  $206 \pm 15,9$ ;  $211 \pm 11,7$ ;  $192 \pm 16,2$ ) respectivamente nas 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de protocolo, foi significativamente menor do que o dos animais CTL ( $344 \pm 12,6$ ;  $342 \pm 7,9$ ;  $358 \pm 9,2$ ;  $374 \pm 15,5$ ) em todas as semanas analisadas (Figura 4).

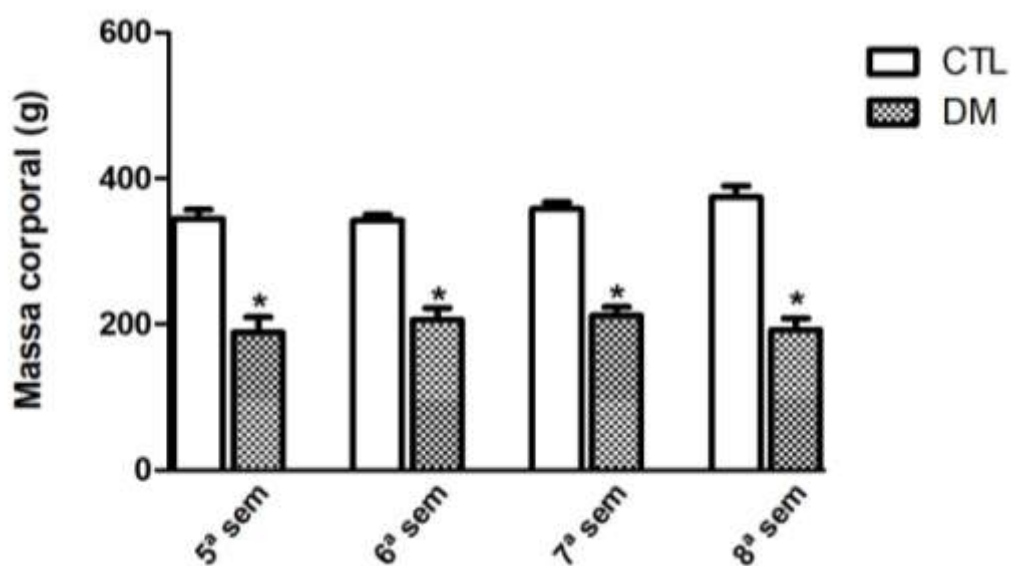
A diferença da massa corporal entre os animais DM e CTL pode ser visualizada na Figura 5.

Figura 3 – Valores de glicemia dos animais nas 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes



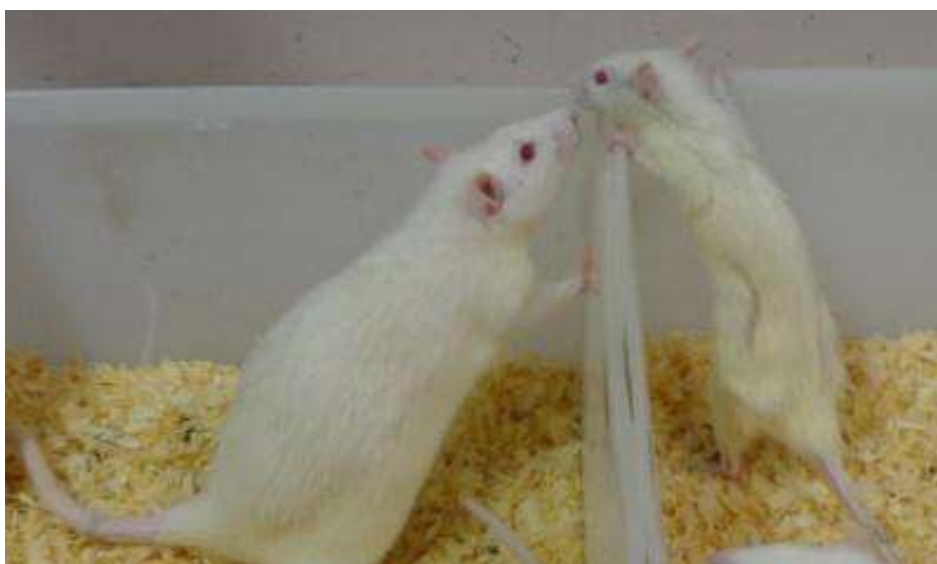
CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Dados são expressos em média e EP, avaliados por Teste *T* não pareado. N=4 por semana e por grupo.  $P < 0,05$ : \*vs. CTL da mesma semana.

Figura 4. Massa corporal dos animais nas 5ª, 6ª, 7ª e 8ª semanas de diabetes



CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Dados são expressos em média e EP, avaliados por Teste *T* não pareado.  $N=4$  por semana e por grupo.  $P<0,05$ ; \*vs. CTL da mesma semana.

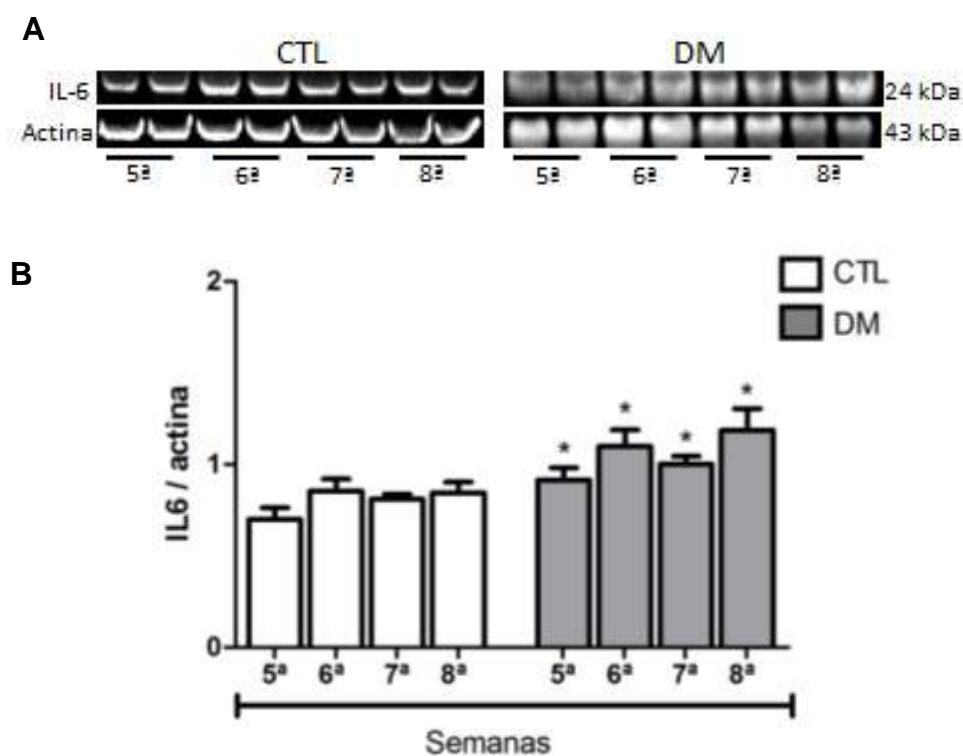
Figura 5. Ilustração da massa corporal referente aos animais controle (esquerda) e diabético (direita).



## 4.2 Análise protéica de IL-6, IL-10 e P2X<sub>7</sub>

A citocina IL-6 aumentou progressivamente no grupo DM durante as semanas do diabetes ( $0,91 \pm 0,06$ ;  $1,09 \pm 0,09$ ;  $1,00 \pm 0,04$ ;  $1,86 \pm 0,11$ ), sendo esse aumento significativo em relação à respectiva semana do grupo CTL ( $0,70 \pm 0,06$ ;  $0,85 \pm 0,06$ ;  $0,80 \pm 0,02$ ;  $0,84 \pm 0,05$ ) (Figura 6).

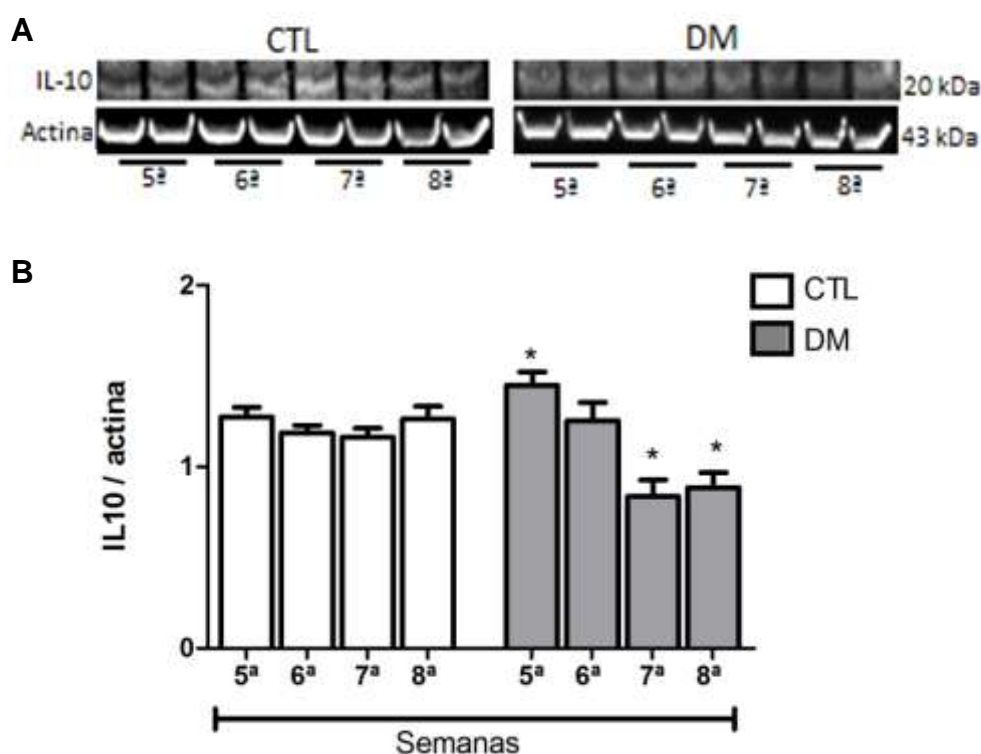
**Figura 6 - Avaliação do conteúdo proteico de IL-6 no córtex renal dos animais**



**Figura (A)** Imagem representativa do *Western blotting* da citocina IL-6 e actina. **(B)** Quantificação proteica da IL-6 nas 5ª, 6ª, 7ª e 8ª semanas de diabetes. CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Dados são expressos em média e EP, avaliados por Teste *T* não pareado. N=4 por semana e por grupo.  $P < 0,05$ ; \*vs. CTL da mesma semana.

A citocina IL-10 mostrou uma diminuição gradativa no grupo DM com o avanço do diabetes ( $1,44 \pm 0,07$ ;  $1,25 \pm 0,10$ ;  $0,83 \pm 0,09$ ;  $0,88 \pm 0,08$ ), sendo essa redução significativa na 5<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes quando comparada à respectiva semana do grupo CTL ( $1,27 \pm 0,05$ ;  $1,18 \pm 0,03$ ;  $1,16 \pm 0,04$ ;  $1,26 \pm 0,07$ ) (Figura 7).

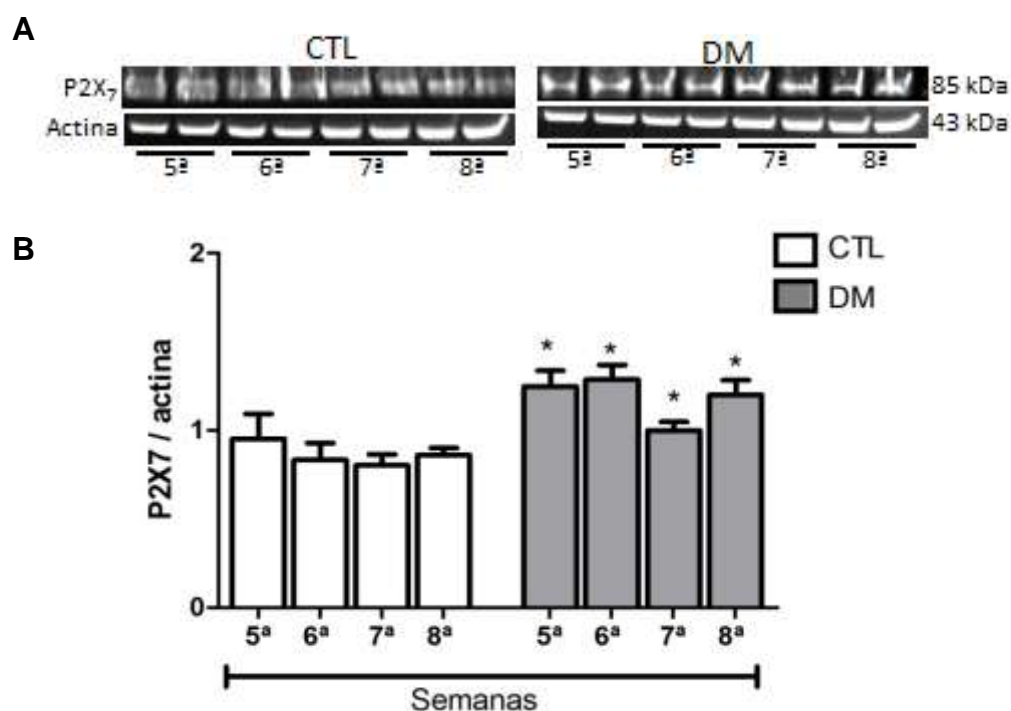
**Figura 7 - Avaliação do conteúdo proteico de IL-10 no córtex renal dos animais**



**Figura (A)** Imagem representativa do *Western blotting* da citocina IL-10 e actina. **(B)** Quantificação proteica da IL-10 nas 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes. CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Dados são expressos em média e EP avaliados por Teste *T* não pareado. N=4 por semana e por grupo.  $P < 0,05$ ; \*vs. CTL da mesma semana.

O conteúdo proteico do receptor P2X<sub>7</sub> encontrava-se significativamente elevado em todas as semanas no grupo DM ( $1,24 \pm 0,08$ ;  $1,28 \pm 0,08$ ;  $0,99 \pm 0,04$ ;  $1,19 \pm 0,08$ ) em comparação as respectivas semanas do grupo CTL ( $0,95 \pm 0,14$ ;  $0,83 \pm 0,09$ ;  $0,80 \pm 0,06$ ;  $0,85 \pm 0,04$ ) (Figura 8).

**Figura 8 - Avaliação do conteúdo proteico do P2X<sub>7</sub> no córtex renal dos animais**



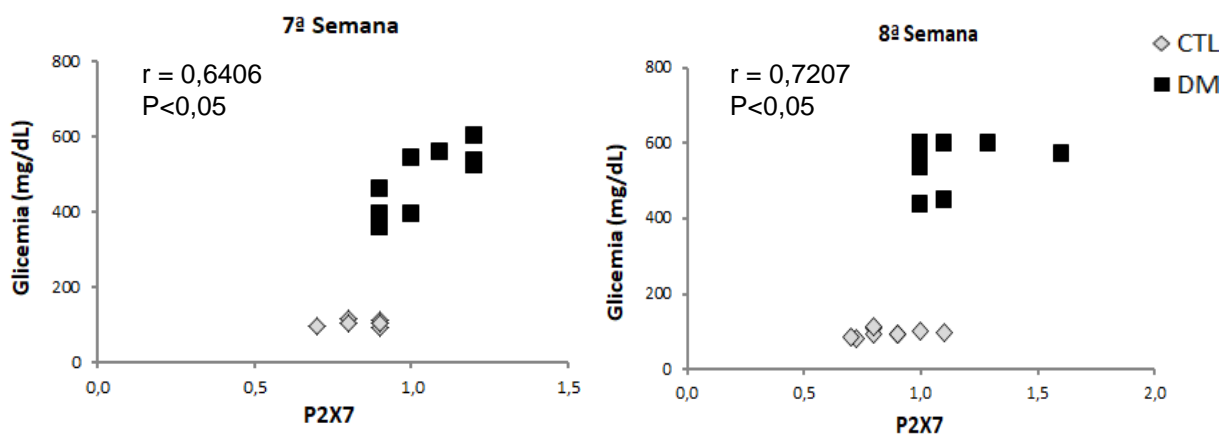
**Figura (A)** Imagem representativa do *Western blotting* do receptor P2X<sub>7</sub> e actina. **(B)** Quantificação proteica do P2X<sub>7</sub> na 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes. CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Dados são expressos em média e EP, avaliados por Teste *t* não pareado. N=4 por semana e por grupo.  $P < 0,05$ : \*vs. respectiva semana do CTL.

#### 4.3 Correlação entre P2X<sub>7</sub>, glicemia, massa corporal e citocinas

As correlações foram realizadas entre o receptor P2X<sub>7</sub> e a glicemia, a massa corporal e as citocinas IL-6 e IL-10 em todas as semanas de diabetes, demonstrando que houve significativa associação nas 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de diabetes em todos os parâmetros, com exceção da IL-10.

Para a glicemia, foi demonstrada uma significativa, forte e diretamente proporcional correlação com P2X<sub>7</sub> em ambas as semanas ( $r = 0,6406$  e  $r = 0,7207$ , respectivamente), observadas na Figura 9.

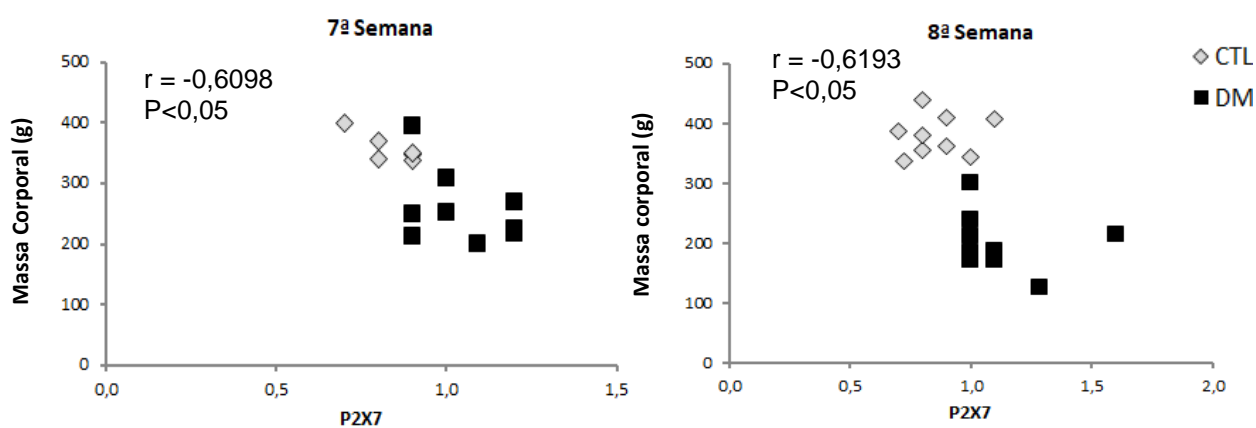
**Figura 9 - Correlação linear do receptor P2X<sub>7</sub> com a glicemia dos ratos nas 7ª e 8ª semanas de diabetes**



CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Teste de *Spearman*, coeficiente  $r = 0,6406$  e  $r = 0,7207$ .  $P < 0,05$ .

Na análise da massa corporal, houve significativa, forte e inversa correlação com o P2X<sub>7</sub> em ambas as semanas ( $r = -0,6098$  e  $r = -0,6193$ , respectivamente), conforme observado na Figura 10.

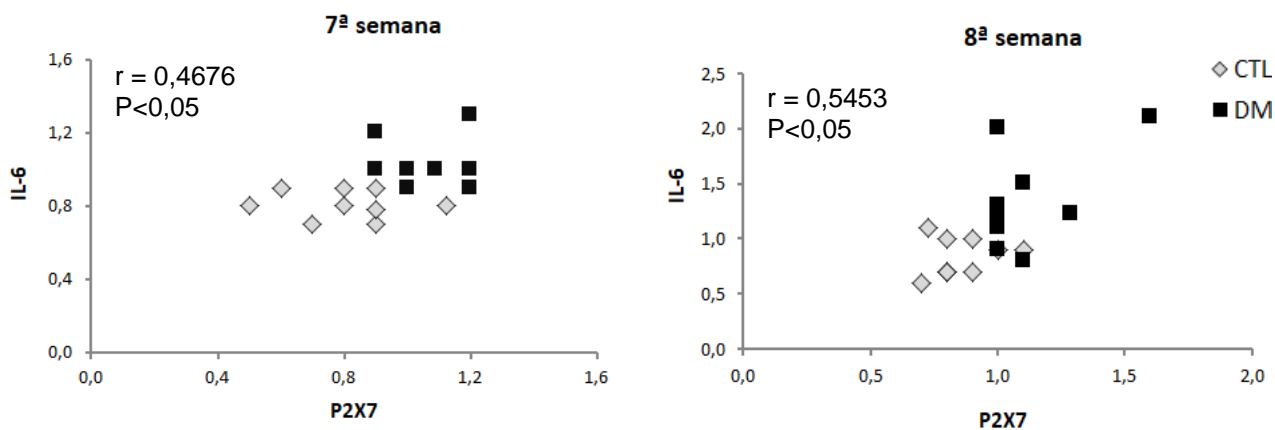
**Figura 10 - Correlação linear do receptor P2X<sub>7</sub> com a massa corporal dos ratos nas 7ª e 8ª semanas de diabetes**



CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Teste de *Spearman*, coeficiente  $r = -0,6098$  e  $r = -0,6193$ .  $P < 0,05$ .

Para a IL-6, houve uma significativa, moderada e diretamente proporcional correlação com o P2X<sub>7</sub> ( $r = 0,4676$  e  $r=0,5453$ , respectivamente), conforme demonstrado na Figura 11.

**Figura 11 - Correlação linear do receptor P2X<sub>7</sub> com a citocina IL-6 dos ratos nas 7ª e 8ª semanas de diabetes**



CTL: grupo controle; DM: grupo diabético. Teste de *Spearman*, coeficiente  $r = 0,4676$  e  $r = 0,5453$ .  $P < 0,05$ .

Não houve diferença estatística na correlação entre P2X<sub>7</sub> E IL-10 (dados não apresentados).

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho podemos considerar que o diabetes tipo 1 foi reproduzido nos animais, visto que após a administração de estreptozotocina o valor de glicemia encontrado estava significativamente elevado quando comparado ao dos animais controles. Além disso, a redução da massa corporal nos ratos diabéticos corrobora com o esperado nesta doença, devido à deficiência no metabolismo da glicose e do catabolismo proteico, ambos resultantes da hiperglicemia (Delfino *et al.*, 2002).

Verificamos que no grupo de animais diabéticos ocorreu um aumento nos níveis do receptor P2X<sub>7</sub> e, este foi acompanhado pela elevação dos níveis proteicos de IL-6, com redução simultânea da IL-10. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, assim é possível que haja envolvimento do receptor P2X<sub>7</sub> no quadro inflamatório da ND. A relação dessa citocina com o receptor P2X<sub>7</sub> já foi vista em situações de artrite reumatoide e aterosclerose (Lister *et al.*, 2007).

Os resultados demonstraram significativa, forte e direta correlação entre os níveis glicêmicos e o receptor P2X<sub>7</sub> evidenciando que o aumento na concentração proteica desse receptor é proporcional à elevação da glicemia. Isto pode ser explicado pelo aumento nos níveis de ATP extracelular provocado pela inibição das ectonucleotidases pela glicose (Costa *et al.*, 2009). O ATP além de ser o agonista, atua estimulando a expressão do receptor P2X<sub>7</sub>; assim como foi visto no estudo de Sathanoori *et al.*, (2015) células expostas a altas concentrações de glicose resultaram em aumento na concentração de ATP extracelular e na expressão do P2X<sub>7</sub>.

Observou-se ainda uma significativa, forte e inversa correlação entre o receptor e a massa corporal dos animais, revelando que ao aumentar os níveis de P2X<sub>7</sub> ocorre redução na massa corporal desses animais, como consequência do catabolismo proteico do DM. Estudos recentes têm demonstrado que ao utilizar antagonistas do receptor ocorre uma redução na perda de peso em camundongos com esclerose lateral amiotrófica (ELA) ou com doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), mais estudos são necessários para explicar essa relação (Zhong *et al.*, 2016; Bartlett *et al.*, 2017).

Verificou-se também que houve significativa, moderada e direta correlação entre o P2X<sub>7</sub> e a citocina IL-6, demonstrando correlação positiva, ou seja, quando um parâmetro está aumentado, o outro aumenta proporcionalmente. A ativação do receptor P2X<sub>7</sub> pode ser responsável pelo aumento na liberação de IL-6, já que essa resposta é inibida quando o receptor é bloqueado (Xu *et al.*, 2013). Uma via que vem sendo estudada para explicar essa relação entre IL-6 e P2X<sub>7</sub> é a via da p-38 MAPK, no estudo de Sathanoori *et al.* (2015) cultura celular enriquecida com glicose estimulou a fosforilação de p-38, e quando aplicado o inibidor de P2X<sub>7</sub> neste meio houve redução da fosforilação bem como diminuição na liberação de IL-6, indicando que esta via está envolvida no mecanismo molecular que permeia a liberação de IL-6 mediada por P2X<sub>7</sub>.

Cada vez mais, vem sendo demonstrada a participação do processo inflamatório no desenvolvimento da ND, com grande destaque para a ação das citocinas, as quais aumentam a síntese e a expressão de moléculas de adesão, provocam alterações hemodinâmicas intraglomerulares, induzem a proliferação de células mesangiais e a produção de espécies reativas de oxigênio (Navarro-Gonzalez e Mora-Fernandez, 2008; Carvalho e Domingueti, 2016).

A citocina IL-6 foi relacionada com a ND no estudo de Suzuki *et al.* (1995). Este grupo analisou biópsias renais de pacientes com ND e por hibridização *in situ* observaram a presença de RNA mensageiro (RNAm) de IL-6 em células epiteliais, mesangiais e glomerulares, verificando uma correlação positiva entre a expressão dessa citocina e as alterações histológicas encontradas (expansão mesangial, atrofia tubular e infiltração intersticial). A IL-6 é secretada por diversas células como macrófagos, monócitos, células epiteliais e até células mesangiais, o que pode contribuir ainda mais para o agravamento da lesão. Outro estudo com pacientes diabéticos, também mostrou resultados semelhantes, associando lesões de glomerulopatia com níveis plasmáticos de IL-6 e microalbuminúria (Dalla Vestra *et al.*, 2005).

Estudo realizado com fibroblastos de pacientes diabéticos revelou que a incubação dessas células com ATP provocava maior absorção do corante YO-PRO, um corante considerado específico para P2X<sub>7</sub>, esse achado foi associado ao aumento da permeabilização da membrana induzida por esse receptor. A liberação

de IL-6 nos fibroblastos desses pacientes estava excessivamente elevada, porém, quando se utilizou o antagonista do P2X<sub>7</sub> (ATP oxidado), o nível de IL-6 foi consideravelmente reduzido (Solini *et al.*, 2004). Esse estudo *in vitro* foi realizado com uma concentração normal de glicose o que não alterou significativamente a expressão do receptor P2X<sub>7</sub>. Contudo, em nosso estudo, observou-se que o conteúdo proteico desse receptor acompanhou os níveis de IL-6 nos ratos hiperglicêmicos.

O processo de liberação da IL-6 em situações em que o receptor P2X<sub>7</sub> se encontra elevado, ainda não está elucidado. Sabe-se que a ativação de inflamassomas, como o NLRP3, via estímulo de receptores purinérgicos está fortemente envolvida na liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, mas parece não influenciar a liberação de outras citocinas, como a IL-6 (Gicquel *et al.*, 2015), sendo assim, outras vias de ativação devem acontecer para que ocorra o estímulo para a liberação dessa citocina, sendo a via da p-38 uma possível candidata.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunorreguladora, sua secreção geralmente procede a de fatores pró-inflamatórios, isso garante que qualquer resposta inflamatória seja seguramente regulada após algum tempo (Stenvinkel *et al.*, 2005). Em doenças renais, a ação anti-inflamatória da IL-10 amenizou as lesões glomerulares e a proliferação celular, demonstrando que o tratamento com administração dessa citocina em camundongos reduziu o nível de proteinúria e atenuou a progressão da glomeruloesclerose (Kitching *et al.*, 2002).

Em pesquisa com pacientes diabéticos com e sem ND, foi verificado que os que possuíam a ND tinham níveis séricos de IL-10 muito superior aos que não eram nefropatas, revelando que esses pacientes tinham a função renal relativamente preservada, o que poderia ser atribuído ao papel protetor da IL-10. Contudo, a expressão excessiva de IL-10 pode contribuir indiretamente para a progressão da ND, uma vez que pode mascarar os efeitos deletérios a longo prazo (Mysliwska *et al.*, 2005). Entretanto, em nosso estudo, observou-se aumento significativo de IL-10 apenas na 5<sup>a</sup> semana do diabetes, sugerindo que houve uma tentativa de proteção renal somente nesse período da doença; uma vez que, na 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas foi observada redução significativa desse marcador anti-inflamatório.

Por outro lado, a liberação de ATP no meio extracelular provoca um sinal de alerta para as células imunológicas, pois, geralmente é um indicativo de lesão celular. Porém, dependendo da concentração de ATP liberado, pode ocorrer um direcionamento no tipo de resposta gerada; ou seja, em baixas doses de ATP com exposição prolongada, algumas células como as dendríticas e os macrófagos são ativados e produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e antagonista do receptor IL-1 (IL-1RA), que atuam suprimindo a resposta pró-inflamatória e favorecem o desenvolvimento de uma resposta mediada por linfócitos Th2 (La Sala *et al.*, 2003). Esse achado vai ao encontro de resultados obtidos em nosso estudo, visto que durante a 5ª e 6ª semanas do diabetes, observou-se elevada expressão de IL-10, provavelmente por se tratar da fase inicial da doença, onde os níveis de ATP ainda estariam reduzidos.

Em resumo, verificou-se que o receptor P2X<sub>7</sub> está envolvido no processo inflamatório presente na ND, sugerindo participação tanto no estado anti-inflamatório, por meio da indução da citocina IL-10 no início da doença, quanto no estado pró-inflamatório demonstrado pela elevação de IL-6, a qual tende a progredir simultaneamente com o avanço da doença.

## 6 CONCLUSÃO

Dado o exposto, concluímos que há uma participação do P2X<sub>7</sub> no quadro inflamatório da ND, uma vez que observamos a elevação e correlação desse receptor e da citocina IL-6, acompanhado da redução da citocina IL-10, com a progressão da doença. Esses resultados sugerem que o controle da glicemia e do estado inflamatório podem retardar e/ou amenizar os danos causados pelo receptor, tornando o P2X<sub>7</sub> um potencial alvo terapêutico para controlar o diabetes e suas complicações.

## REFERÊNCIAS

ABBACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 19-29, Jan 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008000> >.

BARTLETT, R. et al. P2X7 antagonism using Brilliant Blue G reduces body weight loss and prolongs survival in female SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis mice. **PeerJ**, v. 5, p. e3064, 2017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28265522> >.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 3, p. 166-76, Mar 2006a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487603> >.

\_\_\_\_\_. Purinergic signalling. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S172-81, Jan 2006b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402102> >.

\_\_\_\_\_. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev**, v. 87, n. 2, p. 659-797, Apr 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429044> >.

\_\_\_\_\_. P2X ion channel receptors and inflammation. **Purinergic Signal**, v. 12, n. 1, p. 59-67, Mar 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739702>>.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol**, v. 240, p. 31-304, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548415> >.

CARVALHO, A. C. V.; DOMINGUETI, C. P. Papel das citocinas inflamatórias na nefropatia diabética. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 14, n. 3, p. 177-82, 2016. Disponível em: < <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/10/2133/177-182.pdf> >.

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, May 1 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084903> >.

DALLA VESTRA, M. et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. **J Am Soc Nephrol**, v. 16 Suppl 1, p. S78-82, Mar 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15938041> >.

DELFINO, V. D. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002. Disponível em: < [www.jbn.org.br/export-pdf/475/24-01-05.pdf](http://www.jbn.org.br/export-pdf/475/24-01-05.pdf) >.

DRURY, A. N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol**, v. 68, n. 3, p. 213-37, Nov 25 1929. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16994064> >.

ELSHARBINY, N. M. et al. Reno-protective effect of NECA in diabetic nephropathy: implication of IL-18 and ICAM-1. **Eur Cytokine Netw**, v. 23, n. 3, p. 78-86, Jul-Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995127> >.

EMMELIN, N.; FELDBERG, W. Systemic effects of adenosine triphosphate. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 3, n. 4, p. 273-84, Dec 1948. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18102596> >.

ERB, L. et al. P2 receptors: intracellular signaling. **Pflugers Arch**, v. 452, n. 5, p. 552-62, Aug 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16586093> >.

FERREIRA, S. R. G.; PITITTO, B. D. A. **Aspectos epidemiológicos do Diabetes Mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade**. DIABETES, S. B. D. 2014.

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> >.

GICQUEL, T. et al. IL-1 beta production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. **FASEB J**, v. 29, n. 10, p. 4162-73, Oct 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26116704>>.

HARADA, H. et al. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. **Kidney Int**, v. 57, n. 3, p. 949-58, Mar 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720948> >.

HILLMAN, K. A.; BURNSTOCK, G.; UNWIN, R. J. The P2X7 ATP receptor in the kidney: a matter of life or death? **Nephron Exp Nephrol**, v. 101, n. 1, p. e24-30, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925905> >.

HILLMAN, K. A. et al. The P2X7 ATP receptor modulates renal cyst development in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 322, n. 2, p. 434-9, Sep 17 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325248> >.

JIANG, L. H. et al. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. **J Biol Chem**, v. 275, n. 44, p. 34190-6, Nov 03 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940304> >.

KITCHING, A. R. et al. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. **Clin Exp Immunol**, v. 128, n. 1, p. 36-43, Apr 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11982588> >.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 3, p. 339-43, Mar 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629147> >.

LISTER, M. F. et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. **J Inflamm (Lond)**, v. 4, p. 5, Mar 16 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367517> >.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, Mar 09 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407890> >.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de controlo e seguimento da Diabetes mellitus 2015.**

MYSLIWSKA, J. et al. High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. **Eur Cytokine Netw**, v. 16, n. 2, p. 117-22, Jun 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941682> >.

NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n. 3, p. 433-42, Mar 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256353> >.

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, Feb 15 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406684> >.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413-92, Sep 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289> >.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTHER, J. M. **FARMACOLOGIA** 6. Rio de Janeiro: 2007.

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, R. et al. The ATP Receptors P2X7 and P2X4 Modulate High Glucose and Palmitate-Induced Inflammatory Responses in Endothelial Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125111, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25938443> >.

SCARPIONI, R.; RICARDI, M.; ALBERTAZZI, V. Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage. **World J Nephrol**, v. 5, n. 1, p. 66-75, Jan 06 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26788465> >.

SOLINI, A. et al. Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenetic mechanism for vascular damage in diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 7, p. 1240-5, Jul 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155383> >.

SOLINI, A. et al. Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. **Kidney Int**, v. 67, n. 3, p. 875-85, Mar 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15698427> >.

STENVINKEL, P. et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. **Kidney Int**, v. 67, n. 4, p. 1216-33, Apr 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780075> >.

SUGIYAMA, T. et al. Enhancement of P2X(7)-induced pore formation and apoptosis: an early effect of diabetes on the retinal microvasculature. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, n. 3, p. 1026-32, Mar 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985326> >.

SUZUKI, D. et al. In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 44, n. 10, p. 1233-8, Oct 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556963> >.

VONEND, O. et al. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. **Kidney Int**, v. 66, n. 1, p. 157-66, Jul 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200422> >.

WHO, W. H. O. Diabetes. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> >.

WILSON, P. D. et al. ATP release mechanisms in primary cultures of epithelia derived from the cysts of polycystic kidneys. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 2, p. 218-29, Feb 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215320> >.

XU, H. et al. High fatty acids modulate P2X(7) expression and IL-6 release via the p38 MAPK pathway in PC12 cells. **Brain Res Bull**, v. 94, p. 63-70, May 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23438872> >.

YAN, Z. et al. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. **J Gen Physiol**, v. 132, n. 5, p. 563-73, Nov 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852304> >.

ZHONG, X. et al. The impact of P2X7 receptor antagonist, brilliant blue G on graft-versus-host disease in mice after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Cell Immunol**, v. 310, p. 71-77, Dec 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27544305> >.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **DRUG DEVELOPMENT RESEARCH**, v. 52, p. 44-56, February 2001 2001. ISSN 1-2. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.1097/abstract> >.

## ANEXO



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO P2X7 SOBRE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NA PROGRESSÃO DA NEFROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL", protocolada sob o CEUA nº 2063030317, sob a responsabilidade de **Elisa Mieko Suemitsu Higa e equipe; Camila Farias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 26/05/2017.

We certify that the proposal "EFFECT OF P2X7 ON INFLAMMATION MARKERS IN THE PROGRESSION OF EXPERIMENTAL DIABETIC NEPHROPATHY", utilizing 0 Heterogenics rats (), protocol number CEUA 2063030317, under the responsibility of **Elisa Mieko Suemitsu Higa and team; Camila Farias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/26/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **06/2018**

Área: **Nefrologia/medicina**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **06/2018**

Área: **Nefrologia/medicina**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 8 semanas**

N: **0**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **170 a 200 g**

Resumo: RESUMO Introdução: Dados de 2008 divulgados pela Organização Mundial da Saúde afirmam que o diabetes mellitus foi diagnosticado em aproximadamente 347 milhões de pessoas, o qual pode ser duplicado até 2030. O diabetes é uma doença crônica que ocorre quando há insuficiência na produção de insulina ou quando a mesma não consegue ser utilizada de maneira eficiente pelo organismo. O receptor P2X7 (P2X7R) é sintetizado em situações em que altas quantidades de ATP são liberadas, particularmente em condições patológicas, tais como no diabetes. Estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou que a produção e a ativação do P2X7R estavam associadas ao estresse oxidativo no diabetes; entretanto, não foi analisado se esse receptor poderia estar associado a fatores inflamatórios na progressão dessa doença. Objetivo: analisar o efeito do P2X7 sobre marcadores inflamatórios na nefropatia diabética em ratos. Metodologia: ratos Wistar machos serão nefrectomizados unilateralmente. Metade dos animais será submetida à única aplicação de estreptozotocina (60 mg/kg, i.v.) para indução do diabetes constituindo o grupo diabético (DM) e a outra metade receberá o veículo da droga, formando o grupo controle (CTL). Os animais serão eutanasiados na 5ª, 6ª, 7ª e 8ª semanas do diabetes e o rim será removido e cortado longitudinalmente; parte do tecido será utilizada para a análise de proteínas via Western blotting, com anticorpos contra IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ Bp65, TGF- $\beta$  e P2X7, todos normalizados pela actina. A outra parte do tecido renal será utilizada para as análises histológicas (HE e PAS). Os resultados serão descritos como média  $\pm$  erro padrão, com significância estatística de  $p < 0,05$ . Palavras chave: diabetes mellitus experimental; inflamação; rins; P2X7. ANIMAIS Serão utilizados: 0 ratos heterogênicos Wistar, machos, de 170 a 200 g, de 7 a 8 semanas Procedência: Biotério da Disciplina de Nefrologia Manutenção: Biotério da Disciplina de Nefrologia Cronograma do estudo, início previsto para: 06/2017 com término previsto para: 06/2018

Local do experimento: Laboratório de Hipertensão e Laboratório de Óxido Nítrico

São Paulo, 26 de maio de 2017



## *Comissão de Ética no Uso de Animais*

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein  
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo