

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

LUCAS LENNER COELHO

VIAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA NEFROPATIA DIABÉTICA

SÃO PAULO

2018

LUCAS LENNER COELHO

VIAS METABOLICAS ENVOLVIDAS NEFROPATIA DIABÉTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Castro Poppe.

SÃO PAULO

2018

A Nefropatia Diabética (ND) é uma das complicações da Diabetes Mellitus, ocorre frequentemente no tipo I e é a principal causa de insuficiência renal em países desenvolvidos; além disso, é o principal motivo para pacientes ingressarem em diálise. Existem vários fatores de influência no desenvolvimento da doença, como o controle glicêmico adequado, mediadores humorais, perfil genético e fatores de crescimento. Todos esses fatores levam a alterações de vias metabólicas importantes na manutenção da matriz e membrana basal glomerular, dando início ao desenvolvimento da doença. A formação dos AGE (produtos finais de glicação avançada) é principalmente endógena e ocorre em condições fisiológicas em todos os tecidos e fluidos corporais. Os AGE afetam sobretudo moléculas de meia-vida longa, como o colágeno, e podem exercer uma importante função no processo natural do envelhecimento, contribuindo para o aparecimento ou agravamento de diversas doenças. Em níveis de glicose intracelular aumentados, a via dos poliois torna-se mais ativa, diminuindo a capacidade da célula em responder ao estresse oxidativo. A hiperglicemia aumenta a produção de DAG, promovendo uma maior ativação da PKC (proteína C cinase), que tem uma variedade de efeitos na expressão gênica. O aumento do fluxo da via das hexoaminas, resulta em aumento da expressão de TGF- β 1 e do inibidor do ativador do plasminogênio-1, promovendo crescimento e proliferação celular e dificuldade em degradar proteínas plasmáticas. Todas essas vias estão ligadas entre si, com um único fator em comum, a hiperglicemia. O trabalho tem como objetivo discutir as vias metabólicas envolvidas na patogênese da ND, após a realização pesquisas bibliográficas nas principais bases de dados. São necessários mais estudos para elucidar com mais clareza e complexidade as vias metabólicas envolvidas. A ND é uma doença complexa e estamos longe de entendê-la por completo, tornando possível um diagnóstico e um tratamento mais eficazes da doença.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Matriz extracelular. Membrana basal glomerular. Produtos finais de glicação avançada. Proteína quinase C.

LENNER, Lucas. **Vias Metabólicas envolvidas na Nefropatia Diabética**. 2018. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Diabetic Nephropathy (ND) is one of the complications of Diabetes Mellitus, often occurs in Type I, and is the leading cause of kidney failure in developed countries; in addition, it is the main reason for patients on dialysis. There are several factors influencing the development of the disease, such as adequate glycemic control, humoral mediators, genetic profile and growth factors. All these factors lead to alterations of important metabolic pathways in the maintenance of the matrix and glomerular basement membrane, initiating the development of the disease. The formation of AGEs (advanced glycation end products) is mainly endogenous and occurs under physiological conditions in all tissues and body fluids. AGEs mainly affect molecules with a long half-life, such as collagen, and can play an important role in the natural aging process and contribute to the appearance or aggravation of various diseases. At increased intracellular glucose levels, the polyol pathway becomes more active, decreasing the cell's ability to respond to oxidative stress. Hyperglycemia increases the production of DAG, promoting a greater activation of PKC (protein C kinase), which has a variety of effects on gene expression. Increased flow of the hexoamine pathway results in increased expression of TGF- β 1 and plasminogen-1 activator inhibitor, promoting cell growth and proliferation, and difficulty in degrading plasma proteins. All these pathways are linked together, with only one factor in common, hyperglycemia. The objective of this work is to discuss the metabolic pathways involved in the pathogenesis of ND, after performing bibliographic research in the main databases. Further studies are needed to elucidate the metabolic pathways involved with clarity and complexity. ND is a complex disease, and we are far from fully understanding it, making a more effective diagnosis and treatment of the disease possible

Keywords: Diabetes mellitus. Extracellular matrix. Glomerular basement membrane. Advanced glycation end products. Protein C Kinase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Segmentos tubulares básicos do néfron.....	9
Figura 2 - Corte transversal do glomérulo.....	10
Figura 3 - Corpo celular podocitário junto aos seus prolongamentos.....	11
Figura 4 - Sinalização célula-célula entre mesângios, podócitos e endotélio. ..	12
Figura 5 - Gráfico da correlação positiva entre glicose e angiotensina II.	14
Figura 6 - Aumento da secreção de TGF- β 1 em células mesangiais.....	15
Figura 7 - Esquema dos eventos envolvidos com o aumento da glicose, e o aumento da ang II.	16
Figura 8 – Esquema da reação de Amadori, formando AGE.....	17
Figura 9 - Os AGE caracterizados até o momento.....	19
Figura 10 - Formação dos AGE a partir da glicose (imagem anexo na última página do trabalho).....	20
Figura 11 - Complicações dos AGE.	22
Figura 12 - Via dos Poliois alterada.....	23
Figura 13 - Principais efeitos da superativação da PKC por conta da hiperglicemia.....	25
Figura 14 - Desvio da glicose para a via das hexoaminas.....	26
Figura 15 - Cadeia respiratória.	28
Figura 16 - Interação entre o aumento de glicose e as 4 vias metabólicas.....	29
Figura 17 - Ativação da PARP pelo DNA, clivagem do NAD e junção do GAPDH.	30
Figura 18 - Figura esquemática de todo o processo de superativação das vias.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

1-DG – 1-DESOXIGLICOSONA

2-DG – 1-DESOXIGLICOSONA

AGE - PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

ALE – PRODUTOS FINAL DE LIPOXIDAÇÃO AVANÇADA

ANG II - ANGIOTENSINA 2

CTGF – FATOR DE CRESCIMENTO DO TECIDO CONECTIVO

DM1 - DIABÉTES MELITOS TIPO 1

DRC – DOENÇA RENAL CRÔNICA

ECA – ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

ESRD - DOENÇA RENAL DE ESTÁGIO FINAL

GAPDH – GLICERALDEÍDO - 3 - FOSFATO DESIDROGENASE

GFAT - GLUTAMINA FRUTOSE-6-FOSFATO AMIDOTRANSFERASE

GO – GLIOXAL

GSH – GLUTATIONA REDUZIDA

GSSH – GLUTATIONA OXIDADA

HAS – HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

IRC – INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA

LDL – LIPOPOLIPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

MEC – MATRIZ EXTRACELULAR

MG - METILGLIOXAL

ND - NEFROPATIA DIABÉTICA

NO – OXIDO NÍTRICO

PA-1 – ANTIPLASMINA TIPO 1

PARP – POLI ADP-RIBOSE POLIMERASE

PDGF – FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

PKC - PROTEINA C QUINASE

RAGE – RECEPTORES PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA

RCS – ESPÉCIES CARBONÍLICAS ALTAMENTE REATIVAS

RFG – RITMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

ROS – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

SRA – SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

TRS - TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA

UDP – URIDINA DIFOSFATO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO	3
3	METODOLOGIA	4
4	DESENVOLVIMENTO	5
4.1.	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo I.....	5
4.2.	Epidemiologia da <i>Diabetes Mellitus</i> Tipo I e a Nefropatia diabética	5
4.3.	Classificação da Nefropatia Diabética	7
4.4.	As células mesangiais e podocitárias na Nefropatia Diabética.....	9
4.5.	O papel na Angiotensina II na Nefropatia Diabética	13
4.6.	As vias metabólicas envolvidas na Nefropatia Diabética.....	16
4.6.1.	Via dos AGE	16
4.6.2.	Via dos Poliois	22
4.6.3.	Via da PKC (Proteína Cinase C).....	23
4.6.4.	Via das Hexoaminas.....	25
4.6.5.	Unificação das vias	27
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

A Nefropatia Diabética (ND) é uma complicação microvascular crônica, desenvolvida em pacientes que possuem Diabetes Mellitus (I e II) descompensados em longo prazo, sendo a principal causa de insuficiência renal em países desenvolvidos e o principal motivo para transplante renal. A ND é uma doença lenta que acomete os glomérulos, mais especificamente a membrana basal, responsáveis pela filtração glomerular, impedindo passagem de proteínas e permitindo passagem de metabólitos indesejáveis para o sangue (FARIA, 2001); (PINTO et al., 1997).

O fator crucial para o desencadeamento da doença é a hiperglicemia, comum em pacientes com diabetes, que promove o espessamento da membrana basal e acúmulo de matriz extracelular glomerular. As principais células envolvidas na patogênese da doença são as células mesangios e os podócitos (responsáveis pela manutenção da matriz extracelular e da membrana basal glomerular respectivamente), a partir de várias modificações fisiológicas a que são submetidos (FARIA, 2001); (SILVA et al., 2001); (YOUNES-IBRAHIM, 2013).

Os podócitos são células epiteliais modificadas, estão ligadas à membrana basal, envolvendo todo o endotélio glomerular. O podócito pode ser dividido em 2 partes, cada uma com uma função: O corpo celular que se encontra flutuando na cápsula de Bowman, e os pedicelos, que são projeções, de padrão interdigitado, da membrana celular podocitária até a membrana basal (SILVA et al., 2001).

Na hiperglicemia observamos uma maior expressão de GLUT 1, proporcionando grande entrada de glicose nestas células, insulino-independentes, provocando grande formação de superóxidos, o que gera estresse oxidativo. Estas células sob estresse oxidativo, sofrerão modificações metabólicas. As principais vias metabólicas envolvidas na patogênese da doença são: via dos poliois, via dos produtos finais de glicação avançada (AGE), via das hexoaminas e a via da Proteína Cinase C (PKc) (BROWNLEE, 2005).

Os AGE são resultados de reações não enzimáticas entre glicose e outras moléculas presentes no local. Os AGE são responsáveis também por outras

complicações da diabetes, como por exemplo, a aterosclerose e a retinopatia. A via dos AGE é a mais importante via responsável pela progressão da doença e desenvolvimento de microalbuminúria. Os AGE possuem receptores específicos em diversas células, principalmente as células mesangiais, promovendo sua ativação e produção de matriz (BROWNLEE, 2005); (AMORIM et al., 2013).

A via dos poliois, responsável pela formação de sorbitol também será afetada pela hiperglicemia. Observamos a aldose redutase super estimulada nesta condição, além de um consumo excessivo de NADPH (importante agente antioxidante), gerando um maior estresse oxidativo (BROWNLEE, 2005).

A via das hexoaminas e da PKC promovem a ativação de fatores de transcrição e, portanto, maior formação de fatores de crescimento, contribuindo para um aumento na deposição de matriz extracelular (BROWNLEE, 2005).

Frente ao exposto, torna-se necessário uma revisão bibliográfica a fim de reunir, sintetizar e discutir a patogênese da ND, para um melhor entendimento da doença e para futuras aplicações.

2 OBJETIVO

Realizar levantamento bibliográfico, dos últimos 10 anos, em base de dados (SciELO, PubMed, Google Acadêmico) e bibliotecas científicas, para analisar e elaborar uma discussão dos mecanismos envolvidos na patogênese da Nefropatia Diabética e, assim melhorar o entendimento da doença para fins diagnóstico e terapêutico.

3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica utilizando as principais bases de dados online como PubMed e Google Acadêmico, a revista eletrônica Scielo, e revistas eletrônicas específicas de acordo com o direcionamento das bases de dados, nas línguas português e inglês. Foram utilizados também livros dos acervos bibliográficos da biblioteca Padre Inocente Radrizzani, no Centro Universitário São Camilo.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1. *Diabetes Mellitus* Tipo I

A *Diabetes Mellitus tipo I* (DM1) é uma doença metabólica multifatorial que acomete o pâncreas endócrino, acarretando um aumento acentuado da glicemia. Caracterizada pela perda da função das células beta do pâncreas devido a processos autoimunes ou por traumas na região, provoca a perda da capacidade de secretar insulina (hormônio importante no controle glicêmico e outros processos metabólicos), consequentemente aumentando a glicose no sangue. A DM1 é um importante foco de estudo, pois é uma doença que acomete outros órgãos levando a outras doenças, por exemplo, retinopatias, nefropatias neuropatias, encefalopatias e doenças cardiovasculares. A ND é a principal causa de mortalidade em pacientes com DM1 e será o foco deste trabalho (SAÚDE et al., 2006)

4.2. Epidemiologia da *Diabetes Mellitus* Tipo I e a Nefropatia diabética

A DM1 é comum e tende a crescer ainda mais, em 1995 atingiu 4,0% da população adulta mundial e estima-se em que 2025 alcançará a cifra de 5,4%. A DM1 está mais presente em países desenvolvidos e geralmente acomete pessoas numa faixa etária de 45-64 anos (SAÚDE et al., 2006).

A diabetes apresenta alta morbimortalidade, com perda importante na qualidade de vida. É uma das principais causas de mortalidade, cegueira, insuficiência renal, amputação de membros inferiores e doenças cardiovasculares. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 1997 que, após 15 anos de doença, 2% dos indivíduos acometidos estarão cegos e 10% terão deficiência visual grave. Além disso, estimou que, no mesmo período de doença, 30 a 45% terão algum grau de retinopatia, 10 a 20%, de nefropatia, 20 a 35%, de neuropatia e 10 a 25% terão desenvolvido doença cardiovascular (SAÚDE et al., 2006).

Bright (1836) mostrou a hipótese de que a albuminúria poderia refletir uma doença renal nos pacientes diabéticos. Uma década depois, Kimmelstiel e Wilson (1936) descreveram lesões intercapilares glomerulares como causa da doença (SALGADO, 2007).

Grande parte da literatura sobre a prevalência da ND no DM1 se refere aos pacientes adultos. No estudo americano “Pittsburg Epidemiology of Diabetes Complication Study” publicado em 1990, foram avaliados 657 pacientes com idade média de 24 anos e média de duração do DM1 de 16 anos. A nefropatia afetou 30% dos pacientes com 20 anos de evolução da DM1 e 40% após 30 anos de DM1 (SALGADO, 2007).

No estudo “EURODIAB IDDM Complications Study”, publicado em 1994, foram selecionados aleatoriamente 3250 indivíduos em 16 países, na faixa etária entre 15 e 60 anos de idade (média 32,7 anos). O tempo de evolução da DM 1 foi em média de $14,7 \pm 9,3$ anos. A micro ou macroalbuminúria (presença de albumina na urina) foi detectada em 40% dos pacientes com 20 anos de DM 1, mantendo esse patamar com 30 anos de evolução da diabetes (SALGADO, 2007).

Estudos mais recentes avaliaram a presença de ND em pacientes com 10 anos de evolução da doença. Foram incluídos 426 pacientes com DM1, e detectou-se a presença de microalbuminúria ou proteinúria em 5,6% dos casos. A idade dos indivíduos ao diagnóstico da DM1 variou de 15 a 34 anos. Na faixa etária pediátrica, Svensson et al. (2004) avaliaram a presença de ND em crianças com diagnóstico de DM1 entre 0 e 14 anos, com média de $8,9 \pm 3,7$ anos. A média do tempo de acompanhamento foi de 12 ± 4 anos, 18% dos pacientes desenvolveram microalbuminúria; nenhum indivíduo evoluiu, nesse período, para proteinúria ou DRC (Doença Renal Crônica) (SALGADO, 2007); (SVENSSON; ERIKSSON; DAHLQUIST, 2004).

Na literatura existem dados conflitantes sobre a influência da idade e início do DM1 e desenvolvimento de ND. Outros estudos mostraram que o DM1 que se inicia antes da puberdade tem pior prognóstico em relação à presença de ND que o diabetes que se inicia após essa idade, obviamente por conta do tempo exposto a doença. Harvey et al. (2003) compararam dois grupos de pacientes com DM1: um com diagnóstico do diabetes antes dos 15 anos de idade e o outro com diagnóstico do DM1 após os 20 anos de idade. O primeiro grupo apresentou risco 2,6 vezes maior de desenvolver microalbuminúria e o outro apresentou risco 3,8 vezes maior de desenvolver proteinúria. No entanto, outros estudos não confirmaram tal hipótese (SALGADO, 2007); (HARVEY; ALLAGOA, 2003).

A ND é responsável pelo óbito de cerca de 20 a 30% dos pacientes com diabetes entre o terceiro e quarto decênio de vida, e é a principal causa da ESRD (Doença Renal de Estágio Final), além disso, é a causa mais comum de insuficiência renal crônica nos países desenvolvidos. Apenas nos Estados Unidos da América, o custo anual para o tratamento foi superior a US\$ 7 bilhões, em 1990, e a US\$ 9 bilhões, em 1994, ou um custo de 50 mil dólares/paciente/ano. Além da sua alta prevalência, vale ressaltar que a ND está associada a uma alta frequência de óbitos por causas cardiovasculares (SALGADO, 2007).

No Brasil, o número estimado de pacientes em terapia renal substitutiva (TRS) aumentou de 42.000 no ano 2000, para mais de 90.000 pacientes no final de 2010. A taxa de prevalência de tratamento dialítico em 2010 foi de 483 pacientes por milhão da população (pmp), variando de 265 pmp na região norte a 591 pmp na região sudeste. Deste total, 89,7% eram submetidos à hemodiálise e 5,1% à diálise peritoneal. Em conformidade com censos anteriores, os diagnósticos etiológicos da DRC mais frequentemente encontrados foram hipertensão arterial sistêmica (HAS), seguida por *DM* (SESSO et al., 2011).

4.3. Classificação da Nefropatia Diabética

A DM1 é a principal causa da Nefropatia Diabética (ND). A ND é uma doença microvascular que acomete os néfrons, mais especificamente, os glomérulos que são responsáveis pela filtração do sangue e formação da urina, pela qual vários metabólitos desnecessários são excretados. É uma doença comum em países desenvolvidos e principal motivo de ingresso em diálise por insuficiência renal além disso é uma doença lenta que promove o espessamento da membrana basal e da matriz extracelular glomerular podendo levar a perda da função dos rins. A ND costuma aparecer em pacientes com 10 a 20 anos de evolução da doença, geralmente diabetes mal tratada ou pacientes com pre disposição genética (SALGADO et al., 2004).

A doença apresenta fases de normoalbuminúria com hiperfiltração até doença renal terminal, passando por vários estágios caracterizados pela albuminúria e posteriormente proteinúria (presença elevada de proteínas na urina). A ND é

classificada em quatro estágios: hiperfiltração, nefropatia incipiente, nefropatia clínica e nefropatia terminal (SALGADO et al., 2004).

O estágio de hiperfiltração é caracterizado pelo aumento do ritmo da filtração glomerular, por conta de alterações no fluxo e pressão arterial, e normoalbuminúria decorrente da inflamação no local (SALGADO et al., 2004).

Na nefropatia incipiente a excreção urinária de albumina situa-se entre 20-200 $\mu\text{g}/\text{min}$ ou 30-300 mg/24h. O ritmo de filtração glomerular (RFG), usualmente, encontra-se elevado de início, com tendência ao declínio, quando a albuminúria alcança valores superiores a 70 mg/min (SALGADO et al., 2004).

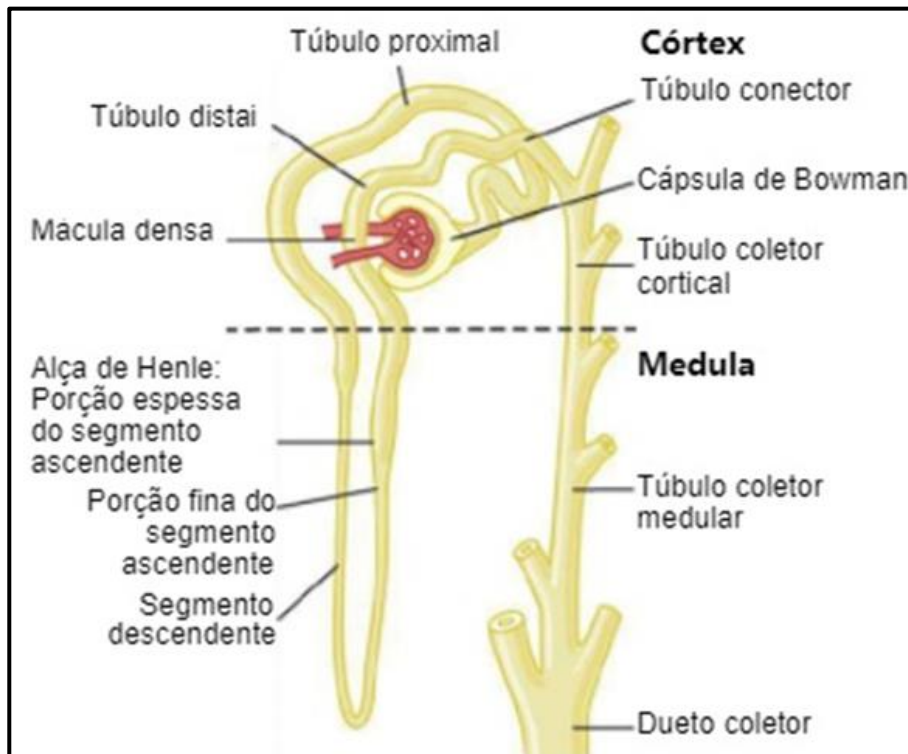
Na nefropatia clínica observamos valores maiores de albuminúria do que na nefropatia incipiente, e este estágio é caracterizado pelo começo da queda do ritmo da filtração glomerular (SALGADO et al., 2004).

Logo, na nefropatia terminal, observamos pacientes com IRC (Insuficiência Renal Crônica), submetidos em programas de diálise e transplante renal (SALGADO et al., 2004).

Os rins exercem outras funções importantes, além da filtração do sangue, entre elas a regulação do balanço hidroeletrolítico, a regulação da osmolaridade dos líquidos corporais, a regulação da pressão arterial e a regulação do equilíbrio ácido-base. Cada rim possui mais de 800.000 néfrons (unidade funcional), cada néfron possui estruturas que formam e direcionam a urina até a bexiga (Figura 1) (GUYTON; HALL, 2011).

Os glomérulos são formados por um emaranhado de capilares, envolvidos por uma estrutura chamada cápsula de Bowman. O sangue chega até os capilares onde são filtrados e chegam ao interior da cápsula formando o ultrafiltrado, o filtrado passa pelo túbulo proximal onde, a glicose e os aminoácidos são reabsorvidos segue, pela alça de Henle e depois pelos túbulos distais onde ocorre o controle da excreção de água e sal e, por fim, alcança os dutos coletores até chegar a bexiga de onde será excretada (GUYTON; HALL, 2011).

Figura 1 - Segmentos tubulares básicos do néfron



FONTE: (GUYTON; HALL, 2011).

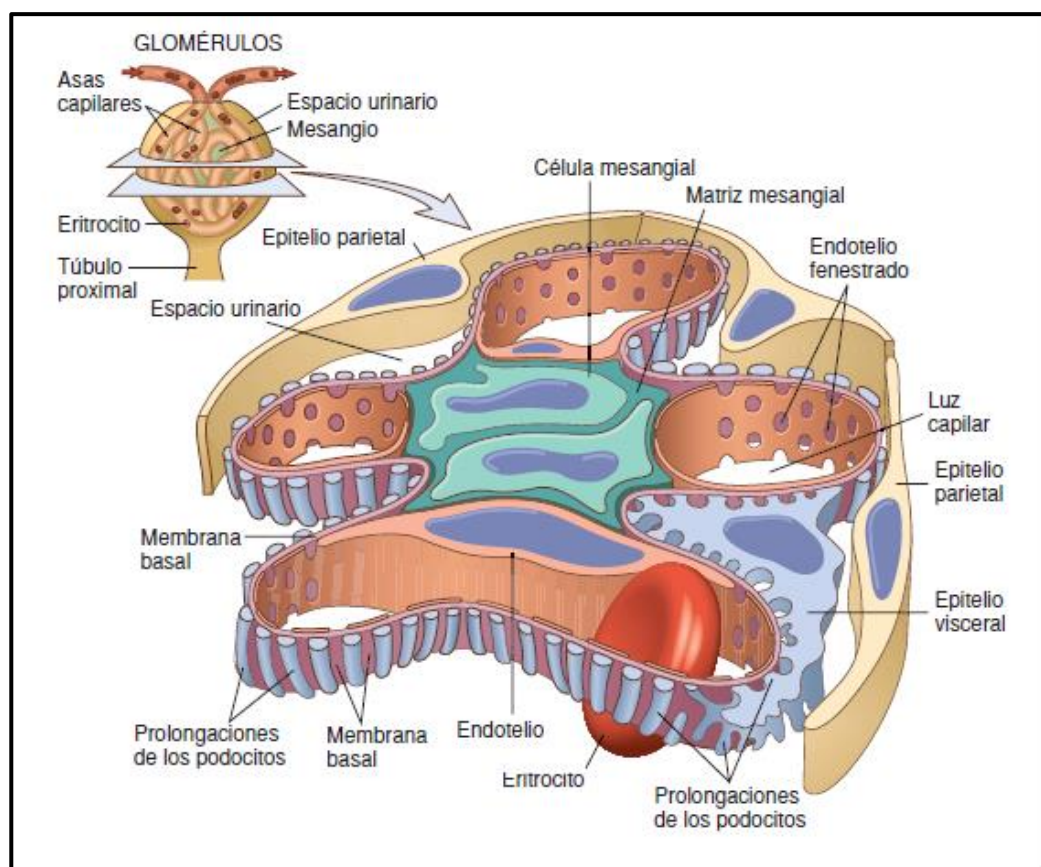
4.4. As células mesangiais e podocitárias na Nefropatia Diabética

A ND é uma doença microvascular que acomete os glomérulos, mais especificamente é uma esclerose glomerular, ou seja, leva ao espessamento da matriz extracelular e membrana basal glomerular. O fator desencadeante é a hiperglicemia, promovendo uma série de alterações metabólicas, principalmente nas células mesangiais e células podocitárias, mostradas na figura 2, que são células importantes para a formação e manutenção da matriz extracelular glomerular (tem como função suporte e comunicação entre outras células) e membrana basal (uma das responsáveis pela filtração do sangue), respectivamente (FARIA, 2001).

O corpúsculo de Malpighi compreende o espaço de Bowman e o emaranhado de capilares. O espaço de Bowman possui dois folhetos, um interno, acoplado aos capilares, e outro parietal. O folheto parietal da cápsula é formado por epitélio pavimentoso, que se apoia na lâmina basal (importante barreira de filtração, possui três camadas, lamina rara externa filtração por carga, interna filtração por carga e lamina rara profunda filtração por tamanho) e em fina camada de fibras reticulares. Já

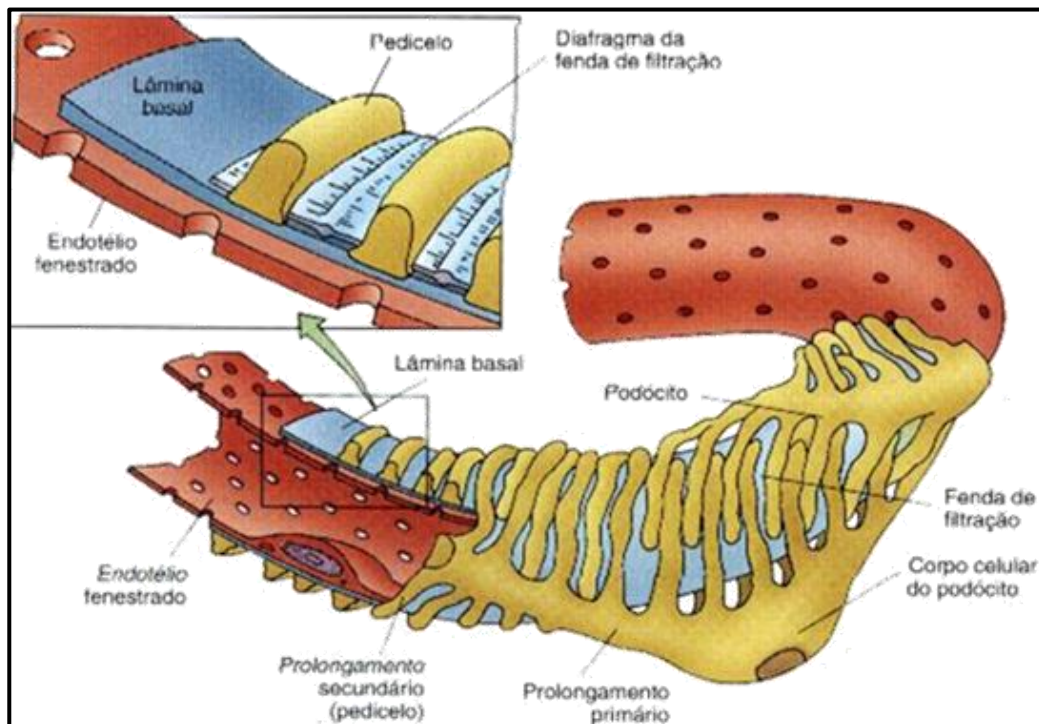
o folheto visceral é formado por células epiteliais que se modificam durante o desenvolvimento embrionário, adquirindo características próprias, as células chamadas de podócitos ou células epiteliais viscerais mostradas nas figuras 2 e 3. Os podócitos são constituídos por um corpo celular, de onde originam-se prolongamentos primários que dão origem aos secundários, formando os processos podálicos ou podais. Cada podócito possui processos podais que interdigitam-se, deixando entre si espaços, denominados poros ou fendas de filtração. Os poros são unidos por estruturas extracelulares, que constituem seus diafragmas. Os podócitos contribuem para as características de permeabilidade hidráulica dos glomérulos e executam função importante na filtração de macromoléculas. As principais funções dos podócitos são: renovação da membrana basal glomerular, manutenção da barreira de filtração, regulação do coeficiente de ultrafiltração e sustentação do capilar glomerular (SILVA et al., 2001).

Figura 2 - Corte transversal do glomérulo



Evidencia os folhetos parietal e visceral do espaço de Bowman, mesangio, podócitos e seus prolongamentos, membrana basal e endotélio. FONTE: (CORDINHÃ, 2017)

Figura 3 - Corpo celular podocitário junto aos seus prolongamentos.



FONTE: (CHAVARRIA, 2014)

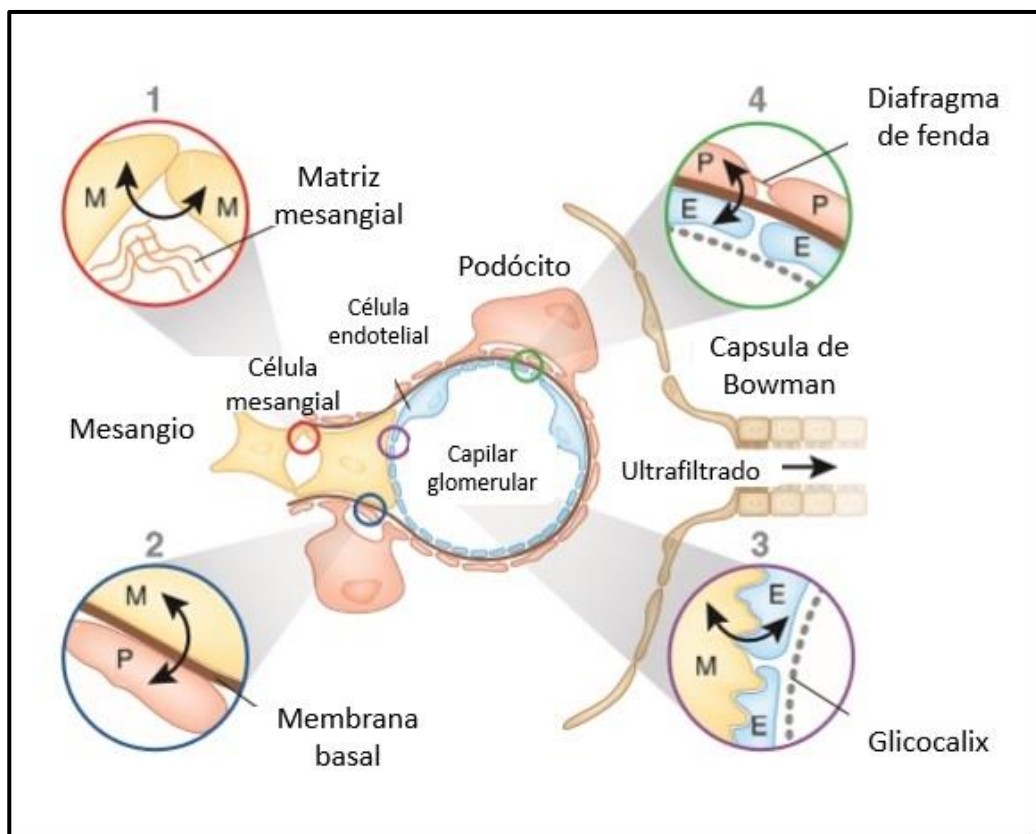
As células mesangias (Figuras 2, 3, 4) também são importantes no desenvolvimento da ND. As células mesangiais são embebidos por sua própria matriz extracelular, que é diferente da matriz da membrana basal glomerular. A matriz é formada por colágeno tipo IV (de cadeia $\alpha 1$ e $\alpha 2$), colágeno tipo V, laminina A, B1 e B2 e consideráveis quantidades de fibronectinas, sulfato de heparan, proteoglicanos e enactina (SCHLONDORFF, 1996) (SCHLONDORFF, 2009).

A matriz se mantém controlada na normalidade, mas quando a homeostasia é alterada, a matriz pode ser alterada, como por exemplo na ND. Além disso a matriz responde a fatores de crescimento, como o TGF- β , e a processos mecânicos. As células mesangias são sinalizadas quando há mudança conformacional dos capilares glomerulares, por conta de alteração no fluxo ou na pressão glomerular, em resposta os mesângios produzem fatores solúveis, como o TGF- $\beta 1$, e fator de crescimento do tecido conectivo (SCHLONDORFF, 1996) (SCHLONDORFF, 2009).

Existem outras funções extremamente importantes dos mesângios como: suporte estrutural para o glomérulo e alças capilares, local alvo para agentes vasoativos, tais como: (a) vasoconstritores, como angiotensina II, endotelina,

vasopressina e norepinefrina; (b) vasodilatadores, como óxido nítrico, prostaglandinas e dopamina. local alvo para mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas com efeitos, por exemplo, na hemodinâmica local, proliferação celular e renovação de matriz; e produtos finais de glicação avançada (AGE). Todas as células presentes no glomérulo estão conectadas entre si, conforme observado na figura 4 (SCHLONDORFF, 1996) (SCHLONDORFF, 2009).

Figura 4 - Sinalização célula-célula entre mesângios, podócitos e endotélio.



1- Comunicação entre a matriz extracelular e mesângios (M), 2- comunicação entre mesângios (M) e podócitos (P), 3- comunicação entre endotélio (E) e mesângio (M), 4- comunicação entre endotélio (E) e podócitos (P). Todas as células do glomérulo estão ligadas. FONTE: Adaptado (SCHLONDORFF, 1996).

O potencial da célula mesangial em fornecer suporte para as alças capilares glomerulares foi inferido a partir de estudos ultraestruturais. Recentemente, um modelo imunológico de mesangiólise realizado por Iversen (1992) e de inativações genéticas *in vivo* para receptores de PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) ou PDGF realizado por Soriano (1994) forneceram evidências diretas de

que as células mesangiais são necessárias para a geração e manutenção de alças capilares glomerulares, demonstrando sua principal função (SCHLONDORFF, 1996).

O modelo imunológico aproveita a presença única do antígeno Thy 1.1 nas membranas celulares mesangiais em ratos. A injeção de anticorpos anti-Thy-1.1 resulta numa lise, dependente de complemento, de células mesangiais com perda de capilares individuais e formação de microaneurismas vasculares. Após o recrescimento das células mesangiais, provavelmente a partir do pólo vascular glomerular, os capilares individuais são restabelecidos (SCHLONDORFF, 1996).

Suporte adicional para o significado das células mesangiais no estabelecimento de alças capilares glomerulares individuais vem de camundongos geneticamente modificados. Em ambos os camundongos, deficientes em PDGF-3 ou no receptor PDGF-J3 por mutagênese, observou-se falha de crescimento das células mesangiais no glomérulo durante o desenvolvimento renal. A falta de células mesangiais resulta na formação de sacos vasculares intraglomerulares, em vez da rede capilar normal (SCHLONDORFF, 1996).

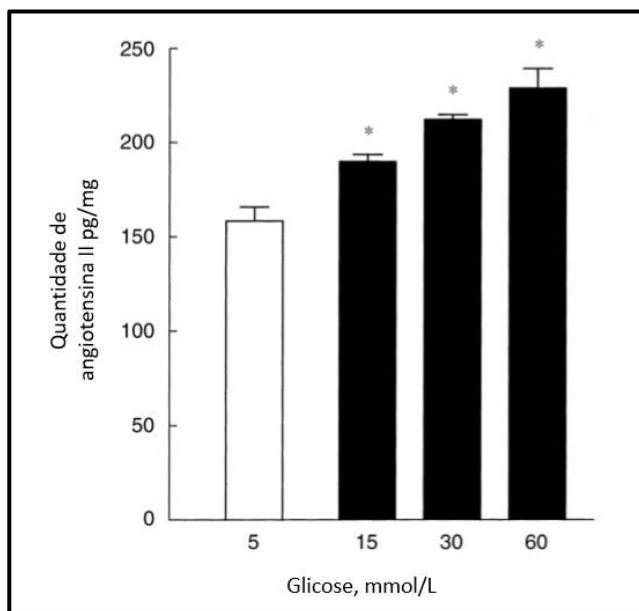
4.5. O papel na Angiotensina II na Nefropatia Diabética

Os níveis de angiotensina II (ang II) e os RNAm que compõem o SRA (Sistema renina - angiotensina) estão elevados nos rins de ratos diabéticos e humanos, evidenciando uma função importante do SRA intrarrenal no desenvolvimento ND (ANDERSON et al., 1993.) Em condições fisiológicas, a concentração de Ang II no plasma é de 10 a 20 pM (HERMANN et al., 1988); (SCHULZ et al., 2014), na luz do túbulo proximal renal, a concentração do peptídeo alcança a faixa de nanomolar, indicando atividade da ECA (enzima conversora de angiotensina) local. A presença de angiotensinogênio no túbulo proximal é bem demonstrada (ROHRWASSER et al., 1999); (KOBORI et al., 2001); (KOBORI et al., 2006). Estudos sugerem que, em condições fisiológicas ou patológicas, parte do angiotensinogênio hepático é filtrada no glomérulo e, em seguida, incorporada pelas células dos segmentos S1 e S2 do túbulo proximal (POHL et al., 2010); (MATSUSAKA et al., 2012); (MATSUSAKA et al., 2014).

Diversos estudos demonstram que as células mesangiais possuem seu próprio SRA. A diminuição da atividade da renina plasmática é frequentemente observada na ND, devido à glicação não enzimática da pró-renina, contudo não observamos esta

diminuição da renina intrarrenal. Foi mostrado que os receptores para ang II, na região glomerular, estão em pequena quantidade em ratos induzidos à diabetes. Altas concentrações de ang II diminuem o número de seus receptores, logo a sua ação vasoconstritora diminui, ocorrendo a vasodilatação nos capilares glomerulares. Isso promove uma ativação mecânica das células mesangiais, produzindo fatores de crescimento e, conseqüentemente a expansão mesangial, observada na ND. De acordo com estudos realizados em cultura de células (Figura 5), foi observado que as células mesangiais possuem todos os elementos do SRA e, em grandes quantidades de glicose, ocorre uma maior formação ang II, por um mecanismo não bem esclarecido (LEEHEY et al., 2000).

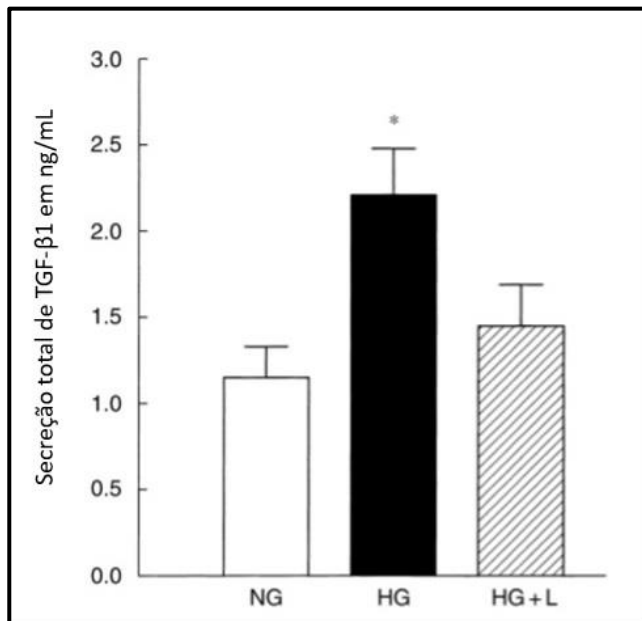
Figura 5 - Gráfico da correlação positiva entre glicose e angiotensina II.



O estudo foi realizado, em cultura de células mesangiais submetidas a concentrações crescentes de glicose levando ao aumento da ang II. As medidas de ang II foram obtidas por ELISA. Podemos observar uma correlação positiva entre a glicose e a ang II. FONTE: Adaptado (LEEHEY et al., 2000).

A ang II ao se ligar ao receptor AT1, localizado na membrana das células mesangiais, promove a ativação da via de sinalização da PKC e, conseqüentemente, a maior formação de TGF- β 1, importante fator de crescimento e proliferação celular, promovendo a formação da matriz extracelular mesangial e de células tubulares, figura 6.

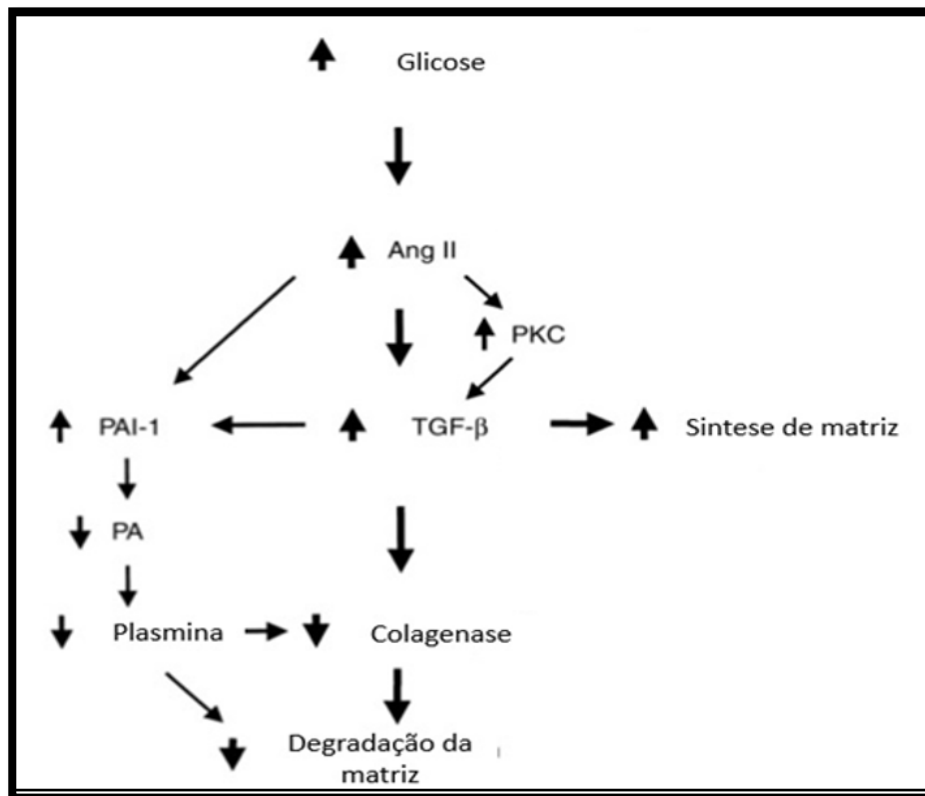
Figura 6 - Aumento da secreção de TGF- β 1 em células mesangiais.



Estudo realizado em cultura de células mesangiais, submetidas às seguintes condições: NG (quantidade normal de glicose) incubadas com 5 mmol/L de glicose; HG (alta concentração de glicose) incubadas com 30 mmol/L; e HG+L (alta concentração de glicose + losartana) incubadas com 30 mmol/L de glicose + losartana (antagonista de AT1). Medidas de TGF- β 1 foram obtidas por ELISA. Podemos observar aumento na secreção de TGF- β 1 em HG. FONTE: Adaptado (LEEHEY et al., 2000).

A figura 7 representa esquematicamente a cascata que a ang II desencadeia nas células mesangiais, quando em grandes concentrações.

Figura 7 - Esquema dos eventos envolvidos com o aumento da glicose, e o aumento da ang II.



A hiperglicemia, aumenta a concentração de ang II que promove a maior ativação da PKC nas células mesangiais, promovendo a maior síntese de matriz e diminuição da degradação da matriz. FONTE: Adaptado (LEEHEY et al., 2000).

4.6. As vias metabólicas envolvidas na Nefropatia Diabética

Como visto anteriormente, a hiperglicemia pode alterar os níveis de ang II intrarrenal e, como consequência, gerar um aumento da matriz extracelular glomerular, como observado na ND. Além disso, existem quatro vias metabólicas alteradas na ND: vias que levam a formação de AGE, via dos poliois, via da PKC e via das Hexoaminas (BROWNLEE, 2005).

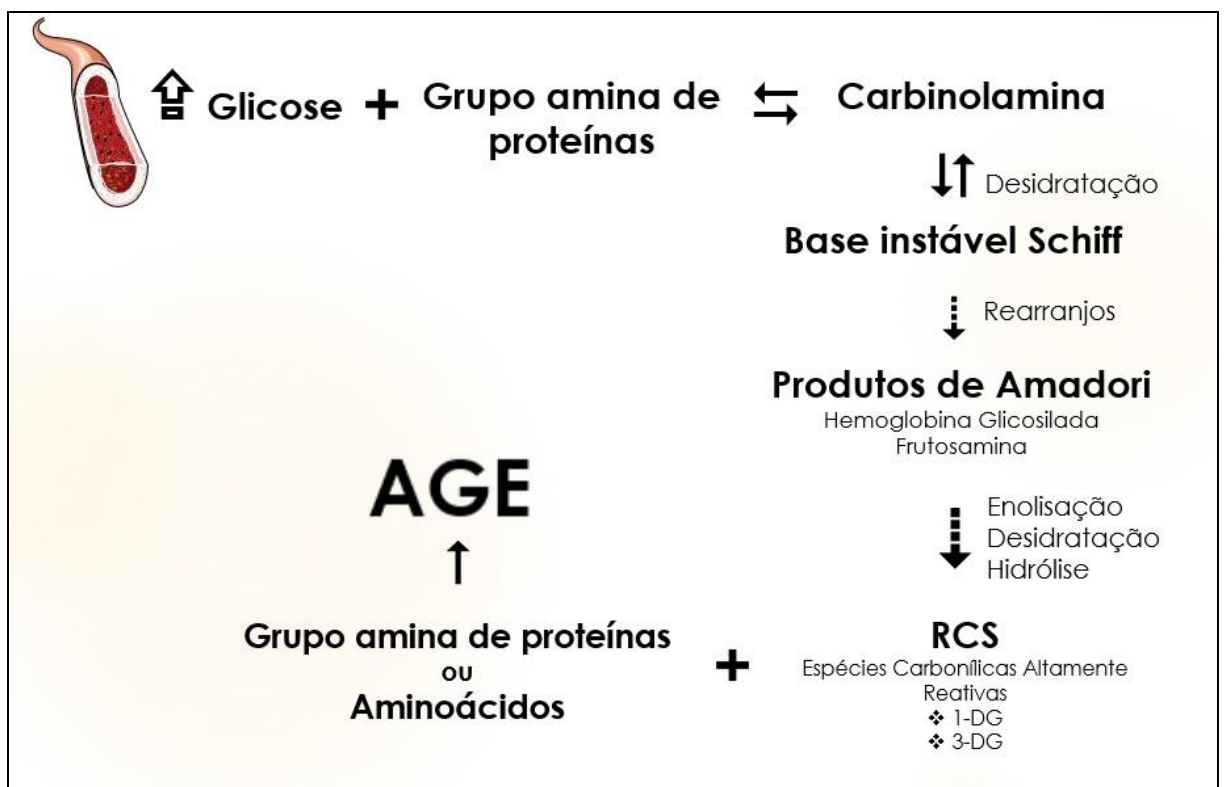
4.6.1. Via dos AGE

Descrito inicialmente em 1912 por Louis Camille Maillard (1878-1936), o fenômeno da glicação, também conhecido como reação de Maillard, é uma reação não enzimática, que se dá no meio biológico ou em alimentos, entre açúcares e grupos nucleofílicos de biomoléculas. Mais especificamente, glicação é uma sequência de

reações não enzimáticas que se inicia quando açúcares redutores, como glicose e frutose, reagem com grupos nucleofílicos de aminoácidos constituintes de proteínas, ou grupos nucleofílicos presentes em lipídeos e/ou ácidos nucleicos, gerando os chamados produtos de glicação avançada (AGE, acrônimo em inglês para Advanced Glycation End-Products). Os primeiros estudos para elucidar o mecanismo da reação de glicação foram feitos pelo italiano Mario Amadori (1886- 1941), em 1920.

A reação de glicação (Figura 8) tem início na adição de uma amina primária a um açúcar redutor (glicose), formando uma carbinolamina intermediária. A carbinolamina sofre desidratação, formando uma base de Schiff instável que sofre um rearranjo, formando produtos mais estáveis, os chamados produtos de Amadori, cuja característica principal consiste na geração da função amino-carbonila, nos açúcares. Estes intermediários podem sofrer enolização e depois sofrer uma série de reações de desidratação e hidrólise, formando espécies carbonílicas altamente reativas (RCS, acrônimo em inglês para Reactive Carbonyl Species), como os compostos dicarbonílicos, 1-desoxiglicosona e 3- desoxiglicosona (1-DG e 3-DG respectivamente). Os compostos dicarbonílicos formados neste processo reagem com o grupo amino de aminoácidos para a formação dos AGE (TORRES et al., 2018).

Figura 8 – Esquema da reação de Amadori, formando AGE.



Contudo, não é somente a reação de glicação que leva à formação de AGE, mas todas as reações que levam à formação de compostos dicarbonílicos no organismo contribuem para a formação dos AGE. Assim, podem ser formados *in vivo* por outras vias, além da reação de Maillard, como por exemplo, pela glicólise ou pela oxidação de açúcares, de lipídios e de aminoácidos, nas reações de glicoxidação, lipoxidação e nos processos inflamatórios. A lipoxidação, que também envolve reações não enzimáticas de RCS, formam os chamados produtos finais de lipoxidação avançada (ALE, acrônimo em inglês para Advanced Lipoxidation End-products), mas com resíduos nucleofílicos de macromoléculas (TORRES et al., 2018).

Diferentemente das outras reações, a glicólise é a principal via metabólica para a formação de energia metabólica, o ATP (trifosfato de adenosina) na célula. Inicia-se com a fosforilação da glicose, dando origem à glicose-6-fosfato, que sofre isomerização reversível, catalisada por enzima, para a formação da frutose-6-fosfato. Em seguida, ocorre uma segunda fosforilação formando frutose-1,6-bisfosfato que sofre quebra para formação do gliceraldeído-3-fosfato, que é facilmente convertido em di-hidroxiacetona-fosfato. Esse, por sua vez, sob ação da enzima MGO sintase, é transformado no composto dicarbonílico metilglioxal (MG), que ao reagir com o grupo amino de aminoácidos, forma AGE (TORRES et al., 2018).

Também temos a oxidação de Wolff que é uma oxidação radicalar catalisada por metais e ocorre na forma enólica da glicose, no produto de Amadori e também no glicolaldeído, um dos produtos da retroaldolização da glicose. A retroaldolização da glicose forma eritritol e glioxal (GO) ou eritrose e glicolaldeído (TORRES et al., 2018).

O mecanismo da oxidação de Wolff, propriamente dito, inicia-se com um cátion metálico que retira um elétron da forma enólica da glicose, formando um radical que reage com o oxigênio dando origem a compostos dicarbonílicos como a glucosona ou a 3-desoxiglicosona, e oxigênio molecular. O catalisador metálico é regenerado ao reagir com peróxido de hidrogênio, formado pela reação de dismutação entre duas moléculas de radical ânion superóxido, processo que, a seguir, pode resultar em radicais hidroxila, pela reação de Haber Weiss ou Fenton. A 3-desoxiglicosona formada está em equilíbrio com a sua forma enólica e esta pode sofrer uma retroaldolização formando gliceraldeído e um ceto-enol que está em equilíbrio

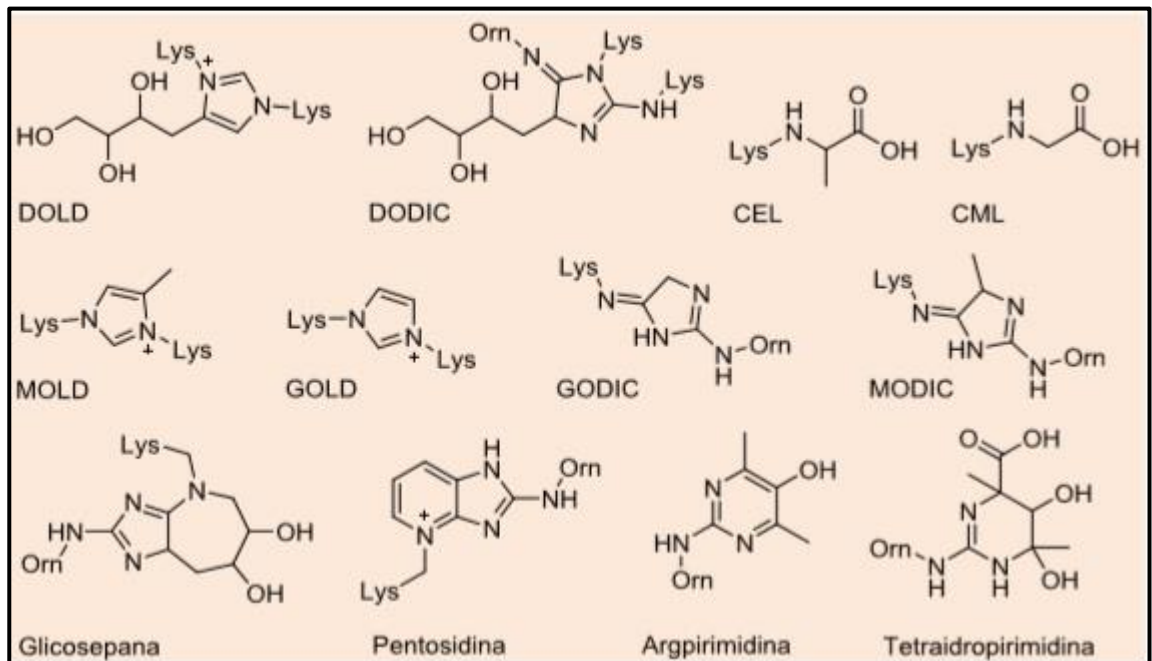
cetoenólico com o MG. A oxidação de Wolff do produto de Amadori resulta também na formação do GO (TORRES et al., 2018).

Além dos processos de oxidação, os compostos dicarbonílicos podem ser produzidos a partir da hidrólise da base de Schiff formada a partir da reação de glicação inicial, em um processo chamado de rota de Namiki (TORRES et al., 2018).

Existem poucos AGE que foram claramente estudados e identificados, sendo os mais comuns derivados dos compostos dicarbonílicos GO, MG e 3-desoxiglicosona. Alguns exemplos dos AGE, já identificados (Figura 8).

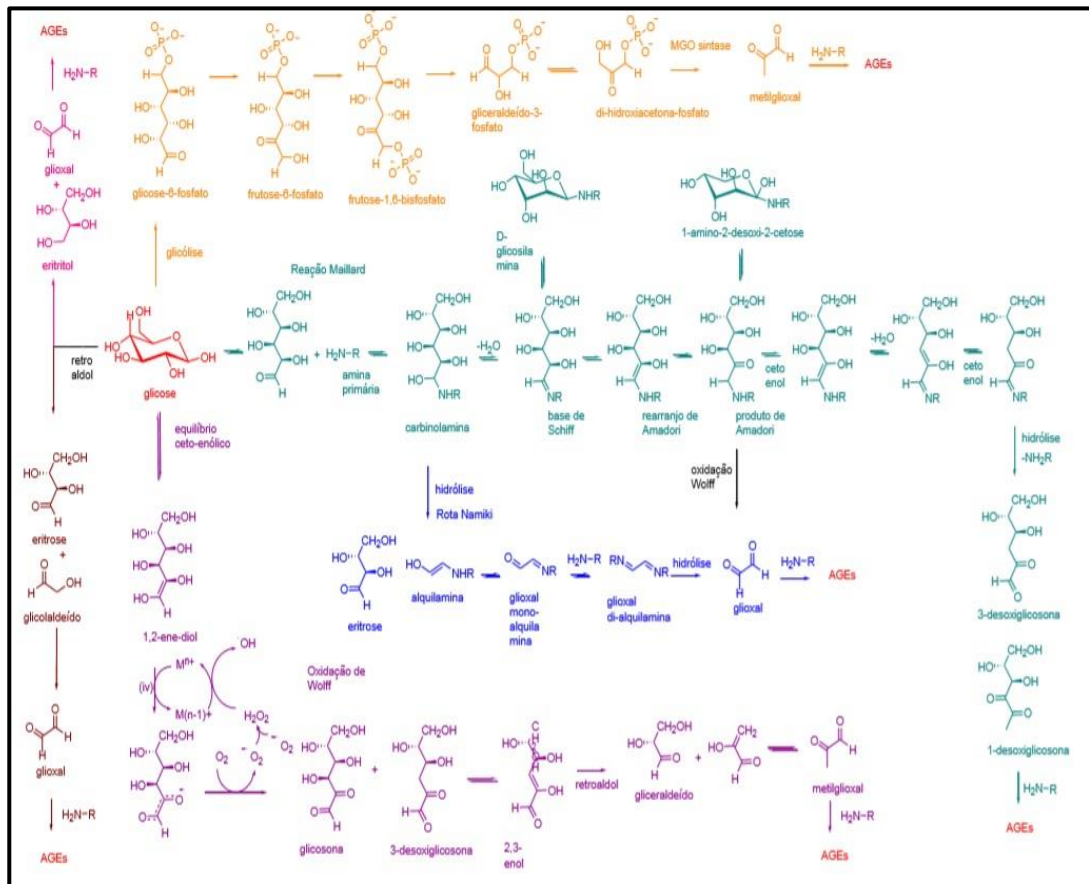
A formação dos AGE é principalmente endógena e ocorre em condições fisiológicas em todos os tecidos e fluidos corporais e são introduzidos no organismo de forma exógena, via dieta e/ou fumo. Os AGE afetam sobretudo moléculas de meia-vida longa, como o colágeno, e pode exercer uma importante função no processo natural do envelhecimento e contribui para o aparecimento ou agravamento de diversas doenças. A figura 9 exemplifica de forma mais detalhada todos os processos que levam a formação de AGE (TORRES et al., 2018).

Figura 9 - Os AGE caracterizados até o momento.



FONTE: (TORRES et al., 2018).

Figura 10 - Formação dos AGE a partir da glicose (imagem anexo na última página do trabalho).



A glicose (em vermelho) participando das reações de: glicólise (reação laranja); Maillard (rota azul-claro); oxidação de Wolff (rota em cor roxa); retroaldolização com formação de eritról e eritrose (rota cor rosa e marrom) e a rota de ou Namiki (azul escuro). FONTE: (TORRES et al., 2018).

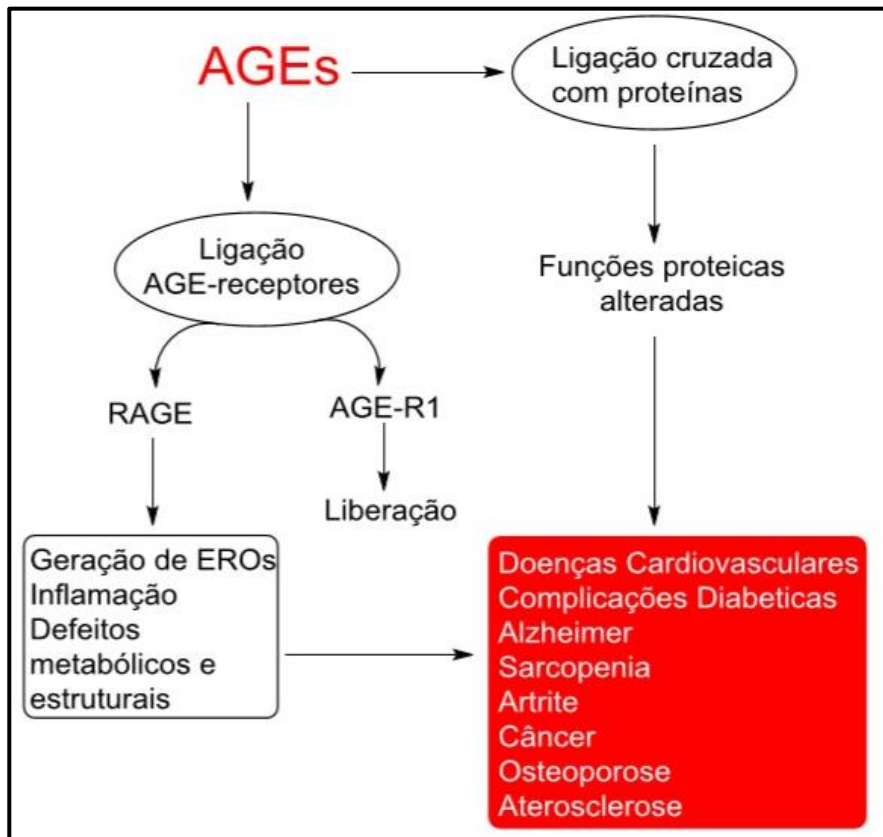
Os AGE atuam no desenvolvimento da ND, porque possuem a capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas, por conta da geração de radicais livres, formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares (TORRES et al., 2018).

A formação de ligação cruzada dos AGE com proteínas ocorre principalmente em moléculas de meia vida longa presentes na matriz extracelular (MEC), o que acarreta o aumento de sua espessura, e em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), mas também ocorre dentro da célula e altera as funções celulares, algumas das consequências dessas ligações podem ser vistas na figura 10 (TORRES et al., 2018).

Os AGE são as principais causas das complicações diabéticas, como a retinopatia diabética, a ND e a neuropatia diabética. A glicose em alta concentração é o principal motivo para a formação dos AGE e compostos dicarbonílicos principalmente em pacientes diabéticos. Assim, esses pacientes apresentam de duas a três vezes mais modificações nos resíduos de lisina e arginina que uma pessoa normal. Alguns estudos demonstram também que proteínas ricas em resíduos de cisteína reagem com compostos dicarbonílicos, devido à alta reatividade dos grupos tióis. A albumina é um bom exemplo, é a proteína mais abundante do plasma humano com grande quantidade de cisteína em sua estrutura, e por conta disso corresponde a 80% do total de proteínas glicadas na circulação sanguínea. A albumina glicada está relacionada à nefropatia diabética (TORRES et al., 2018).

A interação dos AGE (Figura 10) com o receptor RAGE (acrônimo em inglês para Receptor for Advanced Glycation End-products) é a mais estudada e caracterizada atualmente, tendo sido descoberta por Vlassara e colaboradores, em 1985. O receptor RAGE pertence à superfamília das imunoglobulinas (proteínas ligadas às membranas). Os AGE podem desencadear seus efeitos via ligação a receptores específicos (RAGE) em diferentes células, incluindo podócitos, células endoteliais e musculares lisas, bem como células epiteliais mesangiais e tubulares. A interação AGE-RAGE determina a ativação de vias de sinalização intracelular levando a diversas consequências, incluindo geração de espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS, do inglês Reactive Oxygen Species), liberação de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina (IL) -1 e 6, ativação de fatores de transcrição como NF-kB (desempenha papel importante na regulação da resposta imunitária a infecção) e expressão de moléculas de adesão e fatores de crescimento como fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) ou TGF- β . E cada uma dessas consequências leva ao estresse oxidativo, inflamação glomerular e ao aumento da matriz extracelular glomerular (TORRES et al., 2018) (LUIS-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Figura 11 - Complicações dos AGE.



Esquema demonstra as complicações das ligações cruzadas entre AGE e outras proteínas, além de mostrar as complicações da ligação AGE-RAGE. FONTE: (LUIS-RODRÍGUEZ et al., 2012).

4.6.2. Via dos Poliois

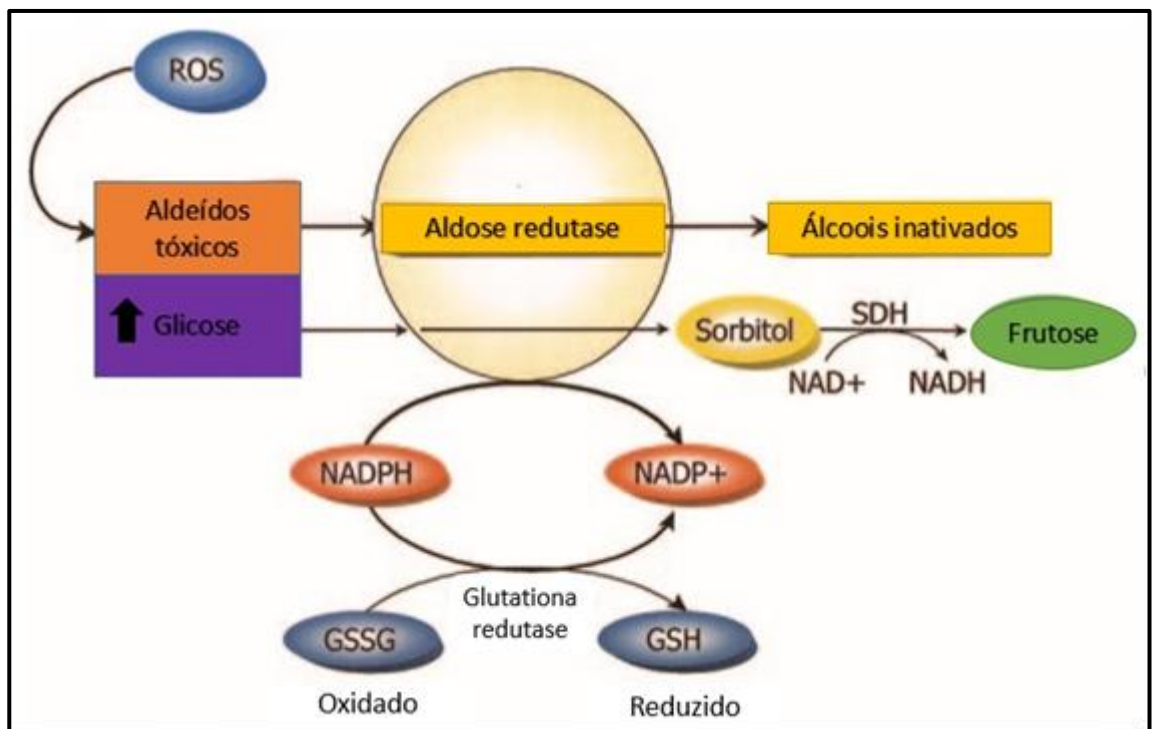
A via dos poliois, demonstrada na figura 11, normalmente tem a função de reduzir aldeídos tóxicos na célula para álcoois inativos. Em níveis de glicose intracelular aumentados, a via dos poliois torna-se mais ativa. A primeira enzima limitante da velocidade da via é a aldose redutase, que reduz a glicose a sorbitol (pode acumular-se intracelularmente, levando a danos osmóticos), usando NADPH como coenzima (Figura 11) (BROWLEE, 2005).

O sorbitol é então metabolizado em frutose, pela sorbitol desidrogenase, que utiliza NAD^+ como coenzima. A afinidade da aldose redutase pela glicose aumenta no estado hiperglicêmico, fazendo com que o sorbitol se acumule utilizando muito mais NADPH. O uso excessivo de NADPH pela aldose redutase superativada, resultar em menos coenzima disponível para outros processos do metabolismo celular; por

exemplo, a glutationa redutase, que é importante para a formação de glutationa reduzida, principal antioxidante endógeno. A capacidade das células em responder ao estresse oxidativo diminui (BROWNLEE, 2005); (LUIS-RODRÍGUEZ et al., 2012).

O excesso de frutose gerado pela conversão do sorbitol resulta em um aumento da razão NADH/NAD^+ , e provoca uma multiplicidade de alterações metabólicas e sinalizações conhecidas por alterar a função celular. Foi proposto que o excesso de NADH pode ser um substrato para a NADH oxidase, com a subsequente geração de espécies oxidantes intracelulares que danificam o DNA. A frutose em excesso pode ser fosforilada em frutose-3-fosfato e, posteriormente, convertida em 3-desoxiglucosona; ambos os compostos são agentes glicosilantes que participam na formação de AGE. Em outras palavras a principal contribuição para o desenvolvimento da ND é o estresse oxidativo (BROWNLEE, 2005); (LUIS-RODRÍGUEZ et al., 2012).

Figura 12 - Via dos Poliois alterada.



A figura demonstra a aldose redutase e sua coenzima NADPH convertendo glicose em sorbitol. As espécies reativas de oxigênio formam aldeídos tóxicos que são transformados em álcoois inativados. O NADPH é utilizado para a redução da glutatona oxidada (GSSG).
 FONTE: Adaptado de (BROWNLEE, 2005)

4.6.3. Via da PKC (Proteína Cinase C)

A PKC tem a função de adicionar e remover grupos fosfato, é um importante mecanismo na regulação de proteínas intracelulares, as quais podem ser enzimas, receptores ou segundo-mensageiros. Uma série de respostas celulares mediadas por receptores e vias metabólicas podem ser ativadas e desativadas por quinases ou fosfatases (enzimas que removem grupos fosfato) intra-celulares. As quinases e as fosfatases, são reguladas por sinais bioquímicos extrínsecos, tais como hormônios e fatores de crescimento. A PKC é uma das 3 principais quinases serinatreonina (SCHAAN, 2003); (BROWNLEE, 2005).

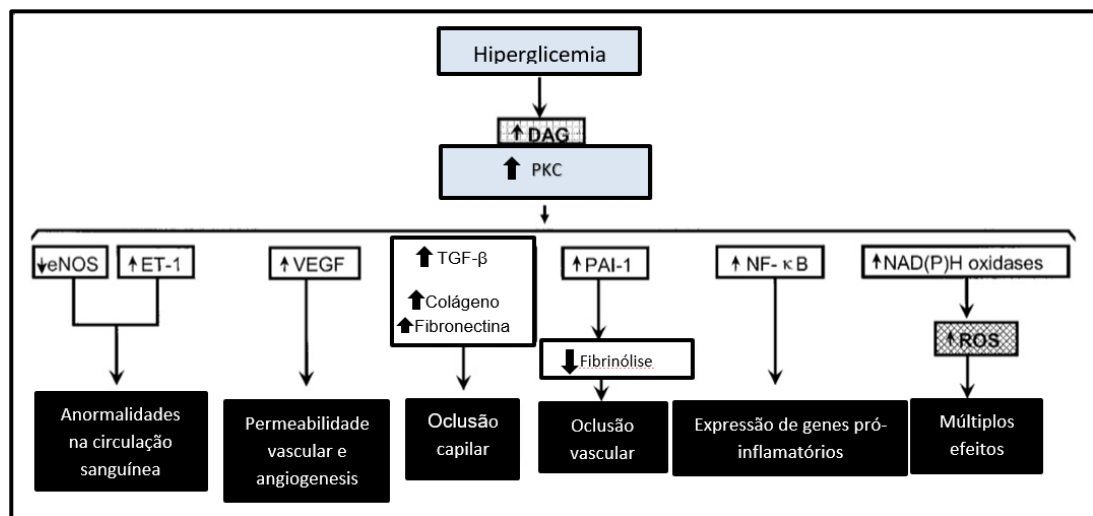
Ela está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. Sua ação é de catalisar a transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina tri-fosfato) à várias proteínas substrato. Da mesma forma, a PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorre em resposta a aumento transitório de diacilglicerol (DAG). A família PKC inclui 12 isoformas (α , β I, β II, δ , ϵ , γ , ι , η , λ , μ , θ , ζ), estas isoformas são distribuídas em vários tecidos, demonstrando diferenças de acordo com sua localização. Por exemplo, a PKC- β está presente nas ilhotas pancreáticas, monócitos, cérebro e tecidos vasculares (retina, rins e coração) (SCHAAN, 2003) (BROWNLEE, 2005).

A hiperglicemia aumenta a produção de DAG, por um mecanismo explicado posteriormente, promovendo uma maior ativação da PKC, que tem uma variedade de efeitos na expressão gênica, como mostrado na figura 12, como por exemplo, diminuição da atividade da NO sintase, responsável pela produção de óxido nítrico (NO), vasodilatador endotelial; aumento da endotelina-1, importante vasoconstritor, aumento de TGF- β e aumento do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (quando ativado, transforma-se em plasmina, que é uma enzima sanguínea com função de degradar proteínas plasmáticas, mais especificamente degradar fibrina) (SCHAAN, 2003).

A hiperglicemia provoca aumento de DAG, ativação de PKC e aumento de TGF- β nos glomérulos, promovendo um espessamento da membrana basal e a expansão da matriz extracelular, por provocar maior expressão de RNAm e síntese protéica de colágeno tipo IV e fibronectina. Além disso, temos a maior ativação do

fator nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) que é um fator de transcrição que, por sua vez, ativa vários genes pró inflamatórios, promovendo a inflamação da vascularização glomerular, justificando o aumento do fluxo sanguíneo e a hiperfiltração, observados nos primeiros estágios da ND. Resumindo as principais contribuições para o desenvolvimento da ND são: Estresse oxidativo; inflamação glomerular; espessamento da lamina basal e matriz mesangial (SCHAAN, 2003); (BROWNLEE, 2005).

Figura 13 - Principais efeitos da superativação da PKC por conta da hiperglicemia.



FONTE: Adaptado de Brownlee (2005)

4.6.4. Via das Hexoaminas

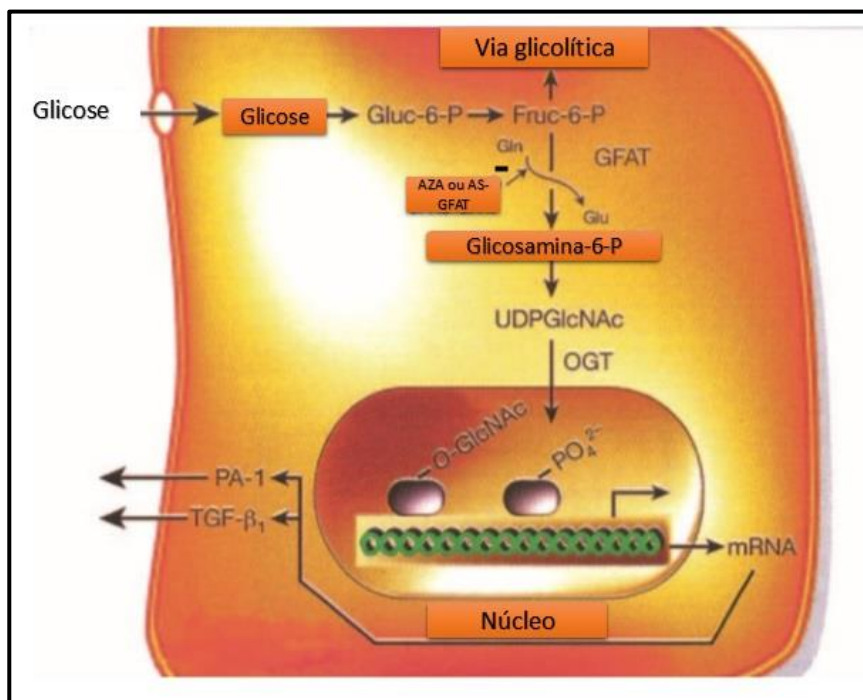
É uma via responsável pela formação de UDP-N-acetil-glicosamina ou UDP-GlcNAc ou NAG, que está amplamente envolvido na sinalização intracelular, como substrato para as transferases de N-acetilglicosamina ligadas em O (OGT), enzimas responsáveis em ligar o NAG em resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição em uma ampla gama de espécies (Figura 13). Também está envolvida na formação de poros nucleares e na sinalização nuclear. OGT desempenham um papel importante na estrutura do citoesqueleto. Em mamíferos, há um enriquecimento de transcritos de OGT nas células beta do pâncreas, e acredita-se que o UDP-GlcNAc faz parte do mecanismo de detecção de glicose (HANOVER, 2001); (GHOSH et al., 1959)

Sabe-se que grande parte da glicose que entra na célula seguirá para a glicólise, transformando-se inicialmente em glicose-6 fosfato, e depois em frutose-6-

fosfato e assim por diante. Quando a concentração de glicose está alta dentro de uma célula, algumas moléculas de frutose-6-fosfato são desviadas para uma via metabólica, na qual uma enzima chamada GFAT (glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase) converte a frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato e, finalmente, em UDP (uridina difosfato) N-acetil glicosamina (HANOVER, 2001); (GHOSH et al., 1959)

Em seguida a N-acetilglicosamina é adicionada a resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição. Assim como os processos de fosforilação, esta modificação, por adição de glicosamina, frequentemente resulta em alterações na expressão gênica. Podemos observar na Figura 13 que o fator de transcrição Sp1, após esta modificação, resulta em aumento da expressão de TGF- β 1 e do inibidor do ativador do plasminogênio-1, promovendo crescimento e proliferação celular, e dificuldade em degradar proteínas plasmáticas, podendo causar a oclusão vascular. A principal contribuição para o desenvolvimento da ND é o espessamento da matriz mesangial e lamina basal glomerular (BROWNLEE, 2005); (HANOVER, 2001)

Figura 14 - Desvio da glicose para a via das hexoaminas.



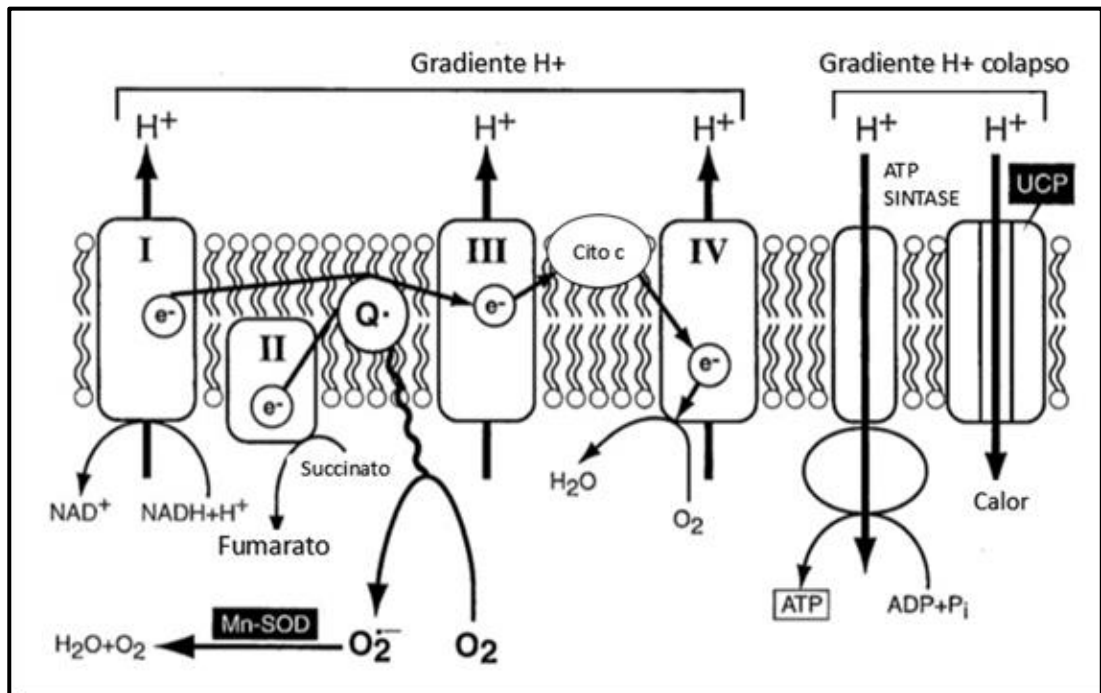
Desvio da glicose para a formação da UDPGlcNAc, que promove maior formação de RNAm e, conseqüentemente produção de PA-1 e TGF- β 1. FONTE: Adaptado de (BROWNLEE, 2005).

4.6.5. Unificação das vias

Antes de abordarmos a unificação das vias torna-se necessário entendermos a superativação das vias metabólicas pela hiperglicemia. A hiperglicemia promove o estresse oxidativo, gerando um aumento de ROS em relação às defesas antioxidantes. Na membrana interna da mitocôndria existem quatro complexos protéicos, complexo I, II, III e IV (Figura 14), responsáveis pelo transporte de elétrons pela membrana interna mitocôndria. Considerando a degradação total da glicose em aerobiose, ou seja, a glicólise aeróbia, é no ciclo de Krebs que obtemos o maior número de elétrons carreados pelo NADH, que fornecem elétrons ao complexo I, e FADH₂, formado pela succinato desidrogenase, e que doa elétrons ao complexo II. Os elétrons de ambos os complexos são transferidos à coenzima Q, que são transferidos para o complexo III, citocromo-C, complexo IV e, finalmente, para o oxigênio molecular, para produção de água.

À medida que os elétrons são transportados da esquerda para a direita, conforme figura 14, parte da energia desses elétrons é usada para bombear prótons, para o espaço entre as membranas interna e externa, através da membrana nos complexos I, III e IV. Ocorre a formação de um gradiente de prótons entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembrana. A energia deste gradiente impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase por fosforilação oxidativa. Alternativamente, as proteínas desacopladoras (UCP) figura 14, alteram este gradiente para gerar calor como uma forma de manter constante a taxa de geração de ATP (KORSHUNOV; SKULACHEV; STARKOV, 1997); (BROWNLEE, 2005).

Figura 15 - Cadeia respiratória.



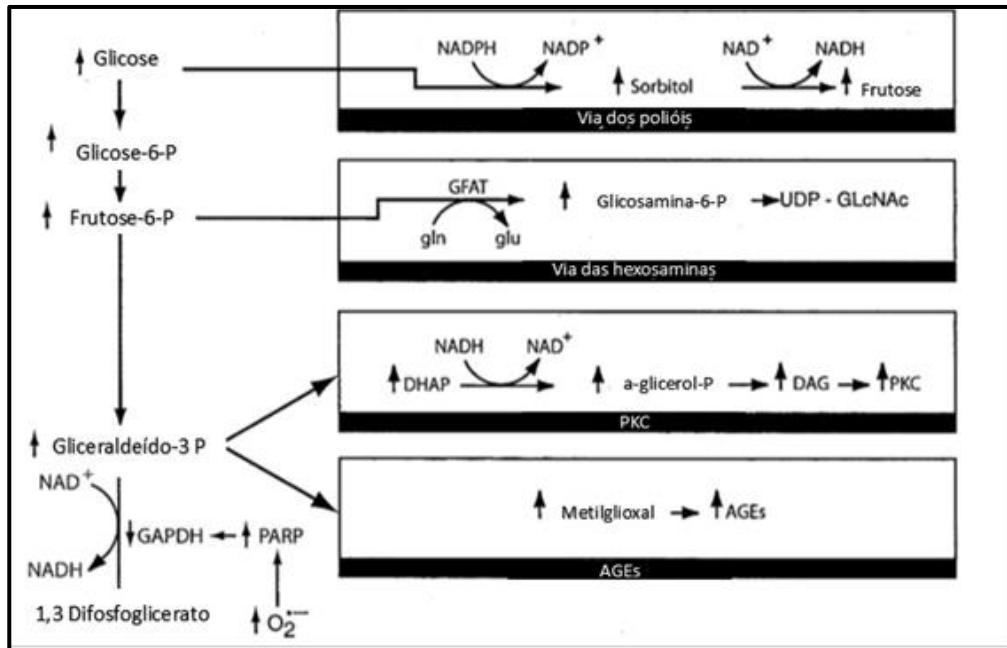
Cadeia respiratória, mostrando a transferência de elétrons entre os complexos, e o bombeamento dos prótons, gerando um gradiente de voltagem. Os prótons por gradiente passam pela ATP sintase formando energia. FONTE: Adaptado de Brownlee (2005).

Em células diabéticas, com alto teor de glicose em seu interior, há mais glicose sendo oxidada, formando mais doadores de elétrons (NADH e FADH_2) para a fosforilação oxidativa. Como resultado, o gradiente elétrico, através da membrana mitocondrial, aumenta até atingir um limiar máximo. Neste ponto, a transferência de elétrons dentro do complexo III é bloqueada, fazendo com que os elétrons retornem à coenzima, que doa elétrons um de cada vez para o oxigênio molecular, gerando assim o radical superóxido (Figura 14). A isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase degrada este radical em peróxido de hidrogênio, que é então convertido em H_2O e O_2 por outras enzimas, mas ainda não é o bastante para evitar o estresse oxidativo (WALLACE, 1992); (BROWNLEE, 2005).

A hiperglicemia leva a uma diminuição de atividade da enzima chave da via glicolítica a gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), isso leva ao aumento de todos os intermediários da via glicolítica até a etapa de formação do gliceraldeído-3 fosfato. O gliceraldeído ativa a via dos AGE, transformando o gliceraldeído em metilgloxal. Também ativa a via da PKC, transformando o gliceraldeído em DAG,

importante ativador da via do PKC. A via dos polióis é ativada pelo o aumento da glicose, e a via das hexoaminas é ativada pelo o aumento da frutose-6-fosfato. Na figura 15 temos o completo mecanismo unificado, de acordo com Brownlee (2005).

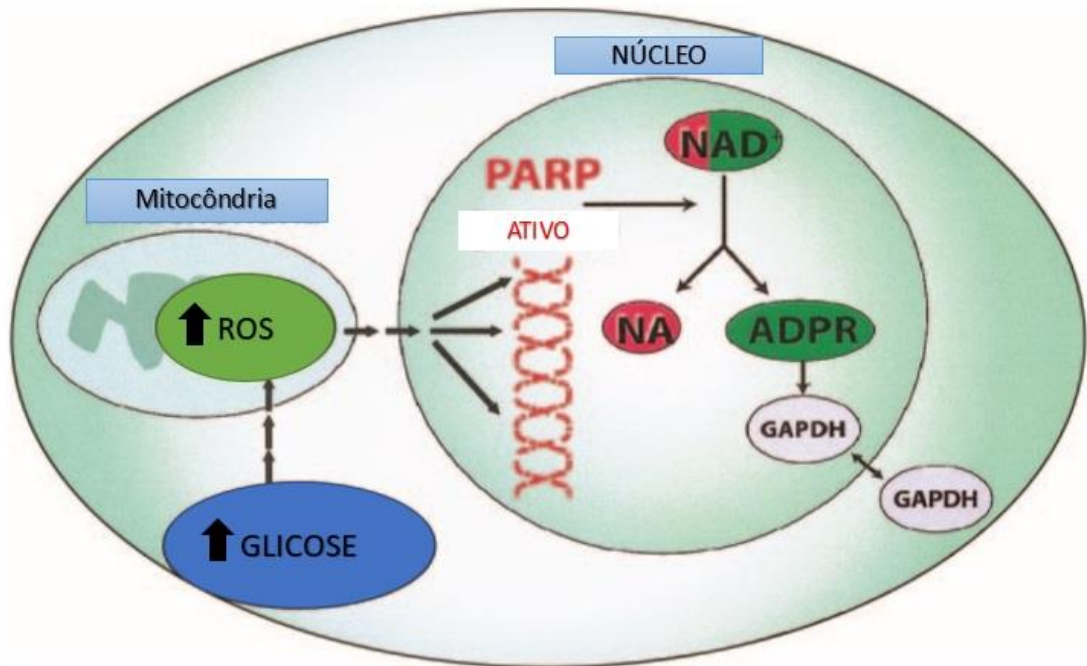
Figura 16 - Interação entre o aumento de glicose e as 4 vias metabólicas.



FONTE: Adaptado de Brownlee (2005).

A menor atividade da GAPDH no citosol pode ser compreendida uma vez que está enzima foi translocada para o núcleo. As ROS levam ao estresse oxidativo e ao dano do DNA. No núcleo a poli (ADP-Ribose) polimerase ou PARP, tem a função de restaurar os danos feitos ao DNA, clivando o NAD (dinucleótido de nicotinamida e adenina) em dois, ácido nicotínico e ADP-Ribose. O PARP continua a produzir polímeros de ADP-Ribose que se complexam com a GAPDH (Figura 16), que sofreu translocação do citosol para o núcleo, para formar estes complexos que ajudam no reparo ao DNA (DU et al, 2003); (BROWNLEE, 2005).

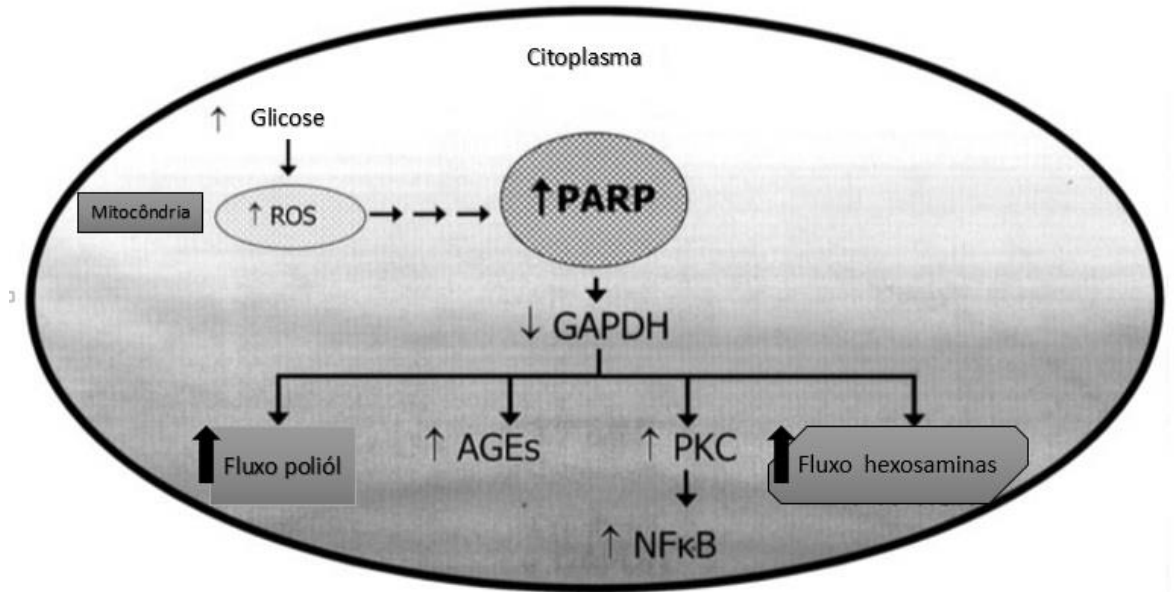
Figura 17 - Ativação da PARP pelo DNA, clivagem do NAD e junção do GAPDH.



FONTE: Adaptado de Brownlee (2005).

A translocação da GAPDH para o núcleo tem como consequência a diminuição da velocidade da via glicolítica, acarretando na ativação das vias metabólicas mencionada e envolvidas na ND. Estas vias, em última instância, promovem o acúmulo de matriz extracelular mesangial e espessamento da membrana basal glomerular, em outras palavras promovem a esclerose glomerular podendo levar a falência renal. A figura 17 abaixo resume esquematicamente todo o processo de ativação desde o dano ao glomérulo (BROWNLEE, 2005).

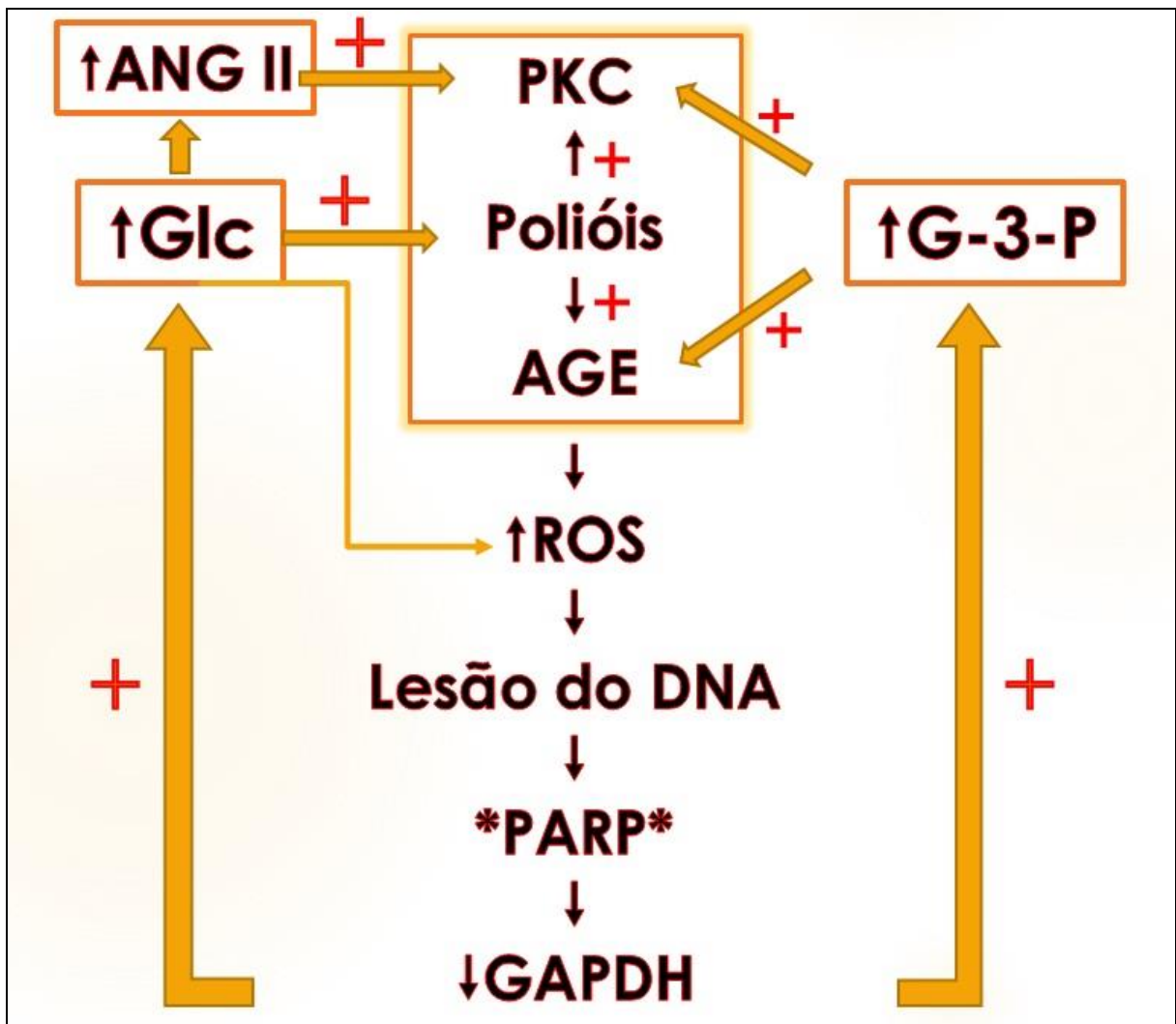
Figura 18 - Figura esquemática de todo o processo de superativação das vias.



FONTE: Adaptado de Brownlee (2005).

5 CONCLUSÃO

A ND é uma doença complexa, e estamos longe de entendê-la por completo, tornando possível um diagnóstico e tratamento mais eficazes da doença. Para isso ainda são necessários mais estudos para elucidar com mais clareza e complexidade as vias metabólicas envolvidas. Contudo, nos parece evidente, que o controle da glicemia é o ponto fundamental para minimizar as alterações fisiológicas observadas na ND. Além disso organizamos um esquema abaixo que mostra outras interligações das vias metabólicas mais a teoria de Brownlee, lembrando que essas pequenas interligações não foram feitas por ele.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, N. O. B. et al. Glicação não enzimática de proteínas na gênese da nefropatia diabética. **Rev Hcpa**, Rio Grande do Sul, v. 33, p.135-141, 2013.

ANDERSON, S.; JUNG, F. F.; INGELFINGER, J. R. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. **Am J Physiol**, v. 265, n. 4 Pt 2, p. F477-486, Oct 1993. ISSN 0002-9513.

BRIGHT, R. Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine. Londres: Guys Hosp Rep, 1836. 64 p

BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. **Banting Lecture**, Nova York, v. 54, p.1615-1625, 2005.

CORDINHÃ, C. **A criança com doença nefro-urológica**. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Nefrologia Pediátrica, 2017. 45 slides, color.

CHAVARRIA, A. **Histofisiología de riñón**. Mexico: Medicina Experimental, 2014. 25 slides, color.

DU, X. et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 112, n. 7, p.1049-1057, 1 out. 2003. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci18127>.

FARIA, J. B. L. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética. **J Bras Nefrol**, São Paulo, v. 23, p.121-129, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2011. 1173 p.

HANOVER, J. A. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. **The Fase J**, v. 15, n. 11, p.1865-1876, set. 2001. FASEB. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0094rev>.

HARVEY J .N.; ALLAGOA B. The long-term renal and retinal outcome of childhood-onset Type 1 diabetes. **Diabet Med**;21:26-31, 2003

HERMANN, K. et al. Measurement and characterization of angiotensin peptides in plasma. **Clin Chem**, v. 34, n. 6, p. 1046-1051, Jun 1988. ISSN 0009-9147.

IVERSEN B. M., KVAM F. I., MATRE M, MØRKRID L, HORVEI G, BAGCHUS W, GROND J, OFSTAD J: Effect of mesangiolytic on autoregulation of renal blood flow and glomerular filtration rate in rats. **Am J Physiol**, v.262, p. 351-366,1992.

KIMMELSTIEL P, Wilson C: Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. **Am J Pathol**; 12:83-90, 1936.

KOBORI, H. et al. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev**, v. 59, n. 3, p. 251-287, Sep 2007. ISSN 0031-6997.

KORSHUNOV, S. S.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **Febs Letters**, v. 416, n. 1, p.15-18, 13 out. 1997. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01159-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01159-9).

LEEHEY, D. J. et al. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. **Kidney Int**, Illinois, v. 58, p.93-98, 2000.

LUIS-RODRÍGUEZ, D. et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. **World J Diabet.** Santa Cruz de Tenerife, p. 7-18. jan. 2012.

MATSUSAKA, T. et al. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, n. 7, p. 1181-1189, Jul 2012. ISSN 1533-3450.

MATSUSAKA, T. et al. Podocyte injury enhances filtration of liver-derived angiotensinogen and renal angiotensin II generation. **Kidney Int.**, v. 85, n. 5, p. 1068-1077, May 2014. ISSN 1523-1755.

PINTO, F. M. et al. Contribuição da nefropatia diabética para a insuficiência renal crônica na Grande São Paulo. **J Bras Nefrol**, São Paulo, v. 19, p.256-263, 1997.

POHL, M. et al. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. **J Biol Chem**, v. 285, n. 53, p. 41935-41946, Dec 2010. ISSN 1083-351X.

ROHRWASSER, A. et al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. **Hypertension**, v. 34, n. 6, p. 1265-1274, Dec 1999. ISSN 1524-4563.

SALGADO, P. P. C. de A. et al. FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA DIABÉTICA. **Rev Med Minas Gerais**, Minas Gerais, v. 3, n. 14, p.180-181, 2004.

SALGADO, P. P. C. de A. PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À NEFROPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Ciências da Saúde**, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007

SAÚDE, M. et al. **CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA: DIABETES MELLITUS**. 16. ed. Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde, 2006. 56 p. (A).

SCHAAN, B. D. O Papel da Proteína Quinase C no Desenvolvimento das Complicações Vasculares do Diabetes Mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Porto Alegre, v. 47, n. 6, p.654-662, 2003.

SCHLONDORFF, D. Roles of the mesangium in glomerular function. **Int Soc Nephrol**. Munich, p. 1583-1585. out. 1996.

SCHLONDORFF, D. The Mesangial Cell Revisited: No Cell Is an Island. **J Am Soc Nephrol**, Nova York, v. 20, p.1179-1187, 2009.

SCHULZ, A. et al. Absolute quantification of endogenous angiotensin II levels in human plasma using ESI-LC-MS/MS. **Clin Proteomics**, v. 11, n. 1, p. 37, 2014. ISSN 1542-6416.

SESSO, R. C. et al. Relatório do censo brasileiro de diálise de 2010. **J Br Nefrol**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.442-447, dez. 2011. FapUNIFESP

SILVA, C. R et al. Revisão: Proliferação das células podocitárias – evidências pró e contra. **J Bras Nefrol**, São Paulo, v. 23, p.25-31, 2001.

SORIANO P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF /3-receptor mutant mice. **Genes Develop**, v. 8, p.1888-1896, 1994.

SVENSSON M, ERIKSSON JW, DAHLQUIST G. Early glyceemic control, age at onset, and development of microvascular complications in childhood-onset type 1 diabetes: a population-based study in northern Sweden. **Diabetes Care** 27(4):955-62, 2004;.

TORRES, N. M. P. de O. et al. A Química dos Produtos Finais de Glicação Avançada. **Rev Virt Quím**, Belo Horizonte, v. 10, n. 2, p.1-20, abr. 2018.

WALLACE DC. Diseases of the mitochondrial DNA (Review). **Annu Rev Biochem**, v. 61, p.1175-1212, 1992.

YOUNES-IBRAHIM, M. Células mesangiais: protagonistas ou coadjuvantes da função renal? **J Bras Nefrol**, Rio de Janeiro, v. 35, p.248-249, 2013.