

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RENAIIS,
HEMOSTÁTICOS E INFLAMATÓRIOS E
DO EFEITO DO TRATAMENTO COM
PEPTÍDEO C EM MODELO ANIMAL DE
DIABETES MELLITUS TIPO 1**

ORIENTADA: Michelle Teodoro Alves

ORIENTADORA: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

COORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

BELO HORIZONTE – MG

Dezembro / 2017

MICHELLE TEODORO ALVES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RENAIIS,
HEMOSTÁTICOS E INFLAMATÓRIOS E DO EFEITO DO
TRATAMENTO COM PEPTÍDEO C EM MODELO ANIMAL
DE DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Belo Horizonte – MG

Dezembro / 2017

043

Alves, Michelle Teodoro.

Avaliação de parâmetros renais, hemostáticos e inflamatórios e do efeito do tratamento com Peptídeo C em modelo animal de Diabetes mellitus tipo 1 [manuscrito] / Michelle Teodoro Alves. – 2017.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges. Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética - Teses. 2. Diabetes mellitus tipo 1. 3. Peptídeo C. 4. Inflamação - Teses. 5. Fator de von Willebrand. 6. Proteína ADAMTS13. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Fernandes, Ana Paula Salles Moura. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



"Avaliação de parâmetros renais, hemostáticos e inflamatórios e do efeito do tratamento com peptídeo C em modelo animal de diabetes mellitus tipo 1"

Michelle Teodoro Alves

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Karina Braga Gomes Borges - Orientadora
UFMG

Ana Paula Salles Moura Fernandes - Coorientador
UFMG

Adriana Abalen Martins Dias
UFMG

Fernanda Freire Campos Nunes
UniBH

Caroline Maria de Oliveira Volpe
IEP - Santa Casa

Maria das Graças Carvalho
UFMG

Doutoranda: Michelle Teodoro Alves

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Colaboradores: Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia

Profa. Dra. Caroline Pereira Domingueti

Prof. Dr. Stanley de Almeida Araújo

Linha de Pesquisa:

Bases Moleculares de Patologias Humanas

Área de Conhecimento:

Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia

Instituições participantes:

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Faculdade de Farmácia – UFMG

Faculdade de Medicina – UFMG

Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) – USP

Dedico este trabalho

A Deus pela saúde, equilíbrio e força.

À minha família pelo exemplo, ensinamentos e por ter me
incentivado a prosseguir nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Karina Braga Gomes Borges por ter me orientado na iniciação científica, no mestrado e agora no doutorado. Obrigada pela oportunidade, pelos conselhos e amizade. Sinto uma grande felicidade de ter compartilhado momentos importantes da minha vida pessoal e profissional com uma pessoa tão humilde, humana e verdadeira. Espero irmos a outros Congressos juntas!

À professora Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes por ter contribuído com a sua experiência no planejamento dos experimentos, o que foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Agradeço também por ter me recebido como aluna no laboratório desde a iniciação científica e pela oportunidade de ministrar aulas na disciplina de Biologia Molecular. Obrigada pela confiança!

Ao Programa de Pós-graduação em Genética por ter me acolhido como aluna. Agradeço aos professores que enriqueceram meus conhecimentos. Agradeço também aos meus colegas de curso pelo convívio.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFMG que tanto me ensinaram. Já são onze anos fundamentais para minha formação e crescimento. Agradeço em especial às professoras Lirlândia Pires e Ana Paula Lucas Mota.

Aos alunos e funcionários dos Laboratórios de Biologia Molecular, Hematologia e Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia pela convivência e amizade. Agradeço em especial às alunas que, mesmo sem nunca terem trabalhado com modelo animal, me ajudaram nos dias de experimentos. Obrigada por terem vencido o medo, sem vocês eu não teria conseguido. Agradeço em especial a Kathryn e a Vanêssa pela parceria durante esses anos, na vida e na coleta de dados.

Aos alunos de iniciação científica Guilherme, Mylena e Amanda pela colaboração na realização dos experimentos e por compartilhar tantos momentos e aprendizados.

Aos amigos do Hemominas que conquistei ao conciliar minha vida profissional como farmacêutica-bioquímica com a vida acadêmica. São com eles que compartilho tantos dias de aprendizado, o que tem contribuído para a construção de uma carreira profissional, mas também muitos momentos de descontração.

A CAPES, FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio e financiamento.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e puderam compreender os momentos que estive ausente. Obrigada por, além de oferecerem oportunidade para estudar, sempre estarem presentes.

À minha irmã e ao meu cunhado que sempre demonstraram reconhecimento pelo meu trabalho na Universidade e empenho, o que me incentivou a continuar. Espero poder retribuir em dobro para o meu sobrinho. Chega logo Theo!

Ao meu querido Erik, por estar ao meu lado durante toda esta jornada. Não sei como agradecer por ter me levado à UFMG nos fins de semana e feriado, por ter ido dormir mais tarde nas noites que eu estava escrevendo e pelos cafés e lanches que surgiam na minha mesa. Você apareceu para tornar tudo mais leve, engraçado e melhor. *May the force be with us!*

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE QUADRO	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Diabetes mellitus.....	6
2.2 Epidemiologia do diabetes mellitus	7
2.3 Classificação e diagnóstico do diabetes mellitus	7
2.4 Diabetes mellitus tipo 1	10
2.5 Complicações crônicas do diabetes.....	12
2.6 Inflamação no diabetes mellitus	14
2.7 Disfunção endotelial e estresse oxidativo no diabetes mellitus	16
2.8 Fator de von Willebrand (fvW).....	19
2.9 ADAMTS13 (<i>a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin ...</i>).....	21
2.10 Peptídeo C.....	26
2.10.1 Estrutura e função.....	26
2.10.2 Peptídeo C e as complicações do diabetes mellitus	28
2.11 Modelo animal de diabetes tipo 1	29
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Animais experimentais.....	37
5.2 Grupos experimentais.....	37
5.3 Delineamento do protocolo experimental	38

5.4 Parâmetros ponderais e metabólicos.....	39
5.5 Determinação dos níveis de glicose.....	40
5.6 Obtenção das amostras e procedimento de eutanásia	40
5.7 Determinação dos níveis de fvW e de ADAMTS13	41
5.8 Avaliação da função renal.....	41
5.9 Avaliação da expressão gênica da ADAMTS13 e eNOS.....	42
5.10 Análise histológica do rim por microscopia ótica e eletrônica	43
5.11 Avaliação dos níveis de citocinas.....	45
5.12 Avaliação da expressão gênica do FVW, SOD e citocinas.....	45
5.13 Análise estatística	46
6 RESULTADOS	47
6.1 <i>Aspectos metabólicos, renais e hemostáticos no modelo animal de diabetes (...)</i>	47
6.1.1 Caracterização do modelo experimental de DM1	47
6.1.1.1 Caracterização bioquímica.....	48
6.1.1.2 Avaliação da função renal	49
6.1.2 Níveis de fvW e ADAMTS13 nos grupos controle e diabético	50
6.1.3 Avaliação da expressão renal e hepática da ADAMTS13 e endotelial (...)	53
6.2 <i>O efeito do peptídeo C nos parâmetros metabólicos, renais, hemostáticos (...)</i>	55
6.2.1 Efeito do peptídeo C sobre a glicemia, o peso e a função renal.....	55
6.2.2 Caracterização histológica do rim	59
6.2.3 Efeito do peptídeo C sobre os níveis de fvW e ADAMTS13	61
6.2.4 Expressão gênica do FVW, da ADAMTS13 e da eNOS	62
6.2.5 Efeito do peptídeo C na inflamação e no estresse oxidativo	64
7 DISCUSSÃO.....	72
7.1 <i>Aspectos metabólicos, renais e hemostáticos no modelo animal de diabetes</i>	72
7.2 <i>O efeito do peptídeo C nos parâmetros metabólicos, renais, hemostáticos (...)</i>	78
8 CONCLUSÕES.....	91
9 PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS.....	114

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	114
ANEXO B – Artigo publicado com resultados do doutorado.....	115
ANEXO C – Resultados parciais do doutorado apresentados em eventos (...)	118
ANEXO D – Outros artigos publicados durante o período de doutorado	123
ANEXO E – Orientações de trabalhos	126
ANEXO F – Participação em bancas	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático do papel da hiperglicemia na lesão vascular.....	18
Figura 2 – Estrutura e domínios funcionais do fator de von Willebrand	20
Figura 3 – Estrutura e domínios da ADAMTS13.....	22
Figura 4 – Patogênese da púrpura trombocitopênica trombótica causada (...)	24
Figura 5 – Ilustração esquemática do peptídeo C e o seu papel na biossíntese (...) ..	26
Figura 6 – Estrutura molecular da estreptozotocina	30
Figura 7 – Mecanismo de ação da estreptozotocina	31
Figura 8 – Fluxograma da indução do diabetes e tratamento com peptídeo C	35
Figura 9 – Fluxograma das análises laboratoriais realizadas no estudo	36
Figura 10 – Análises estatísticas realizadas no estudo	36
Figura 11 – Distribuição nos grupos experimentais na parte 1 (esquerda) e (...).....	38
Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental do estudo	39
Figura 13 – Quantificação relativa da ADAMTS13 no rim e no fígado dos grupos (...)53	
Figura 14 – Quantificação relativa do fvW na aorta abdominal dos grupos (...).....	54
Figura 15 – Fotomicrografia em microscopia ótica (A) e eletrônica (B) (...)	60
Figura 16 – Avaliação da expressão gênica do fator de von Willebrand (FvW) (...) ...	62
Figura 17 – Avaliação da expressão gênica renal e hepática da ADAMTS13 (...)	63
Figura 18 – Avaliação da expressão gênica no rim e na aorta abdominal da eNOS ..	64
Figura 19 – Avaliação da expressão gênica renal de citocinas nos grupos (...)	67
Figura 20 – Avaliação da expressão gênica na aorta abdominal da superóxido (...) .	68
Figura 21 – Resumo dos resultados.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da função renal por meio da creatinúria (...).	47
Tabela 2 – Medidas descritivas para os grupos controle e diabético (...).	48
Tabela 3 – Comparação dos parâmetros para avaliação da função (...).	50
Tabela 4 – Avaliação dos níveis urinários de ADAMTS13 (ng/18 horas) (...).	51
Tabela 5 – Medidas descritivas para ADAMTS13 plasmática e urinária (...).	51
Tabela 6 – Variáveis correlacionadas com os níveis de ADAMTS13 na (...).	52
Tabela 7 – Avaliação da glicemia (mg/dL) dos grupos testados em três (...).	55
Tabela 8 – Avaliação do peso (g) dos grupos testados em três momentos (...).	57
Tabela 9 – Avaliação da função renal por meio da microalbuminúria (...).	58
Tabela 10 – Parâmetros avaliados para os grupos controle tratado (...).	59
Tabela 11 – Avaliação dos níveis plasmáticos de fvW e dos níveis (...).	61
Tabela 12 – Avaliação dos níveis de citocinas dos grupos controle (...).	65
Tabela 13 – Análises de correlações.....	70

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Classificação etiológica do diabetes mellitus.....	8
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADA – *American Diabetes Association* (Associação Americana de Diabetes)
- ADAMTS13 – *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13*
- AGEs – *Advanced glycation end products* (produtos finais de glicação avançada)
- AMPK – *AMP-activated protein kinase* (proteína quinase ativada pela AMP)
- ATP – *Adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)
- BB – *Bio-breeding*
- BCL-2 – B cell CLL/lymphoma 2
- CBA – *Cytometric Bead Array*
- CCL2 – *C-C motif chemokine ligand 2* (quimiocina ligante 2 motivo C-C)
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cis – Cisteína
- CT – *Cycle threshold*
- CT – Controle tratado
- CUB – Complemento C1r/C1s, fator de crescimento epidérmico *sea urchin*, Bone morphonetic protein 1)
- DCC – *Diabetes Complications Consortium* (Consórcio de Complicações Diabéticas)
- DCCT – Diabetes Control and Complications Trial
- DEC – Depuração estimada de creatinina
- DM – Diabetes Mellitus
- DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
- Des – Desintegrina
- DN – Diabético não-tratado
- DRC – Doença renal crônica
- DT – Diabético tratado
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

eNOS – *Endothelial nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase endotelial)

Esp – Domínio espaço

FVIII – Fator VIII

fvW – Fator de von Willebrand

FVW – Gene do fator de von Willebrand

g – Força g

g – Grama

GAD65 – *Glutamic acid decarboxylase* (Descarboxilase do ácido glutâmico)

GLUT – *Glucose transporter* (Transportador de glicose)

GMPc – *Cyclic guanosine monophosphate* (Monofosfato cíclico de guanosina)

GP Ib – Glicoproteína plaquetária Ib

GP IIb/IIIa – Glicoproteína plaquetária IIb/IIIa

HbA1c – Hemoglobina glicada

HE – Hematoxilina eosina

HLA – *Human leukocyte antigens* (Antígeno leucocitário humano)

HSCs – *Hepatic stellate cells* (Células estreladas hepáticas)

HUVEC – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (Células endoteliais primárias de veias umbilicais humanas)

IA-2 – Tirosina fosfatase-2

ICAM1 – *Intercellular adhesion molecule 1* (Molécula de adesão intercelular 1)

IDF – *International Diabetes Federation* (Federação Internacional de Diabetes)

IFN γ – Interferon gama

IL – *Interleukin* (Interleucina)

IL1B – *Interleukin 1 beta* (Interleucina 1 beta)

Kb – Kilobases

KDa – Kilodaltons

KDIGO – *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

Kg – Kilograma

LSD – *Least Significant Difference*

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína quinase ativada por mitógeno)

mg – Miligrama

µg – Micrograma

Mif – *Macrophage migration inhibitory factor* (Fator de inibição da migração de macrófagos)

MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

MIT – Mitocôndria

mL – Mililitros

MODY - *Maturity-Onset Diabetes of the Young*

mRNA – RNA mensageiro

MT – Metaloproteinase

NaCl – Cloreto de sódio

NAD⁺ – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NFκB1 – *Nuclear factor kappa B subunit 1* (Fator nuclear kapa B subunidade 1)

NGSP – *National Glycohemoglobin Standardization Program*

NO – *Nitric oxide* (Óxido nítrico)

NOD – *Non-obese diabetic*

NOS3 – *Nitric oxide sintase 3* (Óxido nítrico sintase endotelial 3)

P – Pró-peptídeo

PAI1 – *Plasminogen activator inhibitor, type 1* (Inibidor do ativador do plasminogênio, tipo 1)

PAS – *Periodic acid-Schiff* (Ácido periódico de Schiff)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCR – Proteína C reativa

PI 3-quinase – *Phosphatidylinositol 3-kinase* (Fosfatidilinositol 3-quinase)

PKC – *Protein kinase C* (Proteína quinase C)

PTT – Púrpura trombocitopênica trombótica

RAGE – Receptor advanced glycation end-products (Receptor de produtos finais de glicação avançada)

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

RPM – Rotações por minuto

S – Peptídeo sinal

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

STZ – Estreptozotocina

SD – *Standard deviation* (Desvio padrão)

SOD – *Superoxide dismutase* (Superóxido dismutase)

SPSS – *Statistical package of the social sciences software*

TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances* (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TGF β – *Transforming growth factor beta* (Fator de crescimento transformante beta)

TFG – Taxa de filtração glomerular

Th – T helper

TNF α – *Tumor necrosis factor alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)

TOTG – Teste Oral de Tolerância a Glicose

TSP1 – Trombospondina tipo 1

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM1 – *Vascular cell adhesion molecule 1* (Molécula de adesão celular vascular 1)

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

XOD – Xantina oxidase

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

Em pacientes diabéticos, níveis plasmáticos elevados do fator de von Willebrand (fvW) e reduzidos da ADAMTS13 e do peptídeo C têm sido associados às complicações da doença. O presente estudo tem como objetivo investigar alterações renais, hemostáticas e inflamatórias em modelo animal de diabetes tipo 1 (DM1) induzido pela estreptozotocina e avaliar o papel do peptídeo C sobre estas alterações na doença renal do diabetes. A alteração renal nos camundongos diabéticos foi caracterizada por hiperfiltração glomerular, com aumento da excreção urinária de albumina e creatinina, o que é comumente observado na fase inicial da nefropatia diabética. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de ADAMTS13 e fvW no plasma, entretanto, os níveis de ADAMTS13 urinários foram significativamente maiores no grupo diabético quando comparado ao controle. Além disso, houve aumento da expressão hepática de ADAMTS13 no grupo diabético. Ainda, os níveis urinários da ADAMTS13 correlacionaram com os níveis de glicose, a microalbuminúria, a creatinúria e citocinas inflamatórias mostrando que a perda urinária da protease é proporcional à glicemia e à disfunção e inflamação renal. O tratamento com peptídeo C não reduziu a glicemia e a excreção renal de albumina, creatinina e ADAMTS13. No entanto, o peptídeo C parece diminuir o processo inflamatório no rim, uma vez que houve redução significativa da perda de IL17 e IL10 no grupo diabético tratado quando comparado ao grupo diabético não tratado com peptídeo C, além de aumento na expressão gênica renal de IL10 e ADAMTS13. Concluímos que no modelo animal de DM1 com doença renal inicial não há alteração nos níveis de fvW e ADAMTS13 no plasma, apesar da maior perda urinária de ADAMTS13, sugerindo que o aumento da expressão gênica hepática é fator importante na manutenção dos níveis plasmáticos desta protease. Além disso, a perda de ADAMTS13 na urina acompanha a doença renal e complicações metabólicas e inflamatórias do diabetes, sendo que o peptídeo C pode ter um efeito anti-inflamatório no rim do animal diabético.

Palavras-chave: fator de von Willebrand, ADAMTS13, peptídeo C, diabetes tipo 1, inflamação.

ABSTRACT

In diabetic patients, high plasma levels of von Willebrand factor (vWF), and reduced ADAMTS13 and C peptide have been associated to diabetes mellitus complications. The present study aims to investigate renal, hemostatic and inflammatory alterations in animal model of type 1 diabetes (T1DM) induced by streptozotocin and to evaluate the role of C peptide on these alterations in diabetic renal disease. Kidney alteration in diabetic mice was characterized by glomerular hyperfiltration, with increased urinary albumin excretion rate and creatinine, which is commonly observed in the initial phase of diabetic nephropathy. There was no significant difference between the levels of ADAMTS13 and vWF in plasma, however, ADAMTS13 urinary levels were significantly higher in the diabetic group compared to the control. Moreover, there was an increase in hepatic ADAMTS13 gene expression in diabetic group. Furthermore, urinary levels of ADAMTS13 correlated with glucose levels, creatinine and urinary albumin excretion, as well as inflammatory cytokines showing that the loss of protease is proportional to glycemia, renal dysfunction and inflammation. Treatment with C peptide is not able to reduce glycemia and renal excretion of albumin, creatinine and ADAMTS13. On the other hand, C peptide seems to reduce the renal inflammatory process, since it is observed a significantly reduction in IL17 and IL10 loss in the treated diabetic group when compared to the diabetic group not treated with C peptide. Moreover, there were increase in renal IL10 and ADAMTS13 gene expression. We conclude that in the animal model of T1DM there is no change in plasma levels of vWF and ADAMTS13, despite the increased urinary loss of ADAMTS13, suggesting that increased liver gene expression is an important factor in maintaining plasma levels of this protease. In addition, the loss of ADAMTS13 in the urine follows the evolution of renal disease, as well as metabolic and inflammatory complications of diabetes. Furthermore C-peptide may have an anti-inflammatory effect in diabetic kidney.

Keywords: von Willebrand factor, ADAMTS13, C peptide, type 1 diabetes, inflammation.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) consiste em um distúrbio metabólico decorrente da destruição progressiva das células β das ilhotas pancreáticas, levando à ausência progressiva e completa de insulina. Caracteriza-se pela presença de hiperglicemia, mas também por danos, disfunção e falência de vários órgãos (IDF, 2017; WHO, 2016).

Sabe-se que a hiperglicemia é a principal causa de disfunção endotelial no diabetes. O endotélio tem o papel fundamental de manter a homeostase da vasculatura por meio, principalmente, da produção de óxido nítrico (NO), o qual é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase endotelial 3 (NOS3), também conhecida como eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*). No paciente hiperglicêmico, o aumento do estresse oxidativo pode levar ao desacoplamento da eNOS, diminuição da sua atividade e, conseqüentemente, menor produção de NO, o que pode culminar com uma disfunção do endotélio com aumento da pressão arterial e maior probabilidade de formação de trombos (Hadi e Suwaidi, 2007; Forst *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm evidenciado aumento nos níveis do fator de von Willebrand (fvW) e atividade reduzida da enzima ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs, member 13*) em pacientes diabéticos, o que está associado ao aumento da hipercoagulabilidade e, conseqüentemente, ao risco de desenvolvimento de aterosclerose e tromboembolismo (Lip e Blann, 1997; Rurali *et al.*, 2013). O fvW é uma glicoproteína sintetizada nos megacariócitos e células endoteliais, envolvida na adesão de plaquetas ao subendotélio vascular e na formação de trombos. O fvW pode ser um marcador de lesão e disfunção endotelial, uma vez que seus níveis plasmáticos aumentam quando as células endoteliais são lesadas (Stehouwer *et al.*, 1995).

A concentração plasmática do fvW é influenciada pela ADAMTS13, uma enzima proteolítica responsável pela degradação dos grandes multímeros do fvW. Esta enzima é sintetizada principalmente pelo fígado, mas também é expressa nas plaquetas, nas células endoteliais e nos rins (Bowen e Collins, 2006). Nos pacientes com diabetes e alteração da função renal, os mecanismos envolvidos na alteração dos níveis plasmáticos da ADAMTS13 ainda não estão bem estabelecidos. No

entanto, estudos têm demonstrado a perda da ADAMTS13 na urina; degradação da ADAMTS13 por proteases plasmáticas; e síntese hepática e/ou renal reduzidas da ADAMTS13 (Manea *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2008).

Também existem evidências de que a resposta inflamatória e o estresse oxidativo, desencadeados pela hiperglicemia, são fatores importantes no desenvolvimento e progressão das complicações microvasculares em pacientes com DM1. Citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 beta (IL1 β) e interleucina 6 (IL6), assim como as espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*), desempenham papel crucial no processo fisiopatológico destas complicações (Luppi *et al.*, 2013; Uwaezuoke, 2017).

Acompanhando a diminuição da produção da insulina, o DM1 também é caracterizado por baixos níveis plasmáticos de peptídeo C. Até recentemente, acreditava-se que o peptídeo C era responsável apenas por facilitar o dobramento correto da molécula de pró-insulina e permitir a formação de pontes dissulfeto entre as cadeias. No entanto, novas evidências sugerem que este peptídeo possa ter algum papel biológico, como na prevenção de algumas complicações do diabetes (Hills *et al.*, 2010; Wahren e Larsson, 2015). Um estudo clínico realizado pela DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) revelou que a persistência de pequena secreção de peptídeo C em pacientes com DM1 está associada a melhor controle glicêmico quando comparado aos pacientes diabéticos que não possuem mais a secreção do peptídeo. Além disso, a secreção residual deste peptídeo também foi associada a um menor risco para complicações microvasculares (Lachin *et al.*, 2014).

O tratamento com peptídeo C em camundongos e ratos diabéticos demonstrou efeitos benéficos na nefropatia e neuropatia, além de atividade antitrombótica (Lindenblatt *et al.*, 2006; Samnegard *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2003). A administração deste peptídeo em animais ainda foi associada ao aumento do fluxo sanguíneo microvascular, melhora da função endotelial, aumento na expressão do gene da eNOS e da produção de NO (Scalia *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2003).

Considerando que o diabetes está associado ao aumento no risco de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas e que os mecanismos fisiopatológicos

responsáveis pelas alterações dos níveis plasmáticos do fvW e da ADAMTS13 ainda não foram completamente elucidados, o estudo destes marcadores pode ajudar a compreender melhor a relação entre o diabetes e as complicações vasculares. Além disso, o peptídeo C vem se mostrando um agente que retarda o desenvolvimento das micro e macroangiopatias, podendo estar associado a alterações da expressão gênica e/ou níveis dos marcadores de hipercoagulabilidade, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Dessa forma, o presente estudo objetiva o conhecimento dos mecanismos envolvidos neste processo e do potencial benefício do tratamento com este peptídeo, o que poderá no futuro contribuir com a redução do risco de complicações crônicas no DM1.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de origem múltipla, decorrente de defeito da secreção de insulina e/ou da sua ação, levando ao aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) (IDF, 2017). O estado hiperglicêmico pode causar, a longo prazo, danos, disfunção e falência de vários tecidos e órgãos, especialmente rins, retina, nervos, coração e vasos sanguíneos (WHO, 2016).

A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva. Nos casos mais severos, podem ocorrer complicações agudas como a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica. A longo prazo, o DM está associado à retinopatia com o risco de cegueira, nefropatia que pode levar à falência renal e neuropatia, com risco de formação de úlceras nos pés, amputações, osteoartropatia (pé de Charcot) e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual (WHO, 1999).

Dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia mostram que a hipertensão e o diabetes mellitus consistem nos dois principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença renal crônica (DRC) (Sesso *et al.*, 2016). Além disso, o risco de desenvolvimento de nefropatia é de cerca de 30% nos diabéticos tipo 1 e de 20% nos diabéticos tipo 2 (Romão Junior, 2004).

O DM e as outras alterações na regulação glicêmica (tolerância à glicose diminuída e glicemia de jejum alterada) são frequentes na população adulta e estão associados ao desenvolvimento de doença cardiovascular e complicações microvasculares. O diagnóstico precoce dessas situações, por meio de investigação clínica e laboratorial, é importante para promover mudanças no estilo de vida e melhor controle glicêmico os quais podem prevenir, ou pelo menos retardar, o aparecimento do diabetes ou a ocorrência de complicações (Gross *et al.*, 2002).

2.2 Epidemiologia do diabetes mellitus

O DM apresenta incidência crescente em todos os países. De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*), no presente ano existem 425 milhões (8,8%) de pessoas no mundo com DM e a estimativa é que a doença deverá atingir 629 milhões (9,9%) em 2045. Há cerca de 221 milhões de homens acometidos pelo DM *versus* 204 milhões de mulheres, sendo que as pessoas mais afetadas estão em grupos etários entre 65 e 79 anos (IDF, 2017).

Em 2012, 1,5 milhões de mortes foram diretamente causadas pelo DM. Estima-se que o DM foi a oitava principal causa de morte em 2012 entre ambos os sexos e a décima quinta principal causa de morte entre as mulheres (WHO, 2016).

Estimativas da IDF indicam que há no Brasil 12,5 milhões de portadores de DM com idade entre 20 a 79 anos, o que coloca o nosso país em primeiro lugar em número de pessoas com a doença na América do Sul e Central. Os dados indicam ainda que 0,76 milhões de brasileiros desconhecem essa condição. O DM foi a causa de morte de mais de 108 mil brasileiros com idade entre 20 a 79 anos em 2017 (IDF, 2017).

2.3 Classificação e diagnóstico do diabetes mellitus

A classificação atual do DM, proposta pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association, ADA*) (ADA, 2017) inclui quatro classes clínicas: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes mellitus gestacional e outros tipos específicos de diabetes mellitus (Quadro 1). Ainda há duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (SBD, 2017).

Quadro 1 – Classificação etiológica do diabetes mellitus

<p>1. Diabetes tipo 1</p> <p>Destruição das células β, usualmente levando à deficiência completa de insulina</p> <p>A. Autoimune</p> <p>B. Idiopática</p>
<p>2. Diabetes tipo 2</p> <p>Resistência à insulina frequentemente combinada com perda progressiva da secreção de insulina</p>
<p>3. Diabetes gestacional</p> <p>Diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, na ausência de critérios de DM prévio</p>
<p>4. Outros tipos específicos</p> <p>A. Monogênicos (MODY)</p> <p>B. Diabetes neonatal</p> <p>C. Secundário a doenças do pâncreas exócrino</p> <p>D. Secundário a endocrinopatias</p> <p>E. Secundário a drogas ou produtos químicos</p> <p>F. Secundário a infecções</p>

DM: diabetes mellitus; MODY: *Maturity-Onset Diabetes of the Young*

Fonte: adaptado de *American Diabetes Association*, 2017

O DM1 (anteriormente conhecido como insulino-dependente ou diabetes juvenil), responsável por 5 a 10% dos casos de pessoas diabéticas, é resultante da destruição autoimune das células β do pâncreas. Embora a taxa de destruição seja muito variável, sendo rápida em alguns indivíduos e lenta em outros, o último estágio da doença é caracterizado por pouca ou nenhuma secreção de insulina e de peptídeo C (ADA, 2017; Insel *et al.*, 2015).

O DM2 representa 90-95% dos casos da doença e anteriormente era denominado diabetes insulino-independente ou diabetes do adulto. É causado por combinação de resistência à ação da insulina e resposta compensatória inadequada de sua secreção. Já o diabetes gestacional é definido como qualquer nível de intolerância aos carboidratos, resultando em hiperglicemia de gravidade variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Similar ao DM2, o DM gestacional associa-se tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β e ocorre em aproximadamente 1 a 14% das gestações, dependendo da população estudada e dos métodos de diagnóstico empregados. Por fim, os outros tipos específicos de diabetes menos frequentes podem resultar de defeitos genéticos na função das células β ou da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzido por medicamentos ou agentes químicos, infecções e outras síndromes genéticas associadas ao diabetes (ADA, 2017; Skyler *et al.*, 2017).

Atualmente, os critérios de diagnóstico do DM propostos pela ADA são baseados nos seguintes valores: (1) valor de glicemia plasmática após oito horas de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (em casos de pequena elevação de glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado repetindo o teste em outro dia); (2) valor de glicemia plasmática após 2 horas da ingestão de 75 g de glicose anidra dissolvida em água igual ou superior a 200 mg/dL (Teste Oral de Tolerância a Glicose - TOTG) (3) valor de hemoglobina glicada (HbA1c) igual ou superior a 6,5% (o teste deve ser realizado em um laboratório utilizando método certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e padronizado no DCCT; ou (4) em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, valor de glicemia plasmática aleatória igual ou superior a 200 mg/dL (ADA, 2017).

2.4 Diabetes mellitus tipo 1

O DM1 é caracterizado por uma deficiência de insulina, devido à destruição das células β do pâncreas, e um quadro permanente de hiperglicemia, havendo a necessidade de reposição insulínica exógena (Chiang *et al.*, 2014). Nessa forma de diabetes, a taxa de destruição das células β é bastante variável, sendo, geralmente, rápida em lactentes e crianças e lenta em adultos. Alguns pacientes, especialmente crianças e adolescentes, podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Outros apresentam modesta hiperglicemia de jejum que pode evoluir rapidamente para uma glicemia severa e/ou cetoacidose na presença de infecção ou outra forma de estresse (Insel *et al.*, 2015; TEDDY Study Group, 2008).

Há ainda indivíduos, principalmente adultos, que podem preservar uma função residual das células β , medida pelos níveis de peptídeo C, o que está associado a um melhor controle glicêmico e redução do risco de complicações microvasculares. Níveis mais elevados de peptídeo C estão associados a menores níveis de HbA1c, menor dose diária de insulina, hipoglicemia menos grave e menor risco de retinopatia (Lachin *et al.*, 2014; Steffes *et al.*, 2003).

O desenvolvimento do DM1 geralmente ocorre na infância e adolescência, mas pode ter início em qualquer idade. Embora pacientes com esse tipo de DM raramente sejam obesos, a ausência de obesidade não exclui o diagnóstico de DM1. Esses pacientes apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de outras doenças autoimunes como doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, doença de Addison, vitiligo, doença celíaca, hepatite autoimune, miastenia gravis e anemia perniciosa (ADA, 2017).

No DM1, os marcadores de destruição imune das células β mais utilizados na rotina clínica incluem auto-anticorpos dirigidos contra as ilhotas pancreáticas e para proteínas específicas das células β , incluindo a insulina, descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65, *glutamic acid decarboxylase*) e tirosina fosfatase-2 (IA-2). Geralmente, um ou mais desses anticorpos estão presentes em aproximadamente 90% dos indivíduos quando a hiperglicemia é detectada (Insel *et al.*, 2015; Leslie *et*

al., 1999). Por outro lado, algumas formas de diabetes tipo 1 não têm etiologia conhecida (ADA, 2017).

O desenvolvimento do DM1 envolve interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. Indivíduos que possuem parentes de primeiro grau com DM1 apresentam maior risco de desenvolverem a doença. Além disso, a taxa de concordância entre a doença é muito maior entre gêmeos monozigóticos (30-40%) do que dizigóticos (6%). Embora esses dados indiquem que há fator genético importante para o desenvolvimento da doença, a concordância relativamente baixa entre gêmeos idênticos sugere que importante componente não genético (ambiental) está associado à susceptibilidade no desenvolvimento da doença (Redondo *et al.*, 2001).

Diversos fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento do DM1 nos indivíduos que possuem predisposição genética. Esses determinantes incluem: dieta (proteínas do leite de vaca e glúten), infecções virais (caxumba, rubéola, citomegalovírus) e toxinas (por exemplo, derivados N-nitroso). Outros fatores que predispõe às alterações imunológicas e ao desenvolvimento do DM1 são: administração de vacinas, pouco acesso aos cuidados de saúde, estresse emocional, influências climáticas e certas composições da microbiota intestinal (Kemppainen, *et al.*, 2015; Knip *et al.*, 1999; TEDDY Study Group, 2008).

Com relação ao componente genético, o DM1 está associado ao sistema antígeno leucocitário humano (HLA, *human leukocyte antigens*) localizado no complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). No *locus* HLA-DR, os alelos –DRB1*03 e –DRB1*04 são os mais frequentes nos pacientes diabéticos. Quanto ao *locus* HLA-DQ, os alelos –DQA, -DQB e –DRB também estão associados à suscetibilidade para DM1 (Ferreira *et al.*, 2009; Kockum *et al.*, 1999). Genes não-MHC também podem ter participação como, por exemplo, os polimorfismos no gene da insulina e do CTLA-4 (Bain *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1984; Ferreira *et al.*, 2009).

2.5 Complicações crônicas do diabetes

As alterações vasculares nos indivíduos diabéticos podem ocorrer nos grandes vasos (macroangiopatia), como também nos pequenos vasos (microangiopatia) e são decorrentes, principalmente, do processo de glicação não enzimática das proteínas e formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end products*), bem como da geração de radicais livres. A macroangiopatia caracteriza-se por aterosclerose e tromboembolismo arterial, enquanto as microangiopatias incluem a retinopatia, neuropatia e a nefropatia diabética (Wautier e Guillausseau, 1998).

Sabe-se que pacientes com diabetes têm risco maior de desenvolver doença coronariana quando comparados a indivíduos sem diabetes (Emerging Risk Factors Collaboration, 2010). A diretriz brasileira para prevenção de doença cardiovascular no diabetes de 2017 recomenda a estratificação de risco em baixo, intermediário, alto e muito alto, de acordo com a idade e a ausência/presença de doença aterosclerótica ou de eventos cardiovasculares prévios, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico. Para pacientes com DM e risco cardiovascular muito alto, os alvos lipídicos recomendados são inferiores aos de baixo risco, bem como as metas para HbA1c e pressão arterial são mais rigorosas, a fim de prevenir o desenvolvimento e/ou a progressão de complicações (Bertoluci *et al.*, 2017).

A retinopatia diabética é uma das principais causas de perda visual no mundo em pessoas em idade produtiva (16 a 64 anos) e é a principal causa de cegueira em adultos (Ting *et al.*, 2016). Essa complicação ocorre em mais de 90% dos pacientes com DM1 e em mais de 60% dos pacientes com DM2 (Fong *et al.*, 2004). Desta forma, a retinopatia é uma complicação comum no paciente com diabetes, além de estar associada à duração e ao mau controle da doença (Klein *et al.*, 2008). As neuropatias diabéticas são as complicações crônicas mais comuns em pacientes com DM. Podem afetar diferentes partes do sistema nervoso, desta forma, as manifestações clínicas são muito variadas. A polineuropatia difusa simétrica é a causa mais importante de ulceração no pé e pode ser detectada ao exame físico dos pés (Pop-Busui *et al.*, 2017).

A doença renal diabética pode ser diagnosticada pelo aumento da excreção urinária de albumina, redução da taxa de filtração glomerular (TFG) ou outras alterações renais identificadas em exames patológicos, urinários, de sangue ou de imagem (ADA, 2017). Os estágios da doença renal diabética com base nos níveis de TFG podem ser classificados de 1 a 5, sendo os estágios 1 e 2 definidos pela evidência de dano renal (geralmente albuminúria) com $TFG \geq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, enquanto os estágios 3 a 5 correspondem à progressiva redução da TFG (Levey *et al.*, 2011). A ADA recomenda a classificação da albuminúria em apenas normal ($<30 \text{ mg/g cr}$) ou aumentada ($\geq 30 \text{ mg/g cr}$), sendo esta última em substituição aos termos microalbuminúria e macroalbuminúria (ADA, 2017). Já a *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), a divide em três tipos: normal ($<30 \text{ mg/g cr}$), aumentada ($30\text{-}300 \text{ mg/g cr}$) e muito aumentada ($>300 \text{ mg/g cr}$) (KDIGO, 2013).

O aumento da excreção urinária de albumina é fator de risco independente para doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos e para desenvolvimento de formas mais avançadas de nefropatia (Jensen *et al.*, 1987; Viana *et al.*, 2012). O aparecimento de microalbuminúria está associado ao desenvolvimento de lesão endotelial no DM1. Contudo, mesmo em pacientes normoalbuminúricos, tem sido observado comprometimento da vasodilatação, indicando que a disfunção endotelial possa ser um evento ainda mais precoce do que a microalbuminúria ao longo da história natural do DM1 (Meeking *et al.*, 1999).

A relação entre excreção de albumina e lesão endotelial foi estudada por Stehouwer e colaboradores (1995). Este estudo compreendeu uma coorte de dezessete pacientes com DM1 normoalbuminúricos, avaliados no início do estudo (primeira avaliação) e em outros três momentos subsequentes. Após três anos de acompanhamento, seis pacientes desenvolveram microalbuminúria. Esses pacientes apresentaram ainda níveis mais elevados de fvW, marcador de lesão endotelial, quando comparados ao grupo normoalbuminúrico. No entanto, este aumento precedeu a microalbuminúria, uma vez que foi observado desde a segunda avaliação do estudo. Dessa forma, os resultados sugerem que o fvW é um marcador de lesão endotelial mais precoce do que a microalbuminúria em pacientes com DM1 (Stehouwer *et al.*, 1995).

2.6 Inflamação no diabetes mellitus

O diabetes é caracterizado por um estado pró-inflamatório sub-clínico, o que pode contribuir para o desenvolvimento de complicações microvasculares (Schram *et al.*, 2005). A evidência de inflamação no diabetes inclui: níveis séricos aumentados de PCR; níveis aumentados de PAI1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*), aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) em monócitos e da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL6 e TNF α); aumento da adesão de monócitos ao endotélio; aumento da atividade de NF κ B; e aumento da expressão dos receptores Toll-like 2 e 4 em monócitos de pacientes com diabetes (Devaraj *et al.*, 2010). Ainda, foi demonstrado em pacientes com DM1 níveis urinários elevados de TNF α , IL6 e IL10, sendo que os pacientes com macroalbuminúria apresentaram níveis mais elevados de TNF α quando comparados a pacientes com microalbuminúria. Isto sugere que esta citocina pró-inflamatória tem papel importante na doença renal diabética e pode ser útil na avaliação da progressão da nefropatia em pacientes com DM1 (Pestana *et al.*, 2016). Desta forma, as evidências corroboram que a inflamação tem papel importante no desenvolvimento e na progressão do diabetes e também da doença renal do diabetes.

Estudos têm demonstrado um papel importante das células T helper 17 (Th17) e células T regulatórias no desenvolvimento de DM1 em animais e humanos. As células Th17 induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que afetam muitos tipos celulares. Foi demonstrado em modelo animal de diabetes com STZ que IL23 promove o desenvolvimento de diabetes pela expansão de células Th17. Ainda, a inibição das células Th17 foi associada à prevenção do desenvolvimento desta doença (Annuziato & Romagnani, 2009; Li *et al.*, 2015). O IFN γ está associado à patologia de diversas doenças autoimunes, incluindo o DM1. É uma potente citocina pró-inflamatória capaz de aumentar a expressão dos receptores Toll-like pelas células da resposta imune inata, induzir a apresentação dos MHC de classe I e II, induzir a secreção de quimiocinas, a ativação de macrófagos e a fagocitose (Raphael *et al.*, 2015).

A redução dos receptores para a citocina IL2 ou sua deficiência também possui papel central na patogênese do diabetes. Estudos em modelos animais indicaram

que o aumento da sinalização via IL2 está associado à prevenção ou reversão da doença, mediada pela ação de células T reguladoras (Hulme *et al.*, 2012).

Já a IL10 é uma molécula capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos ativados, assim como reduzir a síntese de ROS (Little *et al.*, 2011; Waehre *et al.*, 2002). O mecanismo de ação está associado à inibição da transcrição de genes de citocinas inflamatórias pelo fator de transcrição NFκB, indução do supressor de síntese de citocina 3, estimulação de citocinas Th2 e proteção contra a disfunção vascular induzida por angiotensina II (Janowska *et al.*, 2016).

A citocina IL4, por sua vez, também é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, produzidas por células Th1, e estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, produzidas por células Th2. O redirecionamento de uma resposta Th1 para Th2 está associado à redução da destruição das ilhotas β pancreáticas (Li *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2004).

Sabe-se que no endotélio íntegro normalmente não há aderência de leucócitos, porém, nas fases precoces da aterosclerose, as células endoteliais começam a expressar moléculas de adesão, como VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*), as quais promovem a aderência de monócitos. A expressão dessas moléculas é induzida por estímulos inflamatórios que incluem IL1β, TNFα, proteína C reativa (PCR) e da quimiocina ligante 2 (motivo C-C) (CCL2, *C-C motif chemokine ligand 2*). Em seguida, há o recrutamento de células inflamatórias para o endotélio e transmigração para a camada íntima do vaso (Szmitko *et al.*, 2003).

A liberação contínua de citocinas pelo endotélio e pelas células espumosas perpetua o processo inflamatório e o acúmulo de lipídeos, estando associada à formação da placa aterosclerótica e do trombo. A citocina TNFα pode induzir a produção de IL6 que estimula a síntese de PCR. Além disso, essa citocina pode estimular a via NFκB (*nuclear factor kappa B*) que, por sua vez, regula a expressão de diversos genes associados à patogênese da doença vascular, como fator tissular, VCAM, ICAM, IL1β, IL6, IL8. Dessa forma, esses mediadores inflamatórios podem causar disfunção endotelial e contribuem para o processo de aterosclerose (Schalkwijk e Stehouwer, 2005).

Os macrófagos, derivados dos monócitos, são as principais células associadas à inflamação renal. Através da ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo NF κ B e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1 β , IL12, IL18, IL23, IL6), quimiocinas e geram ROS e espécies reativas de nitrogênio, incluindo NO. No entanto, os macrófagos também têm a capacidade de gerar citocinas que podem afetar o rim de forma benéfica como IL10 (Duffield, 2010).

2.7 Disfunção endotelial e estresse oxidativo no diabetes mellitus

O endotélio desempenha várias funções importantes na manutenção da homeostase da vasculatura por meio da síntese de substâncias biologicamente ativas que modulam o tônus vascular, bem como na inibição da agregação plaquetária e da proliferação de células musculares lisas. O endotélio pode estar alterado em condições como o diabetes, que podem contribuir para a progressão da lesão vascular (Vane *et al.*, 1990; Hadi e Suwaidi, 2007).

A ação da insulina se inicia com a sua ligação a receptor específico de membrana, o qual consiste em duas subunidades α e duas subunidades β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase, levando a alteração conformacional e autofosforilação. Uma vez ativada, a subunidade β fosforila vários substratos protéicos em tirosina, dentre estes os substratos dos receptores de insulina. Essas proteínas possuem sítios de reconhecimento para diferentes moléculas, sendo a PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) essencial para o transporte de glicose (Pessin & Saltiel, 2000). A insulina, em concentrações fisiológicas, estimula a vasodilatação por meio da produção endotelial de NO. No endotélio, a ativação da via PI3K é capaz de regular a produção de NO insulino-dependente. Isto é comprovado com o fato de que a resistência à insulina, secundária a um defeito sistêmico na via PI3K, determina falha combinada no transporte de glicose e na vasodilatação endotélio-dependente de insulina (Schroeder *et al.*, 1999; Zeng e Quon, 1996).

Contudo, a hiperglicemia é o principal fator associado às complicações vasculares no diabetes (Lee *et al.*, 1989). A glicose contribui diretamente para a lesão endotelial através da glicação irreversível do colágeno subendotelial e de outras proteínas estruturais do vaso, formando os AGEs (Meigs *et al.*, 2000). As interações entre os AGEs com os seus receptores celulares têm papel importante na patogênese de complicações diabéticas através do aumento da expressão de moléculas de adesão, incluindo VCAM e ICAM, bem como o aumento da permeabilidade vascular e a geração de fator tissular pró-coagulante (Schmidt e Stern, 2000). A formação de AGEs também está associada aos elevados níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) em pacientes diabéticos, indicativo de lipoperoxidação (Wautier *et al.*, 1994).

As ROS são produzidas constantemente durante os processos metabólicos. Em indivíduos saudáveis, a concentração de ROS é controlada pela ação dos sistemas antioxidantes enzimáticos, tais como SOD, catalase e glutathione peroxidase, e não enzimáticos, como vitaminas C e A. Contudo, em indivíduos diabéticos, ocorre aumento da formação de ROS devido à auto-oxidação da glicose, o que leva à ativação da via dos polióis, da hexosamina e da PKC (proteína quinase C) e à formação de AGEs, além de estar associado a mudanças no conteúdo e atividade no sistema de defesas antioxidantes no tecido, levando a um quadro de estresse oxidativo (Figura 1) (Baynes, 1991; Luppi *et al.*, 2013; Schalkwijk e Stehouwer, 2005).

Conforme dito anteriormente, o endotélio tem o papel fundamental de manter a homeostase da vasculatura por meio, principalmente, da produção de NO, o qual é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima eNOS. Esse gás se difunde rapidamente do endotélio para a camada de células musculares lisas e plaquetas onde promove a produção de GMP cíclico (GMPc, *cyclic guanosine monophosphate*) com consequente relaxamento vascular e inibição da agregação plaquetária. A meia-vida do óxido nítrico é de apenas alguns segundos, sendo rapidamente oxidado a nitrato (Moncada e Higgs, 1993).

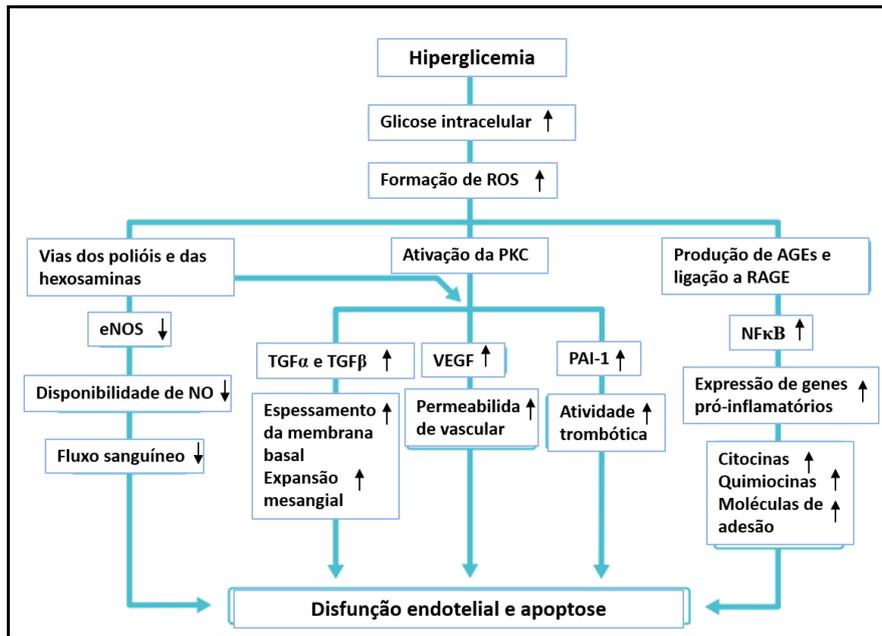


Figura 1 – Modelo esquemático do papel da hiperglicemia na lesão vascular. A hiperglicemia é acompanhada pela geração de ROS levando à ativação das vias dos polióis e das hexosaminas, da PKC e da produção de AGEs, com subsequente ligação ao seu receptor (RAGE), todos estes eventos culminam em disfunção endotelial e apoptose. Abreviações: NO, óxido nítrico; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; TGF α , fator de crescimento transformador alfa (transforming growth factor alfa); TGF β , fator de crescimento transformador beta (transforming growth factor beta); NF κ B, nuclear factor kappa B; PAI1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (Adaptado de Luppi *et al.*, 2013).

Ainda, no paciente hiperglicêmico, o aumento do estresse oxidativo pode levar ao desacoplamento da eNOS, diminuição da sua atividade e, conseqüentemente, a menor produção de NO, o que pode desencadear aumento da pressão arterial e maior frequência da formação de trombos (Brownlee, 2005; Forst *et al.*, 2008).

Além de interferir na disponibilidade de NO, as ROS podem também interferir na função endotelial por meio da peroxidação de lipídeos da membrana e ativação da via do NF κ B. Essas espécies podem também afetar diversas vias de sinalização, como das proteínas G e quinases, bem como canais de íons e fatores de transcrição (Schalkwijk e Stehouwer, 2005).

2.8 Fator de von Willebrand (fvW)

O gene do fvW está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q13.31) e codifica uma glicoproteína multimérica sintetizada por megacariócitos e células endoteliais, a qual pode ser encontrada no subendotélio, no plasma, nas plaquetas, bem como no endotélio vascular. O fvW é secretado em uma forma de alto peso molecular, os grandes multímeros do fvW, os quais constituem as formas mais trombogênicas. No plasma, os grandes multímeros do fvW são clivados por uma protease chamada ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13*) em multímeros menores, os quais possuem menor capacidade de adesão, o que limita a formação do trombo plaquetário (Reininger, 2008b).

O fvW é armazenado nos grânulos alfa dos megacariócitos e nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais, os quais possibilitam mobilização rápida em resposta a moléculas ativadoras, como a trombina. Por isso, quando há lesão endotelial, o aumento dos níveis plasmáticos de fvW é marcante e expressa possível estado de hipercoagulabilidade (Jenkins e O'Donnell, 2006; Sumpio *et al.*, 2002). A adesão plaquetária mediada pelo fvW é especialmente importante nas regiões onde há alto estresse de cisalhamento, como nas arteríolas (Savage *et al.*, 1996).

As duas principais funções do fvW são: (1) ligar-se ao colágeno presente no subendotélio lesado e nas plaquetas, promovendo a formação do tampão plaquetário; e (2) ligar e transportar o fator VIII, protegendo-o da proteólise no plasma. As diferentes funções do fvW estão relacionadas aos domínios específicos da molécula e à sua estrutura modular. O fvW apresenta sítios de ligação ao colágeno, às glicoproteínas plaquetárias (Gp) Ib e IIb/IIIa, bem como ao fator VIII da coagulação, o que justifica o seu importante papel no sistema hemostático (Lip e Blann, 1997; Berber, 2012). O fator VIII liga-se ao domínio D' e D3 do fvW, enquanto o colágeno pode se ligar ao domínio A1 e ao domínio A3, sendo este último o principal sítio de ligação para o colágeno (Figura 2).

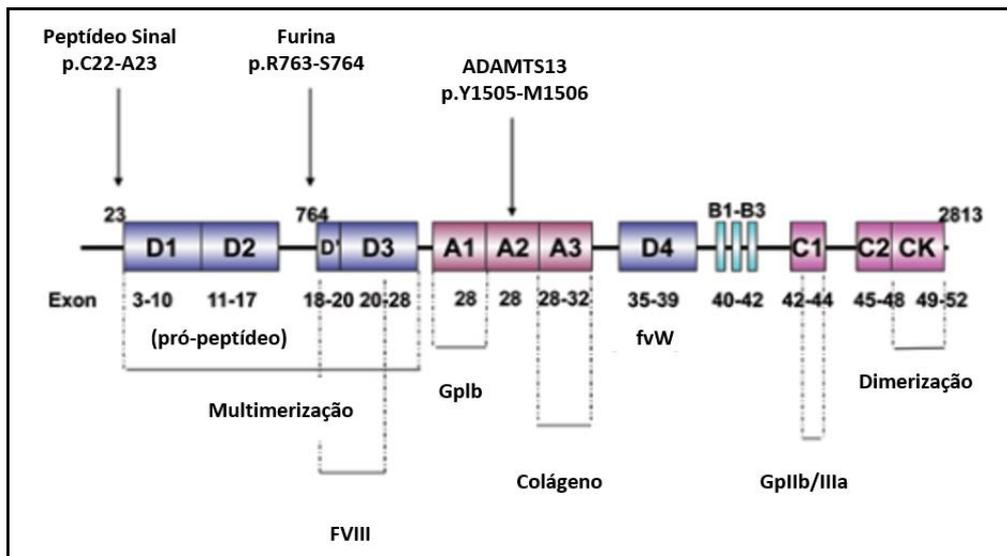


Figura 2 – Estrutura e domínios funcionais do fator de von Willebrand. Os principais domínios do fator de von Willebrand são: D1, D2 e D3 – participam do processo de multimerização; D' e D3 – ligação do fator VIII; A1 – ligação com a glicoproteína plaquetária GPIba. A2 – clivagem pela ADAMTS13; A3 – ligação para o colágeno; C1 – ligação com a glicoproteína plaquetária GpIIb/IIIa. Abreviações: fvW, fator de von Willebrand; FVIII, fator VIII; Gp Ib, glicoproteína Ib; Gp IIb/IIIa, glicoproteína IIb/IIIa (Adaptado de Berber, 2012).

Dessa forma, uma lesão no endotélio vascular com exposição do colágeno presente no subendotélio promove a ligação dos multímeros de alto peso molecular ao colágeno através do domínio A3. Logo em seguida, o multímero passa por processo de desdobramento e mudança conformacional, expondo assim o domínio A1, onde ocorre ligação com a glicoproteína plaquetária GP Iba (adesão plaquetária). Após a ativação plaquetária, uma outra glicoproteína plaquetária, a GpIIb/IIIa, se liga ao fvW no domínio C1, onde encontra-se a sequência RGD (Arg-Gly-Asp), permitindo a aderência das plaquetas entre si (agregação plaquetária) e formação do trombo (Jenkins e O'Donnell, 2006; Savage *et al.*, 1996).

A interação entre o fvW e as plaquetas são essenciais para a manutenção da hemostasia. A sua deficiência ou disfunção, bem como alterações no receptor Gp Ib presente nas plaquetas, está associada aos distúrbios hemorrágicos como a doença de von Willebrand e a síndrome de Bernard-Soulier, respectivamente (Bowen e Collins, 2006).

A deficiência dos multímeros de elevado peso molecular, bem como os de tamanho intermediário na circulação, pode estar associada ao aumento da proteólise pela ADAMTS13, devido às mutações no domínio A2 do fvW que promovem alteração na sua conformação, deixando o sítio de ação da enzima mais acessível (Lyons *et al.*, 1992). Além disso, mutações que ocorrem em regiões do fvW que estão associadas com a formação dos multímeros de alto peso molecular (domínios D1, D2 e D3) levam à ausência destas estruturas. Substituições de aminoácidos no fvW também podem provocar alterações na conformação do domínio A2, aumentando significativamente a sua proteólise pela ADAMTS13, o que predispõe os indivíduos à hemorragia na doença de von Willebrand (Bowen e Collins, 2006).

Níveis elevados do fvW na presença de microalbuminúria em pacientes diabéticos têm sido associados ao desenvolvimento de vasculopatia e doença cardiovascular (Stehouwer *et al.*, 1995). Além disso, tem sido observado nesses pacientes atividade reduzida da enzima ADAMTS13, o que aumenta o risco de desenvolvimento de aterosclerose e tromboembolismo arterial (Lip e Blann, 1997).

2.9 ADAMTS13 (a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs, member 13)

A protease que cliva o fvW foi isolada em 1996 (Furlan *et al.*, 1996; Tsai e Lian 1996). Em 2001, essa protease foi identificada como ADAMTS13, por ser o 13º membro da família ADAMTS de metaloproteases, uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina, dependente de Zn^{2+}/Ca^{2+} (Fujikawa *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001).

A Figura 3 apresenta os domínios da ADAMTS13 que incluem: peptídeo sinal (S); pró-peptídeo (P); e domínio tipo metaloproteinase (M), onde está localizado o motivo de ligação ao zinco mostrado em vermelho, importante para a proteólise do fvW. Ainda a Figura mostra: domínio desintegrina (Des); primeira repetição do domínio de trombospondina tipo 1; domínio rico em cisteína (Cis); e domínio espaço (Esp), sendo que todos estes são importantes para a ligação com o fvW. Por fim, é possível observar a segunda à oitava repetição do domínio de trombospondina tipo

1; e dois domínios CUB (acrônimo de três proteínas através das quais o domínio foi caracterizado: Complemento C1r/C1s, fator de crescimento epidérmico sea urchin, Bone morphonetic protein 1), sendo que estes domínios são importantes para o reconhecimento e clivagem do fvW (Lancelotti, 2013).

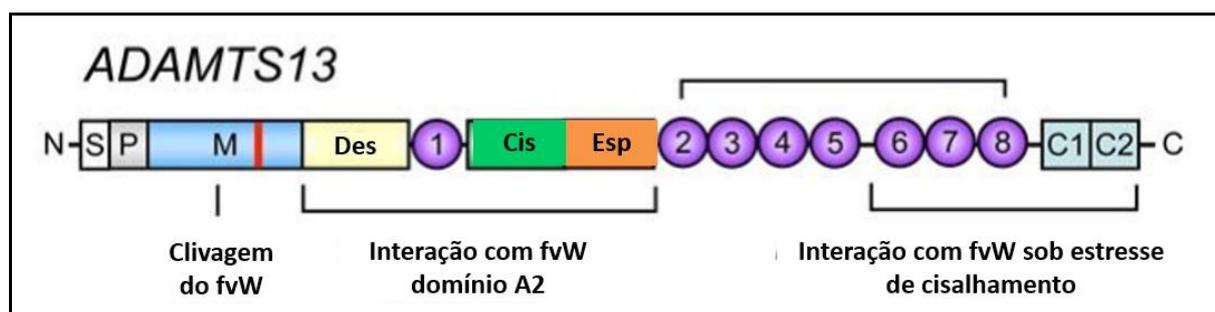


Figura 3 – Estrutura e domínios da ADAMTS13. Os principais domínios da ADAMTS13 são: S – peptídeo sinal; P – pró-peptídeo; M – metaloproteinase; Des – desintegrina; 1 a 8 – motivos de trombospondina tipo 1; Cis – domínio rico em cisteína com sequência arginina-glicina-aspartato; Esp – espaçador; C1 e C2 – domínios CUB. Abreviações: fvW, fator de von Willebrand; CUB, Complemento C1r/C1s, fator de crescimento epidérmico sea urchin, bone morphonetic protein 1 (Adaptado de Lancellotti, 2013).

O gene da ADAMTS13 está localizado no braço longo do cromossomo 9, contém 29 éxons e aproximadamente 37 kb de sequência genômica (Levy *et al.*, 2001). Estima-se que a proteína traduzida apresente um peso molecular de aproximadamente 145 kDa, que difere do peso molecular de 190 kDa observado para ADAMTS13 purificada a partir de plasma humano. Essa diferença entre os pesos calculado e o molecular é provavelmente devido à glicosilação da proteína (Fujikawa *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2005).

A ADAMTS13 é uma enzima proteolítica sintetizada principalmente pelo fígado, mas também é expressa nas plaquetas (Suzuki *et al.*, 2004), nas células endoteliais (Turner *et al.*, 2006) e nos rins e está presente normalmente no plasma (Manea *et al.*, 2010). A concentração plasmática de ADAMTS13 varia de 0,5 a 1,0 mg/L. A enzima é estável e tem meia-vida no plasma de aproximadamente 2 a 3 dias (Crawley *et al.*, 2005; Furlan *et al.*, 1999).

Em condições fisiológicas, a ADAMTS13 cliva os grandes multímeros do fvW e os remove da circulação, o qual é o único substrato conhecido para essa enzima. A clivagem ocorre na ligação peptídica entre tirosina na posição 1605 e metionina na posição 1606, localizado no domínio A2 do fvW e gera multímeros mais curtos (Furlan *et al.*, 1996; Tsai, 1996; Levy *et al.*, 2001). Os grandes multímeros do fvW não são uniformemente clivados em fragmentos menores de tamanho idêntico pela ADAMTS13, uma vez que sofrem proteólise parcial por esta enzima (Reininger, 2008a).

O fvW e a ADAMTS13 circulam juntos no plasma, onde a ADAMTS13 pode ligar-se ao fvW em condições estáticas ou sob condições de estresse de cisalhamento. No entanto, esta interação pode ser ineficaz em relação à proteólise, a menos que a tensão de cisalhamento seja alta o suficiente para esticar o fvW e expor o domínio A2 que possui o local de clivagem pela ADAMTS13 (Dong, 2005). A clivagem do fvW resulta na libertação do fvW da superfície endotelial e permite que a molécula adote conformação globular, o que reduz a sua acessibilidade às plaquetas (Reininger, 2008b). A tensão de cisalhamento também pode favorecer a adesão de plaquetas mediada pelos grandes multímeros do fvW, através da exposição do domínio de ligação a GPIIb, o que é necessária para a formação de trombos. Dessa forma, a tensão de cisalhamento pode tanto promover a formação do tampão plaquetário pelo fvW, quanto aumentar a sua proteólise limitando a interação com as plaquetas (Bowen e Collins, 2006).

A deficiência ou disfunção da ADAMTS13 resulta na ausência de clivagem ou clivagem parcial dos grandes multímeros do fvW e predispõe à formação espontânea de agregados plaquetários intravasculares, resultando em púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (Figura 4). A PTT pode ser congênita, causada por mutação no gene da ADAMTS13, ou adquirida, sendo causada pela presença de auto-anticorpos contra essa protease. Em todas as situações, ocorre deficiência grave da atividade da ADAMTS13 (<5%), o que resulta em estado patológico severo. A deficiência de ADAMTS13 nesses pacientes está associada à formação de trombos ricos em fvW e plaquetas na microcirculação do coração, cérebro, rins, fígado, baço e supra-renais. Esses pacientes geralmente desenvolvem acidente

vascular encefálico precocemente, bem como complicações renais (Feys *et al.*, 2010; Manea *et al.*, 2007).

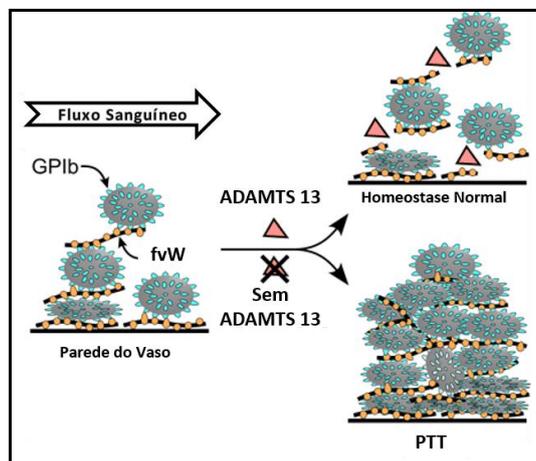


Figura 4 – Patogênese da púrpura trombocitopênica trombótica causada pela deficiência de ADAMTS13. A púrpura trombocitopênica trombótica está associada à presença de trombos ricos em plaquetas e fator de von Willebrand na microvasculatura do organismo devido à deficiência grave da ADAMTS13. Abreviações: GPIb, glicoproteína plaquetária Ib; fvW, fator de von Willebrand; PTT, púrpura trombocitopênica trombótica (Adaptado de Sadler, 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que a ADAMTS13 pode ser clivada por proteases plasmáticas, tais como trombina, plasmina e elastase de granulócitos, resultando na sua inativação. Por outro lado, a trombomodulina pode inibir a inativação da ADAMTS13 mediada pela trombina. Dessa forma, a inativação da ADAMTS13 por trombina e plasmina poderia promover o recrutamento de plaquetas pelo fvW, enquanto a trombomodulina poderia limitar a propagação da agregação plaquetária no endotélio não lesionado em torno do sítio da lesão vascular (Crawley *et al.*, 2005; Feys *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2006). Em condições clínicas associadas ao estado de hipercoagulabilidade e inflamação, os níveis plasmáticos de trombina, plasmina e elastase de granulócitos são mais elevados, o que pode estar associado ao aumento da degradação de ADAMTS13 e, conseqüentemente, a menor atividade desta enzima (Ono *et al.*, 2006).

Sabe-se que níveis elevados do fvW estão associados à diminuição da concentração da ADAMTS13 no plasma (Mannuci *et al.*, 2004). Foi demonstrado *in vitro* que a IL6 inibe ou interrompe a clivagem do fvW pela ADAMTS13, enquanto IL8 e TNF α promovem a liberação do fvW através da ativação de células endoteliais (Bernardo *et al.*, 2004). Pelo fato do fvW ser produzido em excesso em condições clínicas nas quais há aumento da produção de citocinas, o fvW excedente não é clivado pela ADAMTS13. Portanto, há desequilíbrio entre fvW e ADAMTS13 causado pelas citocinas pró-inflamatórias (Bernardo *et al.*, 2004; Arimoto *et al.*, 2012; Gragnano *et al.*, 2017).

O DM é uma condição clínica na qual a resposta inflamatória também pode perturbar o equilíbrio entre a atividade da ADAMTS13 e os níveis plasmáticos de fvW, resultando em estado pró-trombótico (Skeppholm *et al.*, 2009; Vischer, 2006). Nos pacientes com diabetes, os mecanismos envolvidos na redução dos níveis plasmáticos da ADAMTS13 ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, estudos têm demonstrado que condições clínicas que cursam com hipercoagulabilidade estão associadas à perda da ADAMTS13 na urina; degradação da ADAMTS13 por proteases plasmáticas; e produção hepática e/ou renal reduzidas da ADAMTS13 devido à inibição da síntese por citocinas pró-inflamatórias (Manea *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2008).

Um outro estudo demonstrou em pacientes com estado pró-trombótico (diabetes, aterosclerose, câncer, sepse, leucemia pró-mielocítica aguda), menor atividade da ADAMTS13 no plasma quando comparado ao grupo controle saudável. Os níveis de trombospondina 1 e fvW no grupo caso foram significativamente superiores em relação ao grupo controle. A análise de correlação demonstrou que a atividade da ADAMTS13 se correlacionou negativamente com os níveis de trombospondina 1, glicemia, pressão sanguínea, dímero D, creatinina e níveis de PCR (proteína C reativa), sugerindo que a redução da atividade da ADAMTS13 está associada ao aumento da hipercoagulabilidade (Sun *et al.*, 2016).

2.10 Peptídeo C

2.10.1 Estrutura e função

O peptídeo de ligação da pró-insulina humana, peptídeo C, até há pouco tempo era conhecido apenas como uma molécula inativa, servindo para unir e estabilizar as cadeias A e B da molécula de pró-insulina, facilitando o enovelamento da insulina e a formação das pontes dissulfeto entre as cadeias (Figura 5) (Bhatt *et al.*, 2014; Wahren e Larsson, 2015).

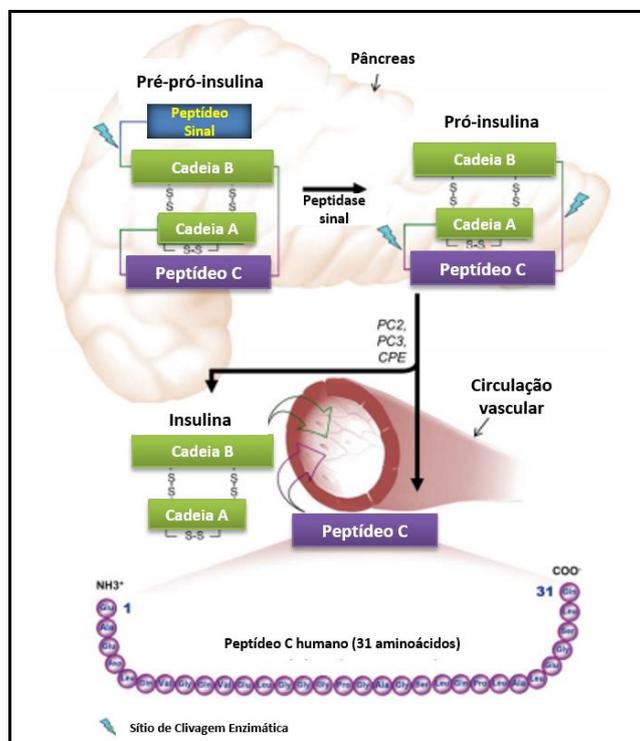


Figura 5 – Ilustração esquemática do peptídeo C e o seu papel na biossíntese da insulina. A pré-pró-insulina é clivada enzimaticamente originando a pró-insulina. Após a clivagem da pró-insulina, há a liberação equimolar de insulina e peptídeo C para a corrente sanguínea (Adaptado de Bhatt *et al.*, 2014).

Durante o processo de clivagem da pró-insulina há a liberação do peptídeo C, o qual é secretado em concentrações equimolares à insulina, sendo utilizado clinicamente como marcador da secreção endógena de insulina e da atividade das células β

devido à sua meia vida mais longa (Hills *et al.*, 2010). A meia vida da insulina é de cerca de 4 minutos. O fígado rapidamente degrada este hormônio durante a sua primeira passagem, sendo que apenas 50% atinge a circulação sistêmica. Por outro lado, o peptídeo C não é removido em sua primeira passagem pelo fígado e tem uma meia vida circulante de cerca de 30 minutos. O nível plasmático de peptídeo C em jejum e pós-prandial varia entre 0,3-1 nM e 1,5-2,5 nmol / L, respectivamente (Ghorbani e Shafiee-Nick, 2015).

Estudos recentes têm demonstrado efeitos biológicos do peptídeo C em diferentes tipos celulares, podendo contribuir para a prevenção de complicações do DM (Lim *et al.*, 2014; Pujia *et al.*, 2017).

Os mecanismos envolvidos nas ações biológicas do peptídeo C parecem estar relacionados com as vias de sinalização intracelular da proteína G. Como este receptor é totalmente saturado em concentrações fisiológicas de peptídeo C, os efeitos da administração exógena deste peptídeo só podem ser observados em pacientes e animais que possuem deficiência de peptídeo C (Hills *et al.*, 2010; Rigler *et al.*, 1999; Wahren *et al.*, 2012). A ligação do peptídeo C ao seu receptor na membrana da célula resulta na ativação de uma proteína G com o subsequente influxo de Ca^{2+} e ativação da eNOS, resultando na formação de NO. A fosfolipase C e isômeros específicos da PKC são, então, fosforilados, bem como o complexo da proteína MAPK. Como resultado, há ativação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase e a ligação ao DNA de diversos fatores de transcrição. A PI3-K também é ativada promovendo regulação da atividade transcricional (Wahren e Larsson, 2015).

Sabe-se que, em pacientes com DM1, a persistência de alguma secreção residual de peptídeo C é associada com melhor controle glicêmico e a um risco menor de desenvolvimento de complicações microvasculares (VanBuecken & Greenbaum, 2014). Além disso, tem sido demonstrado que o peptídeo C pode aumentar a captação de glicose em todo o corpo humano, além de ter mostrado efeitos benéficos na nefropatia e neuropatia diabética (Brunskill, 2017; Ghorbani e Shafiee-Nick, 2015).

2.10.2 Peptídeo C e as complicações do diabetes mellitus

Diversos estudos têm demonstrado que a patogênese das complicações microvasculares no diabetes está relacionada à hiperglicemia e à ausência de peptídeo C, com consequente aumento da produção de ROS e morte celular (Cifarelli *et al.*, 2011; Wahren & Larsson, 2015).

O papel do peptídeo C nas alterações renais está associado à redução da hiperfiltração glomerular, da excreção de albumina na urina, do volume glomerular e da expansão da matrix mesangial. Além disso, reduz a produção de $TNF\alpha$, o qual estimula a inflamação e morte das células do endotélio renal (Hills *et al.*, 2010). Já é bem estabelecido que o peptídeo C inibe a via $NF\kappa B$ reduzindo as concentrações plasmáticas de citocinas e quimiocinas (Luppi *et al.*, 2013). A inibição da via $NF\kappa B$ pelo peptídeo C poderia proteger contra a lesão tubular renal mediada pelo $TNF\alpha$ que é capaz de promover um amplo espectro de respostas celulares, incluindo inflamação e morte celular, e está aumentada em diabéticos com alteração renal. (Al-Rasheed *et al.*, 2006).

Foi demonstrado em ratos diabéticos tratados com STZ hiperfiltração glomerular e perda de proteínas na urina. A administração de peptídeo C promoveu melhora na função renal ao reduzir a hiperfiltração e a excreção urinária de proteínas (Sjoquist *et al.*, 1998). Outro estudo também demonstrou redução significativa na TFG e na excreção de albumina na urina em ratos diabéticos tratados com peptídeo C quando comparados a controles que receberam cloreto de sódio (NaCl) (Samnegard *et al.*, 2001). Além disso, o peptídeo C limitou a hipertrofia glomerular e a expansão da matriz mesangial, induzidos pelo diabetes (Samnegard *et al.*, 2005). Nordquist *et al.* (2009) demonstram ainda que o peptídeo C é capaz de regular a expressão da eNOS e a produção de NO nos capilares glomerulares, o que está associado à redução da pressão intraglomerular e da hiperfiltração (Nordquist *et al.* 2009).

Os efeitos do peptídeo C sobre os nervos periféricos têm sido demonstrado em estudos realizados com humanos e animais e vêm indicando um efeito significativo deste peptídeo sobre a função neuronal (Ekberg & Johansson, 2008; Wahren & Larsson, 2015).

Em ratos BB, com desenvolvimento espontâneo de DM1, a administração de peptídeo C limitou as alterações funcionais na condução nervosa (Sima *et al.*, 2001). De forma semelhante, em ratos com diabetes induzida por STZ, o tratamento com peptídeo C melhorou a velocidade de condução nervosa motora e sensorial nestes animais (Cotter *et al.*, 2003). Stevens *et al.* (2003) administraram o peptídeo C por dois meses em ratos diabéticos com o objetivo de avaliar a função neurovascular. Eles verificaram que o tratamento com peptídeo C melhorou a perfusão nervosa (Stevens *et al.*, 2003)

Também já foram estudados os efeitos do peptídeo C sobre a retinopatia diabética. Sabe-se que nas células endoteliais, os AGEs causam a superprodução de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) que, por sua vez, estimula a angiogênese e a neovascularização, ambas envolvidas na patogênese da retinopatia. Em camundongos com diabetes induzida por STZ, a administração de peptídeo C promoveu redução da expressão de VEGF (Lim *et al.*, 2014). Um estudo desenvolvido por Ido *et al.*, 1997 já havia demonstrado maior extravasamento de albumina marcada com I¹²⁵ na retina de animais diabéticos quando comparados àqueles tratados com peptídeo C, indicando que este peptídeo reduz a permeabilidade vascular da retina. Além disso, Chung *et al.*, 2015 demonstraram que pacientes diabéticos tipo 2 que apresentam menores níveis de peptídeo C possuem prevalência maior de retinopatia diabética, associado com a sua gravidade.

Assim, mais estudos que avaliem o efeito do peptídeo C nas várias complicações do DM são necessários, a fim de criar perspectivas para o seu uso terapêutico.

2.11 Modelo animal de diabetes tipo 1

O diabetes experimental pode ser induzido cirurgicamente, pela administração de agentes químicos beta-citotóxicos, manipulação genética ou por meio da manutenção de linhagens que desenvolveram a doença espontaneamente. A maioria dos experimentos é realizada em roedores, embora alguns estudos sejam realizados em animais maiores. O modelo murino é o mais usado em decorrência da

habilidade de deletar ou superexpressar genes específicos por meio da tecnologia de *knockout* e transgênicos (Rees e Alcolado, 2005).

As substâncias mais comumente utilizadas para a indução do diabetes são o aloxano e a estreptozotocina (STZ) que agem preferencialmente nas ilhotas pancreáticas via canais GLUT-2 (Rees e Alcolado, 2005; Szkudelski, 2001). Esses agentes químicos causam toxicidade às células β principalmente por meio da produção de ROS e alquilação do DNA, respectivamente (Lenzen, 2008). O aloxano apresenta instabilidade química, influência da dieta e estreita faixa de segurança entre as doses diabetogênicas e letais. Estes fatores tornam difícil o estabelecimento da relação dose-resposta efetiva no pâncreas (Szkudelski, 2001).

A STZ é uma glicosamina-nitrosureia isolada originalmente a partir da bactéria *Streptomyces achromogenes*, que apresenta atividade antibiótica e antineoplásica, sendo comumente usada para a indução experimental do diabetes. Contém uma molécula de glicose na forma de desoxiglicose, a qual é responsável pelo direcionamento químico da STZ para a célula β pancreática, e uma porção metilnitrosuréia que é responsável pelos efeitos tóxicos da STZ (Figura 6). Dessa forma, a droga é captada pelas células pancreáticas devido a sua similaridade com a molécula de glicose via GLUT-2 (Wu e Yan, 2015).

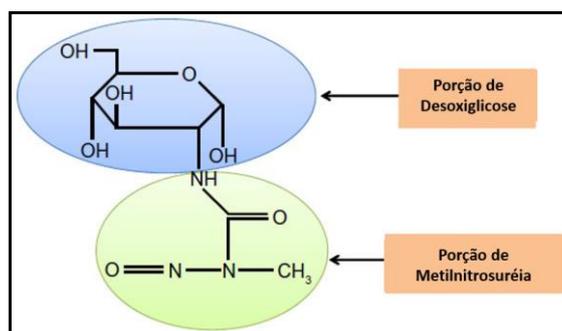


Figura 6 – Estrutura molecular da estreptozotocina. Presença de molécula de glicose na forma de desoxiglicose e uma porção metilnitrosuréia (Adaptado de Wu e Yan, 2015).

O tratamento com STZ produz um estado diabético caracterizado pela perda de peso, polidipsia, poliúria, glicosúria, polifagia, hipoinsulinemia e hiperglicemia. A citotoxicidade causada pela STZ é devido, principalmente, à alquilação do DNA, uma vez que a transferência de grupos metil promovem fragmentação do ácido nucléico (Figura 7). Na tentativa de reparo do DNA, a enzima poli-ADP-ribose polimerase é super estimulada, o que leva à depleção de NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado) e ATP (trifosfato de adenosina) nas células pancreáticas, com subsequente inibição da secreção e síntese da insulina (Bólzan e Bianchi, 2002; Szkudelski, 2001). A administração de STZ também induz a liberação de quantidades tóxicas de NO que causam dano ao DNA e inibem a atividade da aconitase nas mitocôndrias, o que está associado à inibição do ciclo de Krebs. Além disso, a defosforilação acentuada do ATP, após a administração de STZ, fornece substrato para a ação da xantina oxidase, resultando na formação de radicais superóxido. As ações conjuntas da STZ resultam então em destruição das células β pancreáticas, levando conseqüentemente, à hipoinsulinemia e hiperglicemia (Szkudelski, 2001).

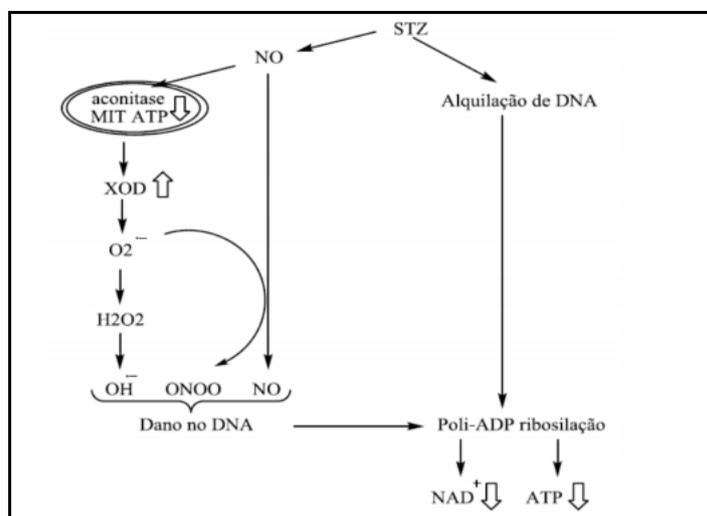


Figura 7 – Mecanismo de ação da estreptozotocina. A estreptozotocina atua como agente alquilante sobre a estrutura do DNA levando a processos celulares que inibem a síntese e secreção da insulina nas células β pancreáticas. A estreptozotocina também induz a formação de óxido nítrico e radicais superóxido que também causam dano ao DNA. MIT, mitocôndria; ATP, adenosina trifosfato; XOD, xantina oxidase; NO, óxido nítrico; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; O_2^- , OH^- , ONNO, radicais superóxido; NAD^+ , dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (Adaptado de Szkudelski, 2001).

Dentre os modelos experimentais obtidos quimicamente mais utilizados para o estudo do DM1, se destaca o induzido por STZ, uma vez que a STZ é considerada o melhor agente diabetogênico, principalmente devido à sua maior estabilidade se comparada ao aloxano. Porém, apesar desses métodos serem apropriados para gerar animais insulino-dependentes, esses modelos não exibem autoimunidade espontânea de forma semelhante à observada em humanos (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2013).

Existem dois modelos mais utilizados que desenvolvem espontaneamente o diabetes devido a destruição auto-imune das células β do pâncreas: os camundongos NOD (*non-obese diabetic*) e os ratos BB (*Bio-breeding*). No entanto, esses também apresentam algumas desvantagens como altos custos de manutenção e susceptibilidade variável para o desenvolvimento do diabetes. Além disso, em camundongos NOD a incidência da doença é diferente entre fêmeas (90%) e machos (60%) e camundongos BB podem apresentar severa leucopenia (Rees e Alcolado, 2005).

3. JUSTIFICATIVA

Níveis plasmáticos elevados do fvW e reduzidos da ADAMTS13 têm sido observados em pacientes diabéticos com alteração renal. Sabe-se que a doença renal no diabetes está associada ao aumento no risco de eventos trombóticos, principalmente cardiovasculares, sugerindo que as alterações hemostáticas devido ao desbalanço entre o fvW e a ADAMTS13, enzima que promove o *clearance* de fvW, associadas à nefropatia, possam ser fator importante para o estado pró-coagulante no diabetes (Domingueti *et al.*, 2015; Lip e Blann, 1997; Vischer, 2006).

Sabe-se ainda que em pacientes diabéticos a deficiência de peptídeo C também pode estar associada ao estado pró-coagulante característico dessa condição clínica. Estudos com modelos animais de diabetes têm demonstrado que a administração de peptídeo C está associada à redução da perda urinária de proteínas (Sjoquist *et al.*, 1998), da hipertrofia glomerular (Samnegard *et al.*, 2005) e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL1 β , IL6 e TNF α (Luppi *et al.*, 2013), bem como aumento da expressão da eNOS e, conseqüentemente da produção de NO (Scalia *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2003). Além disso, o peptídeo C demonstrou ação anti-trombótica ao reduzir os níveis de PAI1 (Lindenblatt *et al.*, 2006) e a expressão de moléculas de adesão como ICAM, VCAM e P-selectina (Scalia *et al.*, 2000; Luppi *et al.*, 2008). No entanto, o papel do peptídeo C na doença renal diabética e na disfunção endotelial precisa ser melhor estudado, incluindo se a administração deste peptídeo poderia alterar os níveis do fvW e da ADAMTS13.

Assim, a hipótese do presente estudo é que a nefropatia diabética está associada às alterações nos níveis do fvW e da ADAMTS13, o que é influenciado pelo grau de comprometimento renal ao longo da progressão do diabetes. Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas alterações dos níveis destes marcadores incluem maior perda urinária e aumento da expressão gênica. Ainda, o peptídeo C é capaz de reduzir o risco de complicações renais, hemostáticas (por meio de alterações nos níveis do fvW e ADAMTS13) e inflamatórias (por meio de alterações nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias) no DM1, criando novas possibilidades terapêuticas para esta condição clínica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar alterações hemostáticas e inflamatórias em modelo animal de diabetes mellitus tipo 1 e avaliar a influência do tratamento com peptídeo C sobre estas alterações e na doença renal do diabetes.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar marcadores de função renal e morfologia dos rins entre o modelo animal de DM1 e o grupo controle.
- Comparar os níveis plasmáticos e urinários de fvW e ADAMTS13 nos grupos controle e diabético.
- Comparar a expressão gênica renal e hepática da ADAMTS13, bem como endotelial do fvW, nos grupos estudados.
- Comparar a expressão gênica renal e endotelial da eNOS nos grupos estudados.
- Avaliar o efeito do peptídeo C na glicemia, nos níveis plasmáticos e urinários de fvW e ADAMTS13 nos grupos controle tratado, diabético não-tratado e diabético tratado com peptídeo C.
- Avaliar os efeitos do tratamento com peptídeo C na morfologia e na função renal.
- Caracterizar o perfil inflamatório dos grupos por meio da avaliação sérica e urinária das citocinas IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, IFN γ e TNF α nos grupos estudados.
- Avaliar o efeito do peptídeo C na resposta inflamatória.
- Analisar a expressão gênica renal das citocinas IL6, IL10 e TNF α e do estresse oxidativo (por meio da expressão gênica endotelial da SOD) nos grupos estudados.
- Correlacionar as variáveis metabólicas, renais, hemostáticas e inflamatórias.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

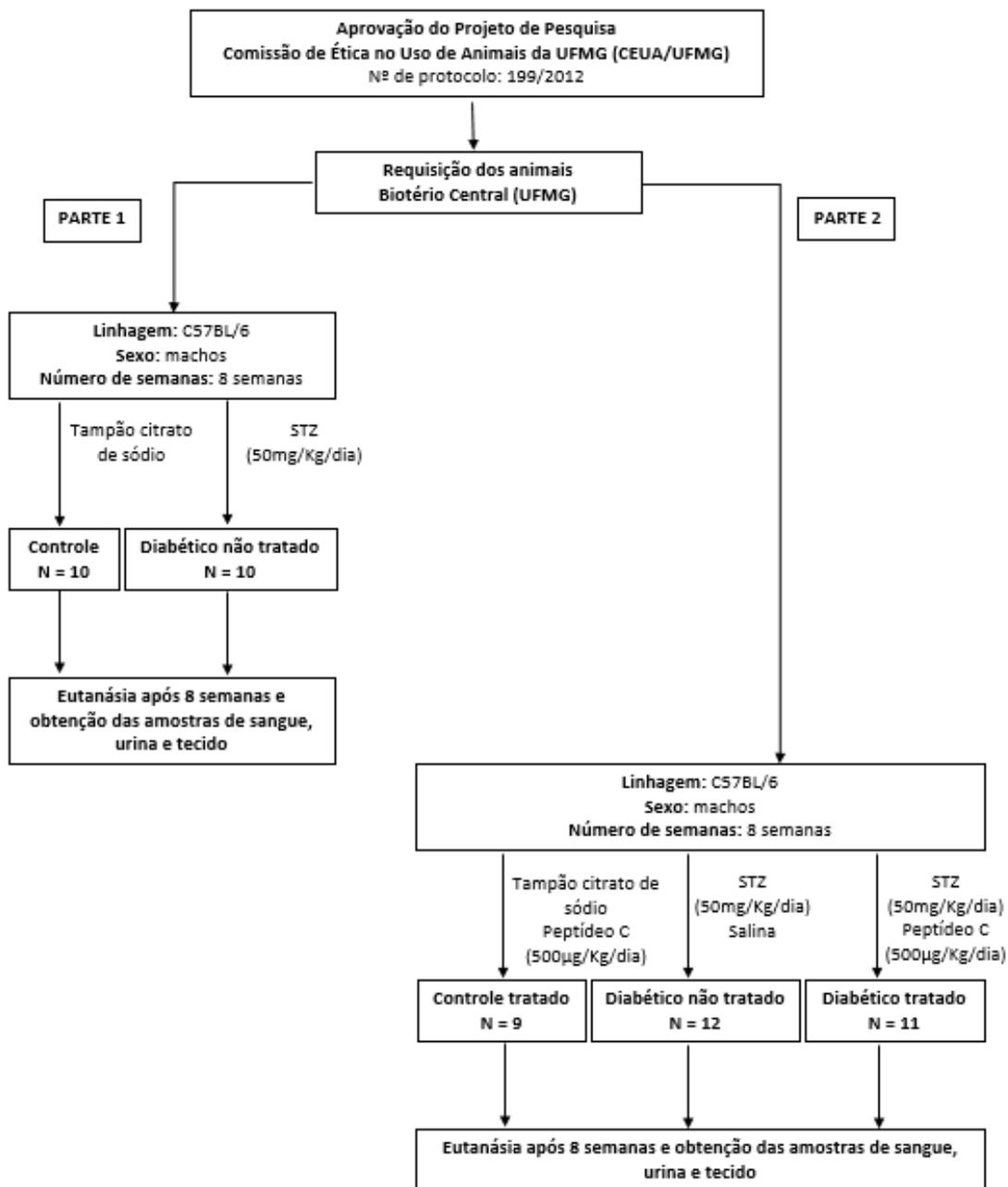


Figura 8 – Fluxograma da indução do diabetes e tratamento com peptídeo C. Na primeira etapa do projeto (esquerda), os camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de idade foram divididos em grupos controle e diabético. Na segunda etapa (direita), os animais foram divididos em controle tratado com peptídeo C, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C.

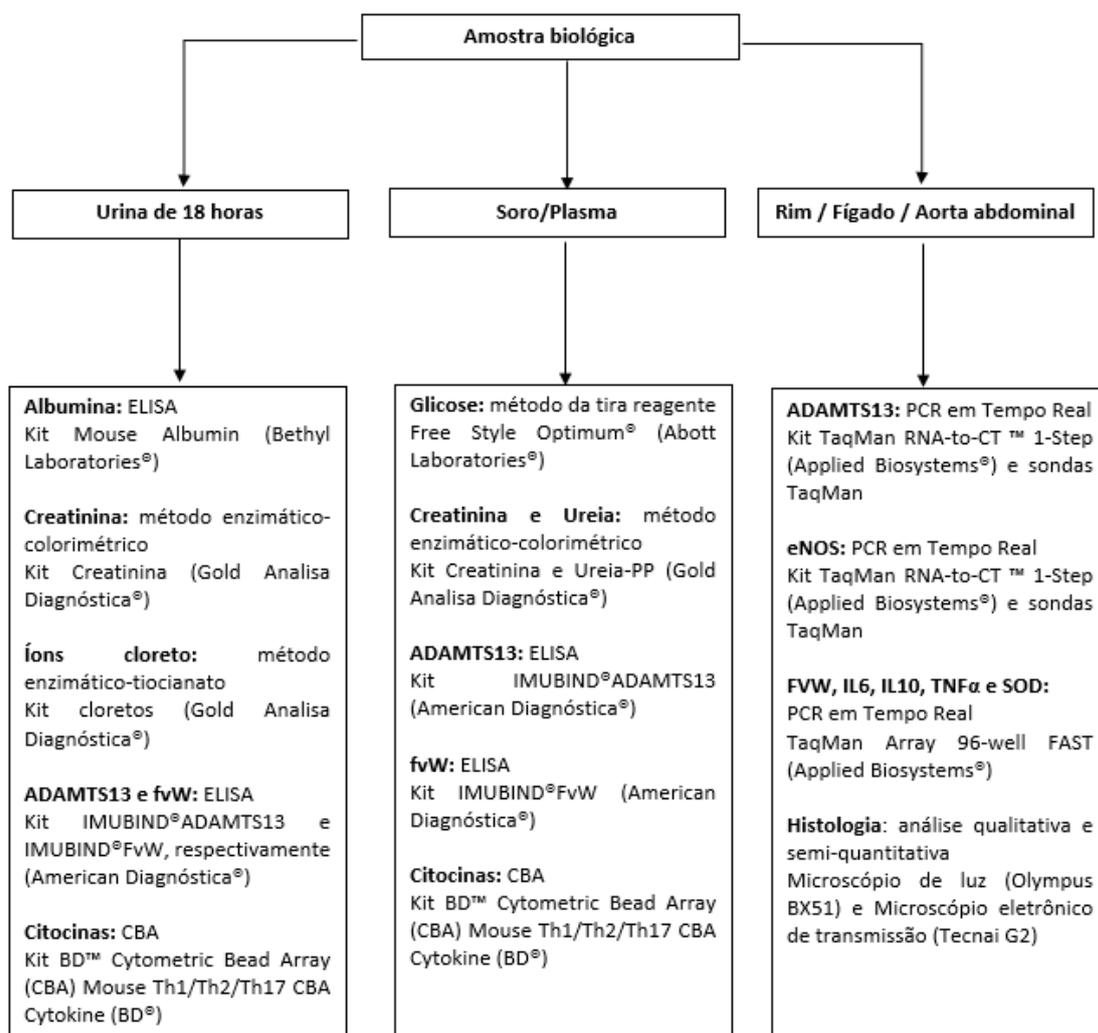


Figura 9 – Fluxograma das análises laboratoriais realizadas no estudo.

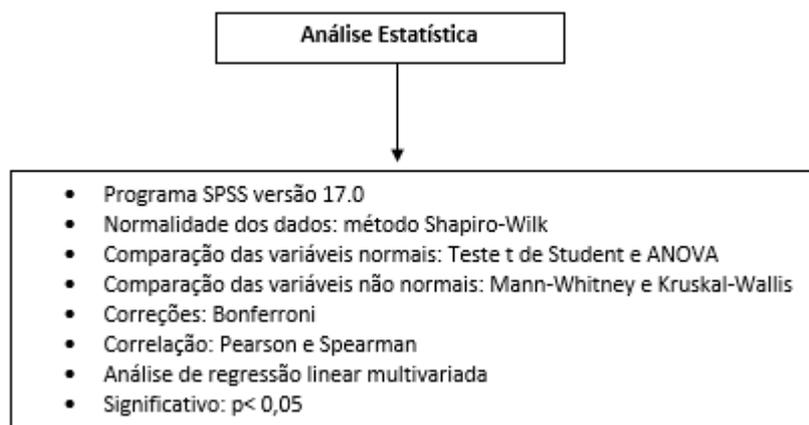


Figura 10 – Análises estatísticas realizadas no estudo.

O projeto seguiu todas as normas sob o ponto de vista ético estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFGM). A metodologia proposta foi aprovada segundo o protocolo 199/2012 (Anexo 1).

5.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, com idade inicial de 7 semanas e peso inicial médio de 20 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. O modelo foi desenvolvido com camundongos machos uma vez que, em geral, as fêmeas são menos susceptíveis à indução de diabetes por STZ. Após a retirada dos animais do Biotério Central, os mesmos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, em caixas contendo no máximo 5 roedores (sob ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*), até serem colocados em gaiolas metabólicas individuais quando, a partir de então, passaram a ser mantidos em caixas individuais. Após uma semana de ambientação (8 semanas de idade), os animais foram submetidos à administração de STZ, conforme descrito por Barutta *et al.* (2011). A porcentagem de animais que desenvolveram o diabetes em cada experimento foi de aproximadamente 80%, em concordância com estudos anteriores (Leiter, 1982; Gurley *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2013).

5.2 Grupos experimentais

Os camundongos com 8 semanas de idade foram divididos na parte 1 do estudo em grupos controle e diabético. Na parte 2, os animais foram divididos em controle tratado (CT) com peptídeo C, diabético não tratado (DN) e diabético tratado (DT) com peptídeo C (Figura 8). Os experimentos foram conduzidos em triplicata com n=3-4 animais por grupo. A disposição dos grupos experimentais encontra-se demonstrada na Figura 11. O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base nos valores médios de marcadores de função renal e glicemia, que foram obtidos de estudos semelhantes com camundongos diabéticos (média \pm desvio padrão). A

fórmula foi baseada no teste T entre dois grupos independentes, considerando-se potência=0,95; nível de significância = 0,05 (software G * Power versão 3.1.2, Universidade de Kiel, Alemanha).

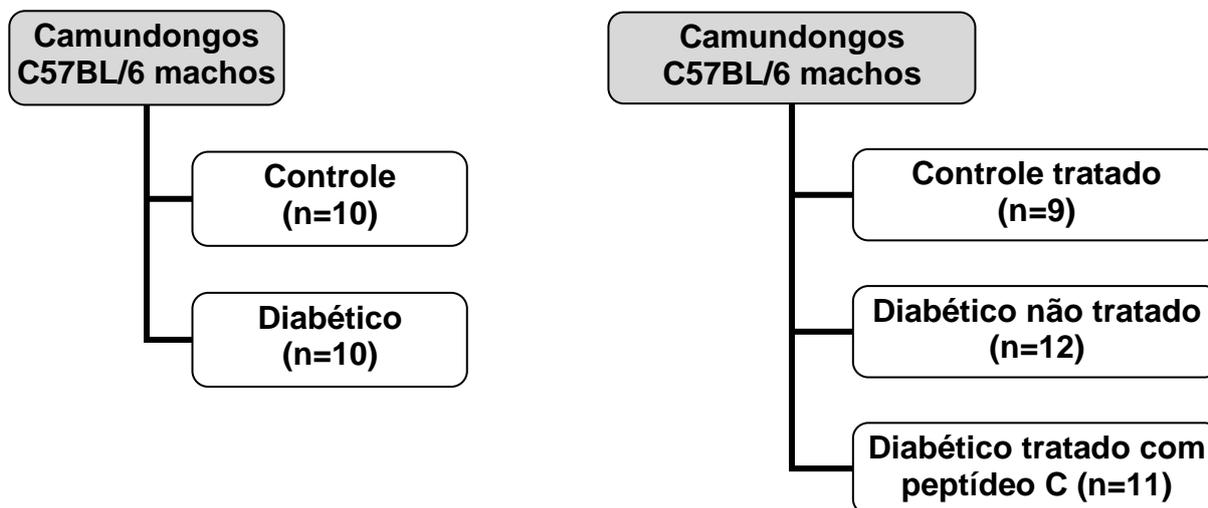


Figura 11 – Distribuição nos grupos experimentais na parte 1 (esquerda) e parte 2 (direita) do experimento. Na parte 1 do estudo, os animais foram divididos em grupos controle e diabético. Na parte 2, os animais foram divididos em controle tratado com peptídeo C, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C.

5.3 Delineamento do protocolo experimental

Na primeira etapa do estudo, os animais foram submetidos à jejum de 6 horas e o DM1 foi induzido por meio da administração intraperitoneal de 50 mg/Kg de STZ (Sigma[®]) em tampão citrato de sódio (0,1M, pH 4,5) durante 5 dias consecutivos (Figura 12). O diabetes foi confirmado pelos níveis de glicose no sangue maiores ou iguais a 250 mg/dL, 3 dias após a última dose de STZ. A avaliação da glicemia durante o experimento *in vivo* foi realizada por meio do glicosímetro Free Style Optium[®] (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.), a partir de um corte na veia da cauda. Os animais do grupo controle receberam apenas tampão citrato de sódio (0,1M, pH=4,5), os quais constituíram o grupo controle não diabético (Barutta *et al.*, 2011). Os animais foram monitorados durante 8 semanas até a eutanásia.

Na segunda etapa do projeto, o diabetes foi induzido nos camundongos de forma idêntica à primeira etapa. A confirmação do diabetes foi realizada novamente 4 semanas após a última dose de STZ a fim de verificar se os animais do grupo diabético continuavam hiperglicêmicos. Logo em seguida, foi iniciado o tratamento com peptídeo C na dose de 500 µg/kg/dia (GenScript®), dissolvido em solução salina, durante 4 semanas, por via subcutânea. O grupo diabético não tratado com peptídeo C recebeu apenas solução salina (Stevens *et al*, 2004; Sima *et al*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). A eutanásia dos animais foi realizada no dia seguinte à última dose de peptídeo C quando os animais já estavam diabéticos por 8 semanas.

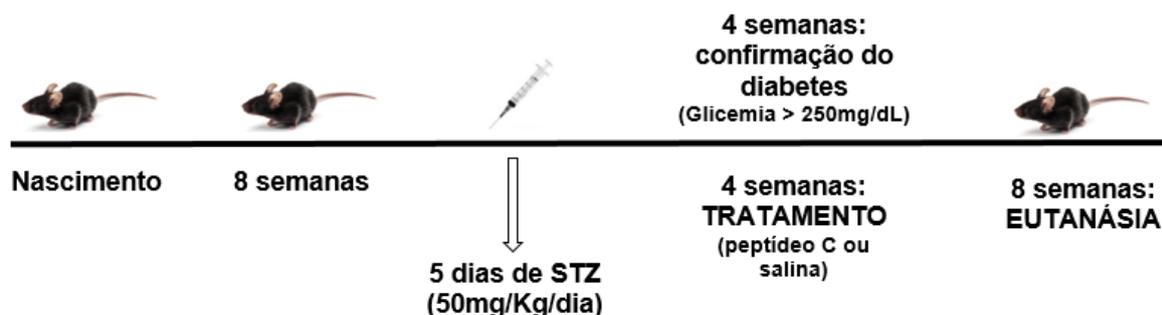


Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental do estudo. O diabetes foi induzido em camundongos C57BL/6 machos com 8 semanas de idade por meio da administração de estreptozotocina (STZ), por via intraperitoneal, na dose de 50mg/Kg/dia durante 5 dias consecutivos. Os animais do grupo controle receberam apenas tampão citrato de sódio. Três dias após a última dose de STZ o diabetes foi confirmado pelos níveis de glicemia maiores à 250 mg/dL. Quatro semanas após a última dose de STZ, a confirmação do diabetes foi realizada novamente e iniciou-se o tratamento com peptídeo C ou salina por 4 semanas, por via subcutânea. No dia seguinte à última dose de peptídeo C, os animais foram eutanasiados.

5.4 Parâmetros ponderais e metabólicos

A medida do peso corporal foi realizada antes das administrações de STZ, 4 e 8 semanas após a indução do diabetes, para todos os grupos experimentais. O peso renal relativo foi obtido dividindo-se o peso do rim direito do camundongo em

miligramas (mg) pelo peso corporal do mesmo animal em gramas (g). Foram avaliados os seguintes parâmetros metabólicos para cada grupo: ingestão de água e volume urinário de 18 horas. Para isso, antes do tratamento com STZ, três dias após o tratamento, e 4 e 8 semanas após a indução do diabetes, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas (Tecniplast®, Itália) individuais. Os animais permaneceram nas gaiolas por um período de 72 horas, com uma etapa de adaptação de 54 horas e etapa experimental nas 18 horas seguintes. Após o período experimental de 18 horas, a urina produzida foi recolhida, mensurada, centrifugada e armazenada em freezer -80°C para análises posteriores. O volume de água ingerido foi medido individualmente, assim como o peso corporal do animal ao ser retirado da gaiola metabólica.

5.5 Determinação dos níveis de glicose

A glicemia capilar foi medida após jejum de 5 horas utilizando-se o glicosímetro Free Style Optium® (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.), a partir de um corte na veia da cauda. A primeira dosagem foi realizada antes da indução do diabetes a fim de confirmar a normoglicemia dos animais. A segunda avaliação foi feita 3 dias após a administração da última dose de STZ para confirmação do sucesso na indução do diabetes. A terceira dosagem foi realizada 4 semanas após a indução (na etapa 2 do projeto – antes da administração do peptídeo C) e a última dosagem foi feita 1 dia antes da eutanásia (8 semanas após a indução do diabetes).

5.6 Obtenção das amostras e procedimento de eutanásia

Oito semanas após a indução do diabetes os camundongos foram eutanasiados. Todos os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal antes da eutanásia e da coleta de sangue, a qual foi realizada pela veia braquial. O sangue (aproximadamente 400 µL) foi recolhido em tubos do tipo *ependorf*, devidamente identificados, sem anticoagulante. A amostra foi centrifugada imediatamente a 10.000 g (3.000 RPM) por 15 minutos para obtenção do soro, que foi aliquoteado e armazenado à -80°C para análise de

creatinina, ureia e citocinas. Uma amostra composta por 45 µL de citrato de sódio e 400 µL de sangue total (1 parte de citrato por 9 partes de sangue) também foi obtida e centrifugada imediatamente a 10.000 g (3000 RPM) por 15 minutos, à 4°C para obtenção do plasma. O plasma foi aliquoteado e guardado em tubos do tipo *ependorf* à -80°C para realização dos testes de ELISA para ADAMTS13 e fvW.

Os animais anestesiados foram eutanasiados por deslocamento cervical e o rim direito, o fígado e a aorta abdominal foram retirados, armazenados em tubos do tipo *ependorf*, RNase free contendo solução RNAlater (Qiagen®), e armazenados à -80°C até a extração do RNA. O rim esquerdo foi retirado, pesado, armazenado em tubo do tipo *ependorf* contendo formol tamponado, ou solução karnovsky, e armazenado à temperatura ambiente para posterior confecção das lâminas para histologia.

5.7 Determinação dos níveis de fvW e de ADAMTS13

Foram quantificados os níveis plasmáticos e urinários de fvW e ADAMTS13 nos camundongos eutanasiados 8 semanas após a indução do diabetes (Figura 9) por ELISA de captura, utilizando-se os kits IMUBIND®FvW (American Diagnostica®) e IMUBIND®ADAMTS13, respectivamente (American Diagnostica®), de acordo com instruções dos fabricantes. Os níveis urinários foram expressos em relação à concentração de creatinina urinária obtida na mesma amostra de urina - nanogramas por miligrama de creatinina. Também foram expressos em nanogramas por mililitro em amostras de urina de 18 horas.

5.8 Avaliação da função renal

A avaliação da função renal foi realizada por meio da determinação dos níveis de ureia no soro, de creatinina no soro e na urina, do cálculo da depuração estimada de creatinina (DEC), da determinação dos níveis urinários de albumina e de cloretos. Nestas análises foram utilizadas amostras de urina de 18 horas.

A determinação dos níveis séricos de ureia foi realizada pelo método enzimático-colorimétrico, utilizando-se o kit diagnóstico Uréia-PP (Gold Analisa Diagnóstica®) (Figura 9). A determinação dos níveis séricos e urinários de creatinina foi feita pelo método colorimétrico de ponto final, utilizando-se o kit diagnóstico Creatinina (Gold Analisa Diagnóstica®). A avaliação dos níveis urinários de albumina foi realizada por ELISA de captura, utilizando-se o kit Mouse Albumin (Bethyl Laboratories®). Os íons cloretos foram determinados utilizando o kit Cloretos (Gold Analisa Diagnóstica®). O cálculo da depuração de creatinina foi estimado pela seguinte equação:

$$\text{DEC (mL/min)} = \frac{\text{creatinina na urina (mg/dL)} \times \text{volume urinário por min (mL/min)}}{\text{creatinina sérica (mg/dL)}}$$

5.9 Avaliação da expressão gênica da ADAMTS13 e eNOS

Após a eutanásia dos animais, o rim direito e o fígado foram removidos, recolheu-se entre 50 e 100 mg de cada órgão e os mesmos foram conservados no reagente de estabilização de RNA RNAlater (Qiagen®), com o objetivo de preservar a integridade do RNA tecidual. A aorta abdominal também foi removida e armazenada em RNAlater. Posteriormente, as amostras foram lisadas em homogeneizador (Omni International, TH®). O RNA foi extraído com TRIzol® (Ambion®), de acordo com recomendações do fabricante, e foram utilizadas amostras com razão 260/280 entre 1,9 e 2,1. O RNA foi quantificado utilizando-se o equipamento Nanovue®.

As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em Tempo Real foram realizadas em volume de 25 µL em placas de 48 poços (MicroAmp optical, Applied Biosystems) no equipamento StepOne System® (Applied Biosystems). As condições de amplificação utilizadas consistiram de transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, seguido de desnaturação a 95°C por 10 minutos, 60 ciclos a 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto. A transcrição reversa e a quantificação por PCR em Tempo Real foram feitas em uma única etapa com a utilização do TaqMan RNA-to-CT™ 1-Step Kit® (Applied Biosystems) e de sondas TaqMan® (éxons 28-29 da ADAMTS13 e

controle endógeno rRNA 18S) (Applied Biosystems®). Os níveis relativos de expressão da ADAMTS13 entre os grupos de camundongos foram calculados utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para a eNOS, a quantificação seguiu as etapas anteriores, sendo que também foram utilizadas sondas TaqMan (éxons 22-23 da eNOS e o controle endógeno rRNA 18S) (Applied Biosystems®). Os *primers* foram desenhados para uma região localizada entre dois éxons, evitando-se a amplificação de DNA genômico por eventual contaminação. As sequências exatas dos *primers* estão disponíveis no site da Applied Biosystems (número de identificação dos ensaios: primers Mm03928990_g1 para 18S; Mm01218030_g1 para ADAMTS13; e Mm00435217_m1 para eNOS). Para todas as reações, tomou-se uma amostra com concentração estimada, foi realizada a diluição seriada (5 pontos) e quantificou-se a expressão destas alíquotas para validar a correlação entre a fluorescência e o CT (*cycle threshold*). Para todas as curvas foi obtido um valor de correlação $r^2 \geq 0,98$, com uma eficiência entre 90 e 110%. Todas as análises foram feitas com amostras em triplicata.

5.10 Análise histológica do rim por microscopia ótica e eletrônica

O rim esquerdo foi pesado e, em seguida, armazenado em formol tamponado até a confecção das lâminas. O órgão foi embebido em parafina e, em seguida, cortado em secções consecutivas de 4 mm de espessura, as quais foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina eosina (HE).

Os cortes histológicos foram examinados sob um microscópio de luz (Olympus BX51®, Japão), em duplo-cego. Para avaliar o grau de lesão glomerular e tubular, foram avaliadas semi-quantitativamente secções coradas com PAS as quais foram graduados em uma escala de 0 a 5 (Lan *et al*, 1995; Silveira *et al*, 2013.). Vinte campos do córtex renal foram selecionados aleatoriamente para avaliar alterações tubulares (atrofia e vacuolização) e alterações intersticiais (fibrose e inflamação) e graduados de 0 a 5, como segue: (0) nenhum dano aparente; (1) inflamação e fibrose intersticial e atrofia tubular e vacuolização envolvendo 0-10% do córtex; (2) área de lesão entre 10-20% do córtex; (3) área de lesão entre 20-30% do córtex; (4) área de lesão entre 30-40% do córtex; e (5) lesões envolvendo 40-100% do córtex.

As lesões glomerulares (exsudativa e bem desenvolvida, proliferação mesangial e hipertrofia glomerular) foram avaliadas através do exame de pelo menos 15 glomérulos escolhidos aleatoriamente e classificados da seguinte forma: (0) nenhum dano aparente; (1) leve dano glomerular da matriz mesangial e / ou com hialinose e adesão focal envolvendo 10% dos glomérulos; (2) 10-20% de esclerose dos glomérulos; (3) 20-30% de esclerose dos glomérulos; (4) 30-40% de esclerose dos glomérulos; e (5) de 40-100% da esclerose dos glomérulos.

Para a determinação das alterações patológicas, foi utilizada ainda uma classificação histológica para nefropatia diabética, geralmente aplicada em humanos, conforme descrito por Tervaert *et al.* (2010). As secções de rim coradas com PAS foram classificadas para os danos glomerulares em quatro classes: I, nenhum dano ou apenas mudanças leves e não específicas evidenciadas pela microscopia de luz e espessamento da membrana basal glomerular isolado; II, expansão mesangial leve (IIa) ou grave (IIb) sem esclerose nodular (lesões de Kimmelstiel-Wilson); III, pelo menos um glomérulo com aumento nodular na matriz mesangial (Kimmelstiel-Wilson); IV, mais de 50% de esclerose glomerular global com outras evidências clínicas ou patológicas de que a esclerose é devido à nefropatia diabética. As lesões intersticiais foram avaliadas separadamente levando-se em consideração fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA), sendo classificada como: 0, sem IFTA; 1, IFTA presente em menos de 25%; 2, IFTA envolvendo 25-50%; 3, IFTA presente em mais de 50% do campo; e para inflamação intersticial, classificada como: 0, sem infiltrado intersticial; 1, presente apenas em torno de túbulos atroficos; e 2, infiltrado inflamatório também está presente em outras áreas. Além disso, as lesões vasculares foram avaliadas da seguinte maneira: hialinose arteriolar (0, não há hialinose arteriolar; 1, presença de uma arteriola com hialinose; 2, mais de uma arteriola com hialinose está presente) e arteriosclerose (0, sem espessamento da camada íntima; 1, o espessamento da camada íntima é inferior à espessura da camada média; 2, o espessamento da camada íntima é superior à espessura da camada média). Finalmente, foi avaliado se grandes vasos estavam presentes ou não com a seguinte classificação: sim / não.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, um pequeno fragmento do rim esquerdo foi armazenado, no momento da eutanásia, em solução karnovsky por 24

horas e, em seguida, em tampão cacodilato de sódio 0,1M. O material foi processado e colocado em resina para posterior obtenção de cortes ultrafinos. As seções dos tecidos foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2 Spirit Biotwin FEI®, 120kV) em aumento de 16.500x. A aquisição de imagens de pelo menos 5 diferentes alças capilares glomerulares do rim de 4 camundongos do grupo CT, 4 do grupo DN e 4 do grupo DT com peptídeo C foi realizada. Para cada imagem obtida, foram realizadas 10 medidas do diâmetro em toda a extensão da membrana basal glomerular e obtida uma média de cada imagem, utilizando-se o programa ImageJ®. A partir destas, foi obtida uma outra média que consistiu no valor do diâmetro da membrana basal do rim de cada animal. Como esta análise foi realizada por 2 observadores independentes, a média final da membrana basal glomerular consistiu na média destes dois observadores.

5.11 Avaliação dos níveis de citocinas

Os níveis séricos e urinários das citocinas IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, TNF α e IFN γ foram avaliados por meio de CBA (*Cytometric Bead Array*) utilizando-se o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 CBA Cytokine, no equipamento BD FACSVerser™, de acordo com recomendações do fabricante. O software de análise utilizado foi o FCAP Array v.3. Para todas as curvas foi obtido um valor de correlação $r^2 \geq 0,99$ e os resultados foram expressos em pg/mL. Nestas análises foram utilizadas amostras de urina e soro obtidas conforme descrito nos itens 5.4 e 5.6, respectivamente. Estas amostras não foram diluídas, nem passaram por preparo diferenciado para análise por CBA. A razão entre os níveis de interleucina sérica e urinária foi obtida dividindo-se os níveis da interleucina no soro, em pg/mL, pelos níveis da mesma na urina, também em pg/mL.

5.12 Avaliação da expressão gênica do FVW, SOD e citocinas

A expressão gênica listada a seguir também foi avaliada: FVW, IL6, IL10 e TNF α e SOD. Para isso, foi utilizada uma placa TaqMan Array 96 – Well FAST, customizada para este projeto, na qual todas as reações foram feitas em duplicata, e o Δ CT

obtido pela comparação com dois genes de referência –18S e GAPDH. As reações de PCR foram realizadas em volume de 10 µL em placas de 96 poços (MicroAmp optical, Applied Biosystems) no equipamento QuantStudio3® (Applied Biosystems).

As condições de amplificação utilizadas consistiram de transcrição reversa a 25°C por 10 minutos, seguido de 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos, utilizando-se a enzima SuperScript™ VILO™ MasterMix (Invitrogen). A quantificação por PCR em Tempo Real consistiu de 50°C por 2 minutos, seguido de desnaturação a 95°C por 10 minutos, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando-se o kit Universal Master Mix II, With UNG (Applied Biosystems). Os níveis relativos de expressão gênica entre os grupos de camundongos foram calculados utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$. Em todas as análises de expressão gênica, quantificação relativa, considerou-se como aumentada a expressão no mínimo 2 x maior que a expressão do calibrador.

5.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico SPSS versão 17.0. Os dados que apresentaram distribuição normal por meio do teste Shapiro-Wilk foram apresentados com média \pm desvio padrão e foi empregado o teste t de Student para a comparação entre dois grupos. Para os que não apresentaram, foi empregado o método de Mann-Whitney e a apresentação foi realizada por meio de mediana (intervalo interquartilico). Para fazer comparações entre três grupos, foi utilizado o método ANOVA ou Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni para as variáveis paramétricas e não-paramétricas, respectivamente. A investigação de correlação entre os parâmetros avaliados foi realizada pelo método de Pearson ou Spearman, considerando-se os dados dos grupos diabético e controle juntos. Uma análise de regressão linear multivariada foi aplicada para identificar as variáveis independentemente associadas aos níveis de ADAMTS13 urinária. Para isto, selecionou-se as variáveis com valor p <0,2 na análise univariada. Foi considerado significativo o valor p < 0,05 (Figura 10).

6. RESULTADOS

6.1 Aspectos metabólicos, renais e hemostáticos no modelo animal de diabetes mellitus tipo 1

6.1.1 Caracterização do modelo experimental de DM1

Inicialmente, foi realizado um teste com um grupo piloto composto por 4 animais do grupo controle e 4 diabéticos. O grupo diabético apresentou hiperglicemia, confirmada pelos níveis de glicose superiores à 250 mg/dL, glicosúria positiva (medida pelo teste de tira reagente), aumento no volume urinário e menor peso corporal quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Também foi avaliada a função renal por meio da creatinúria, antes da indução do diabetes, três dias após a última administração de STZ e um dia antes da eutanásia. Foi observado aumento na excreção de creatinina urinária apenas no grupo diabético, quando comparada a creatinúria antes e depois da indução do diabetes, bem como antes e no dia anterior a eutanásia ($p < 0,001$) (tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação da função renal por meio da creatinúria (mg/18 horas), em três momentos diferentes (antes da indução do diabetes, três dias depois e um dia antes da eutanásia)

	Antes	Depois	Eutanásia	p
Controle (n=4)¹	0,77 ± 0,20	0,85 ± 0,14	0,86 ± 0,09	0,657
Diabético (n=4)¹	0,66 ± 0,12 ^{ab}	1,86 ± 0,93	2,64 ± 0,78	0,001*
Valor p	0,365	0,043*	0,007*	

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. ^a Diferença significativa antes e depois; ^b Diferença significativa antes e na eutanásia. * Valor p significativo < 0,05.

Ainda, os grupos controle e diabético não apresentaram em relação à creatinúria diferenças quando comparados antes da indução do diabetes ($p > 0,05$). Três dias depois da indução do diabetes e um dia antes da eutanásia, o grupo diabético

apresentou níveis de creatinina urinária significativamente superiores ao grupo controle ($p=0,043$ e $0,007$, respectivamente). Esses resultados mostraram que o modelo animal de diabetes estava adequado e, então, a caracterização do modelo foi realizada em grupo amostral maior, com 10 animais do grupo controle e 10 diabéticos.

6.1.1.1 Caracterização bioquímica

Antes do tratamento com STZ, os valores de glicemia e peso corporal dos grupos estudados foram similares ($P>0,05$), conforme esperado, não sendo encontrada diferença significativa entre os mesmos. Os animais também consumiram quantidades similares de água e comida. O diabetes foi confirmado três dias após a última dose de STZ, pela presença de hiperglicemia. No dia anterior à eutanásia, a glicemia dos animais foi aferida novamente pelo mesmo processo, a fim de confirmar se os animais diabéticos continuavam hiperglicêmicos, enquanto os controles permaneceram normoglicêmicos. Os animais que apresentaram glicemia inferior à 250 mg/dL foram excluídos do estudo. A Tabela 2 mostra os valores de glicemia capilar encontrados para cada grupo, bem como os parâmetros obtidos a partir da utilização das gaiolas metabólicas no dia anterior à eutanásia.

Tabela 2 – Medidas descritivas para os grupos controle e diabético obtidas no dia anterior à eutanásia.

	Controle (n=10)	Diabético (n=10)	p
Glicemia (mg/dL) ¹	147,3 ± 27,8	432,4 ± 62,7	<0,001*
Volume de urina (mL) ¹	1,52 ± 0,61	20,25 ± 7,46	<0,001*
Peso corporal (g) ¹	25,45 ± 1,07	20,10 ± 1,66	<0,001*
Ingesta hídrica (mL) ¹	6,56 ± 3,79	27,36 ± 10,48	<0,001*

1 – média e desvio-padrão. Test t-Student. *Valor p significativo <0,05.

Foi encontrada diferença significativa entre os grupos para todos esses parâmetros ($p < 0,001$), sendo a glicemia, volume urinário e ingesta hídrica maior, e peso corporal menor no grupo caso quando comparado ao controle. Embora tenham sido apenas dados observacionais, pode-se afirmar que o grupo diabético também apresentou polifagia e aumento da excreção de fezes. Essas características foram observadas a partir do terceiro dia após a indução do diabetes e permaneceram até o dia da eutanásia. Nos animais diabéticos, foi ainda observada glicosúria positiva (medida pelo teste de tira reagente) em todos os animais, sendo que nenhum animal do grupo controle apresentou positividade para este parâmetro.

6.1.1.2 Avaliação da função renal

O grupo diabético apresentou hiperfiltração, evidenciada por níveis elevados de albumina na urina ($p < 0,001$). Contudo, não houve diferença significativa nos níveis de creatinina e ureia séricas, bem como na DEC, quando comparados os grupos estudados ($p > 0,05$). A excreção de cloreto também foi significativamente superior no grupo diabético em relação ao grupo controle ($p = 0,001$). O peso renal relativo (peso do rim/peso corporal) foi superior no grupo diabético quando comparado ao grupo controle, no entanto, a diferença não foi significativa ($p = 0,104$). Observou-se uma maior perda urinária de creatinina no grupo diabético quando comparado ao controle, contudo não foi significativo ($p = 0,051$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação dos parâmetros para avaliação da função renal entre os grupos diabético e controle.

	Controle (n=10)	Diabético (n=10)	p
Ureia sérica (mg/dL) ¹	69,05 ±10,48	59,69 ± 9,23	0,065
Creatinina sérica (mg/dL) ¹	0,48 ± 0,24	0,37 ± 0,24	0,381
Creatinúria (mg/18h) ²	1,11 (0,35)	4,49 (3,73)	0,051
DEC (mL/min) ¹	0,50 ± 0,78	0,76 ± 0,48	0,454
Microalbuminúria (µg/18horas) ¹	32,99 ± 10,80	131,11 ± 24,68	<0,001*
Peso renal relativo (mg/g peso corporal) ²	0,67 (0,10)	0,73 (0,17)	0,104
Cloreto (meq/18h) ¹	0,41 ± 0,05	0,78 ± 0,18	<0,001*

1 – média e desvio-padrão – Teste t-Student; 2 – mediana e intervalo interquartilício – Mann Whitney. *Valor p significativo < 0,05. DEC - depuração estimada de creatinina.

6.1.2 Níveis de fvW e ADAMTS13 nos grupos controle e diabético

Os níveis urinários da ADAMTS13 foram dosados apenas no grupo diabético antes da indução da doença, 30 dias após e 1 dia antes da eutanásia, a fim de avaliar a perda desta proteína ao longo da evolução do DM1 (Tabela 4). Este grupo apresentou aumento significativo na perda urinária de ADAMTS13, quando comparado aos níveis desta proteína na urina antes da indução do diabetes e 30 dias depois da administração de STZ, bem como antes e no dia anterior à eutanásia (p=0,033). Contudo, não foram observadas diferenças significativas na excreção urinária de ADAMTS13 quando comparados os níveis desta proteína 30 dias depois da indução do diabetes e na eutanásia (p>0,05).

Tabela 4 – Avaliação dos níveis urinários da ADAMTS13 (ng/18 horas) no grupo diabético não tratado em três momentos diferentes (antes da indução do diabetes, trinta dias depois e um dia antes da eutanásia)

	Antes	Depois	Eutanásia	p
Diabético (n=6)¹	1,77 ± 0,68 ^{a b}	22,89 ± 9,33	31,01 ± 16,14	0,033*

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. ^a Diferença significativa antes e depois; ^b Diferença significativa antes e na eutanásia, p<0,01. * Valor p significativo < 0,05.

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos para ADAMTS13 no plasma e na urina, bem como os níveis plasmáticos de fvW nos grupos controle e diabético. Cumpre ressaltar que não foram detectados níveis de fvW na urina em ambos os grupos.

Tabela 5 – Medidas descritivas para ADAMTS13 plasmática e urinária e fator de von Willebrand plasmático entre os grupos diabético e controle.

	Controle (n=10)	Diabético (n=10)	p
ADAMTS13 (ng/mL) plasma²	474,16 (362,32)	317,24 (440,72)	0,266
ADAMTS13 (ng/mL) urina¹	4,56 ± 3,56	14,94 ± 5,57	0,001*
ADAMTS13 (ng/18 horas) urina²	6,49 (5,21)	493,51 (467,40)	0,014*
ADAMTS13 (ng/mg Cr)¹	7,71 ± 5,66	53,17 ± 17,40	0,001*
fvW (mU/mL)¹	68,00 ± 33,81	50,88 ± 30,77	0,370

1 – média e desvio-padrão – Teste t-Student; 2 – mediana e intervalo interquartilico – Mann Whitney. *Valor de p significativo <0,05. Cr, creatinina; fvW, fator de von Willebrand.

Não foi observada diferença significativa entre os níveis de ADAMTS13 no plasma quando comparados os grupos controle e diabético ($p=0,266$). Entretanto, os níveis de ADAMTS13 urinários foram significativamente superiores no grupo diabético ($p=0,001$) quando comparado ao grupo controle. Essa diferença também foi significativa quando os níveis desse marcador foram corrigidos (normalizados) pelo volume de urina de 18 horas e pela excreção de creatinina urinária (ng/mg Cr). Para os níveis plasmáticos do fvW não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p=0,370$).

Considerando-se os dados dos grupos diabético e controle juntos, as análises de correlação de maior relevância clínica estão representadas na Tabela 6. A glicemia apresentou correlação positiva com ADAMTS13 na urina, expressa em nanograma por miligrama de creatinina ($p<0,001$). Foi também observada correlação positiva entre os níveis de ADAMTS13 na urina e a microalbuminúria ($p=0,001$). No entanto, essa variável não apresentou correlação com os níveis plasmáticos de fvW e ADAMTS13 ($p>0,05$). O fvW não apresentou correlação com as variáveis analisadas.

Tabela 6 – Variáveis correlacionadas com os níveis de ADAMTS13 na urina em nanograma por miligrama de creatinina nos grupos diabético e controle.

Variável dependente	Variável independente	r	p
ADAMTS13 urina (ng/mg Cr)	Microalbuminúria (18h) ¹	0,820	0,001*
	fvW (mU/mL) ¹	-0,150	0,609
	ADAMTS13 plasma (mg/mL) ²	-0,314	0,274
	Glicemia (mg/dL) ¹	0,901	<0,001*

1 – Correlação de Pearson; 2 – Correlação de Spearman. *Valor p significativo <0,05. Cr, creatinina; fvW, fator de von Willebrand.

A análise de regressão linear revelou que as variáveis associadas independentemente aos níveis urinários de ADAMTS13 são microalbuminúria ($p=0,001$, $\beta=4,79$) e glicemia ($p<0,001$, $\beta=6,57$).

6.1.3 Avaliação da expressão renal e hepática da ADAMTS13 e endotelial do FVW

Por meio da PCR em tempo real e quantificação relativa (utilizando como normalizador o gene 18S que possui níveis de expressão gênica semelhantes no tecido renal e hepático), constatou-se maior expressão gênica de ADAMTS13 no fígado quando comparado ao rim em ambos os grupos ($p < 0,05$). Quando a comparação foi realizada entre os grupos, foi observada expressão gênica hepática maior (2,53x) no grupo diabético quando comparado ao grupo controle. Esta diferença não foi observada quando comparada à expressão da ADAMTS13 no rim (1,00x) entre os grupos (Figura 13). Com relação à expressão na aorta abdominal do FVW foi observada expressão maior (2,20x) no grupo diabético quando comparada ao grupo controle (Figura 14).

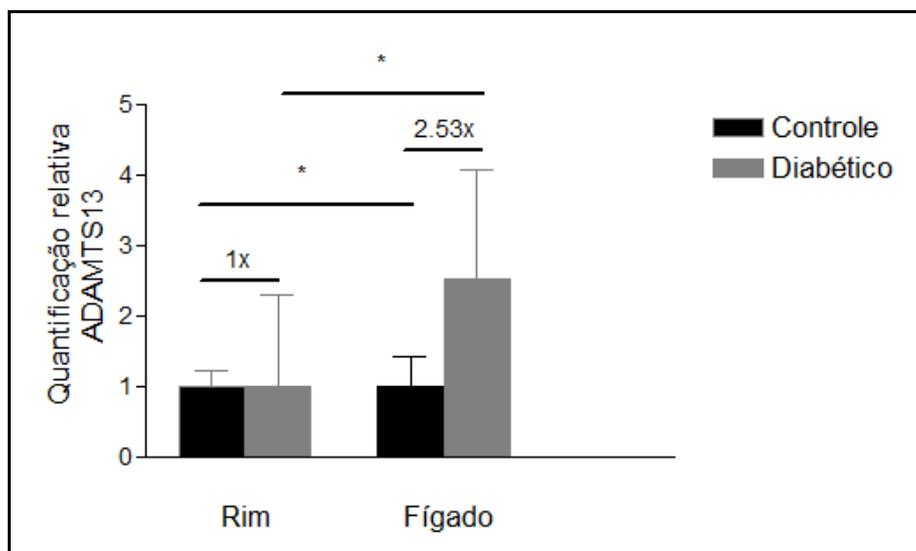


Figura 13 – Quantificação relativa da ADAMTS13 no rim e no fígado dos grupos controle e diabético. A expressão da ADAMTS13 foi maior no fígado quando comparada ao rim em cada grupo ($p < 0,05$). No fígado, a expressão da ADAMTS13 foi maior (2,53x) nos animais diabéticos quando comparada aos controles, entretanto não houve diferença na expressão no tecido renal quando comparados os grupos diabético e controle (1,00x). *Valor de p significativo $< 0,05$.

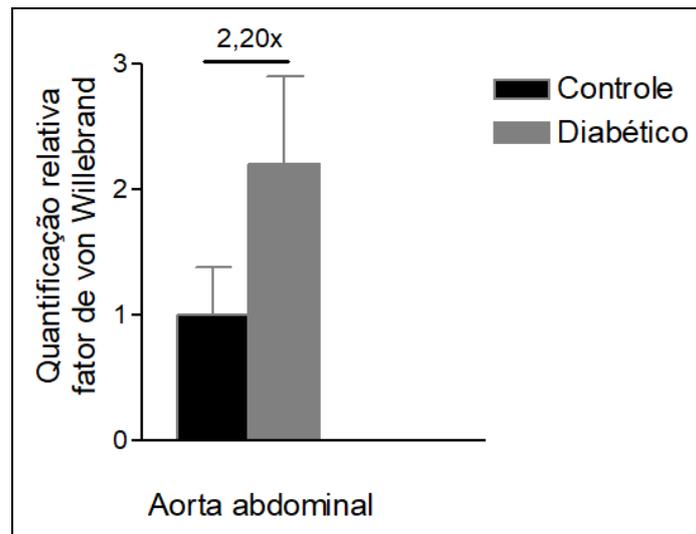


Figura 14 – Quantificação relativa do fator de von willebrand (FVW) na aorta abdominal dos grupos controle e diabético. A expressão do FVW foi maior (2,20x) nos animais diabéticos quando comparada aos controles.

6.2 O efeito do peptídeo C nos parâmetros metabólicos, renais, hemostáticos, inflamatórios e no estresse oxidativo no modelo animal de diabetes mellitus tipo 1

6.2.1 Efeito do peptídeo C sobre a glicemia, o peso e a função renal

Para examinar se o peptídeo C tem efeito sobre a glicemia e o peso corporal dos animais, estes parâmetros foram avaliados nos grupos estudados (CT, DN e DT com peptídeo C) em três momentos diferentes (Tabelas 7 e 8). Antes da indução do diabetes, os valores de glicemia e peso corporal dos grupos estudados foram similares, conforme esperado, não sendo encontrada diferença significativa entre eles. Trinta dias após a indução do diabetes (1 dia antes do início da administração do peptídeo C), a glicemia dos animais foi aferida novamente, a fim de confirmar os níveis glicêmicos elevados dos animais diabéticos e a normoglicemia do grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação da glicemia (mg/dL) dos grupos testados em três momentos diferentes (antes da indução do diabetes, trinta dias depois e um dia antes da eutanásia)

	Antes	Depois	Eutanásia	p
CT (n=9)¹	192,50 ± 7,40	204,50 ± 15,89 [‡] ^ψ	180,33 ± 47,81 [‡] ^ψ	0,241
DN (n=12)¹	177,50 ± 26,86 ^{a,b}	392,00 ± 83,93	380,00 ± 63,29	<0,001*
DT (n=11)¹	148,33 ± 14,57 ^{a,b}	426,33 ± 84,72	388,67 ± 80,64	<0,001*
Valor p	0,100	<0,001*	0,002*	

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. [‡] Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético. ^ψ Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético tratado. p<0,01. ^a Diferença significativa antes e depois; ^b Diferença significativa antes e na eutanásia. CT: controle tratado com peptídeo C; DN: diabético não tratado com peptídeo C; DT: diabético tratado com peptídeo C. * Valor p significativo < 0,05.

Os animais diabéticos que apresentaram glicemia inferior a 250 mg/dL foram excluídos do estudo. Os animais dos grupos DN e DT apresentaram níveis de glicemia significativamente superiores quando comparados ao grupo CT, mensurados 30 dias após a indução do diabetes ($p < 0,001$). Com relação ao peso corporal, os animais do grupo CT ganharam peso em comparação aos grupos DN e DT, no mesmo período de avaliação ($p = 0,003$).

Após o tratamento com peptídeo C e um dia antes da eutanásia, a glicemia e o peso dos animais foram aferidos novamente a fim de avaliar o efeito do peptídeo C. Os níveis glicêmicos dos DN e DT permaneceram significativamente superiores aos níveis do grupo controle tratado ($p = 0,002$), enquanto o peso corporal se manteve significativamente inferior ($p = 0,002$). No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos DN e DT com peptídeo C com relação à glicemia e ao peso corporal ($p > 0,05$) na eutanásia (Tabelas 7 e 8)

Ao longo do experimento, foi possível observar que os animais do grupo CT se mantiveram normoglicêmicos, enquanto os dos grupos DN e DT apresentaram aumento da glicemia, quando comparados antes e 30 dias após a indução do diabetes ($p < 0,001$ para ambos os grupos). No entanto, não houve diferença significativa quando os grupos DN e DT foram comparados 30 dias após a indução do diabetes (1 dias antes do início do tratamento com o peptídeo C) e na eutanásia (30 dias após o início do tratamento com peptídeo C) ($p > 0,05$). O peptídeo C também não apresentou efeito sobre o peso corporal nos animais diabéticos, uma vez que não houve ganho significativo de peso após o tratamento com o peptídeo ($p > 0,05$) (Tabelas 7 e 8).

Tabela 8 – Avaliação do peso (g) dos grupos testados em três momentos diferentes (antes da indução do diabetes, trinta dias depois e um dia antes da eutanásia)

	Antes	Depois	Eutanásia	p
CT (n=9)¹	20,42 ± 0,92 ^{a, b}	24,92 ± 0,86 ^{‡ Ψ}	25,25 ± 0,76 ^{‡ Ψ}	<0,001*
DN (n=12)¹	22,12 ± 0,63	23,75 ± 0,65	24,50 ± 0,71	0,570
DT (n=11)¹	20,50 ± 1,00	21,33 ± 3,05	22,50 ± 3,50	0,925
Valor de p	0,352	0,003*	0,002*	

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. ‡ Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético. Ψ Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético tratado, p<0,01. ^a Diferença significativa antes e depois; ^b Diferença significativa antes e na eutanásia. CT: controle tratado com peptídeo C; DN: diabético não tratado com peptídeo C; DT: diabético tratado com peptídeo C. * Valor p significativo < 0,05.

Antes da indução do diabetes, trinta dias após a última dose de STZ (1 dia antes do início do tratamento com peptídeo C) e um dia antes da eutanásia, foi realizada a coleta de urina para a dosagem de microalbuminúria no grupo composto por 6 animais do grupo CT, 7 animais do grupo DN e 7 animais do grupo DT (Tabela 9). Antes da eutanásia, não foi observada diferença significativa entre os grupos CT, DN e DT (p>0,05). Contudo, 30 dias após a indução do diabetes e na eutanásia, foi observado aumento na excreção de albumina urinária nos grupos DN e DT quando comparada ao grupo CT (p=0,005 e 0,014, respectivamente). Avaliando apenas o grupo CT, não foram observadas diferenças significativas na excreção de albumina urinária ao longo do experimento (p=0,103). Entretanto, no grupo DN e DT, foi observada diferença significava na microalbuminúria quando comparados os níveis antes da indução do diabetes e na eutanásia, bem como 30 dias depois da indução do diabetes e na eutanásia (p=0,005 e 0,049, respectivamente). Para ambos os grupos não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de albumina na urina antes da indução do diabetes e na eutanásia (p>0,05).

Tabela 9 – Avaliação da função renal por meio da microalbuminúria ($\mu\text{g}/18\text{horas}$) dos grupos controle tratado, diabético não-tratado e diabético tratado em três momentos diferentes (antes da indução do diabetes, trinta dias depois e um dia antes da eutanásia)

	Antes	Depois	Eutanásia	p
CT (n=6)¹	25,54 \pm 8,03	14,93 \pm 4,03 ^{‡, Ψ}	14,48 \pm 3,14 ^{‡, Ψ}	0,103
DN (n=7)¹	21,18 \pm 6,97 ^b	32,05 \pm 9,55 ^c	48,54 \pm 20,38	0,005*
DT (n=7)¹	31,19 \pm 11,68 ^b	31,95 \pm 11,29 ^c	53,94 \pm 36,33	0,049*
Valor p	0,209	0,005*	0,014*	

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. [‡]Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético. ^{Ψ} Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético tratado, $p < 0,01$. ^b Diferença significativa antes e na eutanásia;. ^c Diferença significativa depois e na eutanásia. CT: controle tratado com peptídeo C; DN: diabético não tratado com peptídeo C; DT: diabético tratado com peptídeo C. * Valor p significativo $< 0,05$.

Após a eutanásia, nos animais DN e DT com peptídeo C foram observados, além de hiperglicemia, menor peso corporal e microalbuminúria, aumento no volume de urina e de água ingerida, bem como maiores níveis urinários de creatinina quando comparados ao grupo CT ($p < 0,05$ para todos estes parâmetros, Tabela 10). Não houve diferença significativa para os parâmetros avaliados, quando comparados os grupos DN e DT com peptídeo C ($p > 0,05$).

Tabela 10 – Parâmetros avaliados para os grupos controle tratado com peptídeo C, diabético não-tratado e diabético tratado com peptídeo-C após eutanásia

	CT (n=9)	DN (n=12)	DT (n=11)	p
Volume urinário (mL/18h)²	2,00 (1,00) ^{‡, Ψ}	21,00 (16,00)	21,00 (10,00)	0,001*
Volume de água ingerido (mL/18h)²	6,00 (1,00) ^{‡, Ψ}	26,00 (22,00)	29,00 (10,00)	<0,001*
Creatinina urinária (mg/dL)²	6,80 (2,24) ^{‡, Ψ}	1,46 (0,77)	1,25 (0,90)	<0,001*
Creatinina urinária (mg/18h)¹	0,13 ± 0,02 [‡]	0,26 ± 0,11	0,20 ± 0,06	0,021*

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. 2 – mediana (intervalo interquartilício) – Kruskal, seguido de Mann-Whitney e correção de Bonferroni. ^{*}Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético não-tratado. [‡]Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético tratado. CT: controle tratado com peptídeo C; DN: diabético não tratado com peptídeo C; DT: diabético tratado com peptídeo C. * Valor p significativo < 0,05

6.2.2 Caracterização histológica do rim

As análises histopatológicas das lâminas dos rins de camundongos CT, DN e DT com peptídeo C, por meio de microscopia óptica não apresentaram alterações sendo classificadas como: zero (0) para lesões tubulares (atrofia e vacuolização); zero (0) para danos intersticiais (fibrose e inflamação) e zero (0) para lesões glomerulares (Figura 15). Os cortes histológicos dos rins dos grupos CT, DN e DT ainda foram classificados como: I (um) para lesões glomerulares (nenhum dano ou apenas mudanças leves e não específicas evidenciadas pela microscopia de luz e

espessamento da membrana basal glomerular isolado); zero (0) para IFTA e inflamação intersticial; zero (0) para hialinose arteriolar e arteriosclerose; e não foram evidenciados grandes vasos.

A microscopia eletrônica revelou glomérulos com estrutura preservada, com membranas basais de composição habitual, sem espessamento ou aumento da matriz mesangial. Não houve diferença significativa na espessura da membrana basal glomerular quando comparados os grupos CT ($163,84 \pm 22,53$ nm), DN ($167,51 \pm 4,04$ nm) e DT ($179,19 \pm 16,86$ nm; $p > 0,05$). Os podócitos exibiram arquitetura geral preservada em todos os grupos (Figura 15).

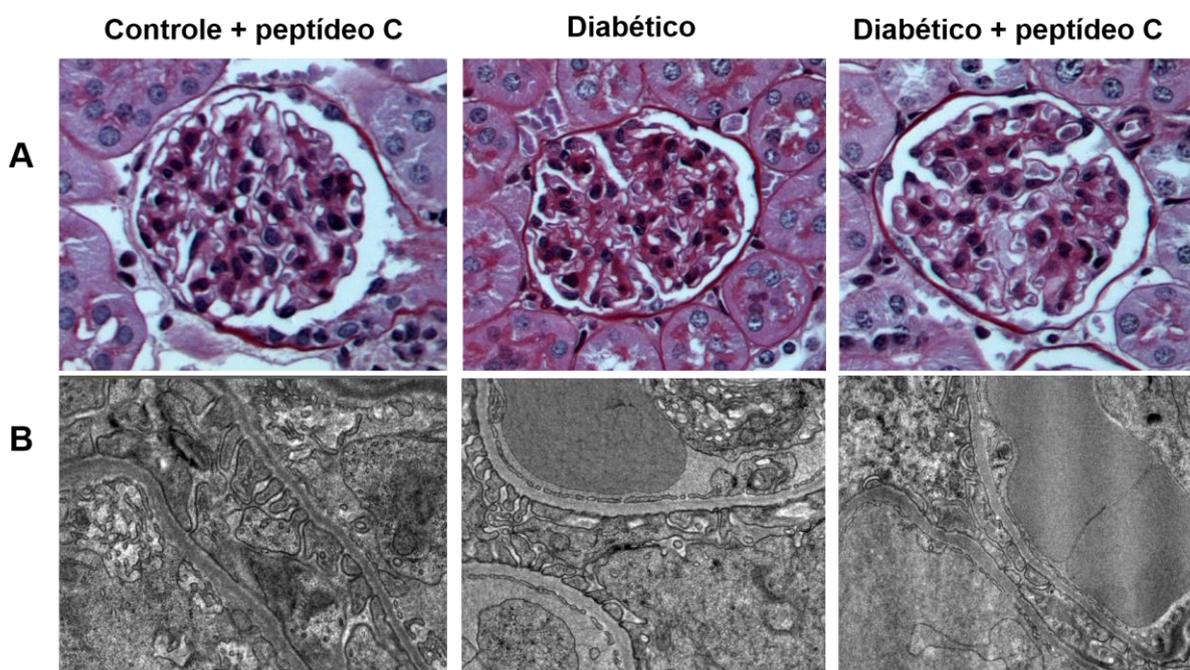


Figura 15 – Fotomicrografia em microscopia ótica (A) e eletrônica (B) mostrando rim de camundongo dos grupos controle tratado com peptídeo C, diabético e diabético tratado com peptídeo C. A) Glomérulo de camundongo dos grupos controle tratado, diabético e diabético tratado com peptídeo C apresentando matriz e celularidade mesangiais dentro dos limites da normalidade. Espaço túbulo-intersticial bem preservado, sem sinais de fibrose, atrofia e inflamação (coloração PAS, aumento 400x). B) Glomérulo de camundongo dos grupos controle tratado, diabético e diabético tratado apresentando estrutura preservada, ausência de expansão da matriz mesangial e espessamento da membrana basal. Não foi observada perda da estrutura original dos podócitos (aumento de 16.500x).

6.2.3 Efeito do peptídeo C sobre os níveis de fvW e ADAMTS13

Não foi observada diferença significativa entre os níveis plasmáticos de fvW e ADAMTS13 nos grupos CT, DN e DT, nas amostras coletadas após eutanásia ($p=0,100$ e $0,867$, respectivamente). Já os níveis urinários de ADAMTS13 foram significativamente superiores nos DN e DT, quando comparado ao grupo CT ($p=0,003$). Contudo, não foi observada diferença significativa nos níveis urinários de ADAMTS13 entre os grupos DN e DT com peptídeo C ($p>0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Avaliação dos níveis plasmáticos de fvW e dos níveis plasmáticos e urinários de ADAMTS13 nos grupos estudados

	CT (n=9)	DN (n=10)	DT (n=10)	p
ADAMTS13 plasmática (ng/mL)¹	3,94 ± 0,28	5,29 ± 1,43	5,74 ± 2,00	0,100
ADAMTS13 urinária (ng/mL)¹	1,26 ± 0,29	1,52 ± 0,42	1,36 ± 0,38	0,370
ADAMTS13 urinária (ng/18 horas)¹	2,41 ± 0,54 †, Ψ	25,32 ± 17,09	28,16 ± 17,81	0,005*
ADAMTS13 urinária (ng/mg cr)¹	18,53 ± 4,44 †, Ψ	96,41 ± 55,99	115,60 ± 67,01	0,003*
fvW plasmático (mU/mL)¹	5,19 ± 5,41	4,04 ± 4,43	5,69 ± 7,34	0,867

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. †Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético não-tratado. ΨDiferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético tratado. CT: controle tratado com peptídeo C; DN: diabético não tratado com peptídeo C; DT: diabético tratado com peptídeo C. * Valor p significativo < 0,05. Abreviações: Cr, creatinina; fvW, fator de von Willebrand.

6.2.4 Expressão gênica do FVW, da ADAMTS13 e da eNOS

Por meio da PCR em tempo real e quantificação relativa, constatou-se uma expressão gênica endotelial do FVW maior (3,52x) no grupo DN, quando comparado ao grupo CT. O grupo DT com peptídeo C também apresentou uma expressão maior (3,31x) do que o grupo CT. Entretanto, a diferença de expressão do FVW entre os grupos DN e DT com peptídeo C foi de apenas 1,06x (Figura 16).

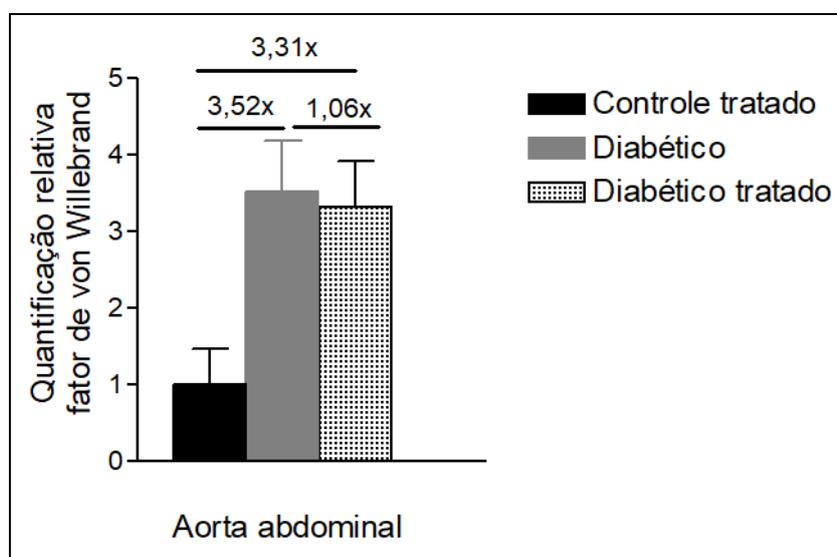


Figura 16 – Avaliação da expressão gênica do fator de von Willebrand (FVW) nos grupos controle tratado, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C após 8 semanas de diabetes. A expressão do FVW foi maior (3,52x) nos animais diabéticos e diabéticos tratados (3,31x) quando comparada aos controles tratados com peptídeo C. Entre os grupos diabéticos a diferença de expressão foi de 1,06x.

Com relação à expressão da ADAMTS13 no rim, foi observado que a expressão no grupo DN foi apenas 1,32x maior que o CT. No entanto, esta mesma expressão foi 2,90x maior no grupo DT quando comparada ao grupo CT (Figura 17). A expressão renal no grupo DT foi ainda 2,17x maior do que a do grupo DN. Já a expressão hepática de ADAMTS13 foi maior (2,22x) no grupo DN e no grupo DT (2,90x) quando comparada ao grupo CT, enquanto a expressão no grupo DT em relação ao grupo DN foi semelhante (1,32x).

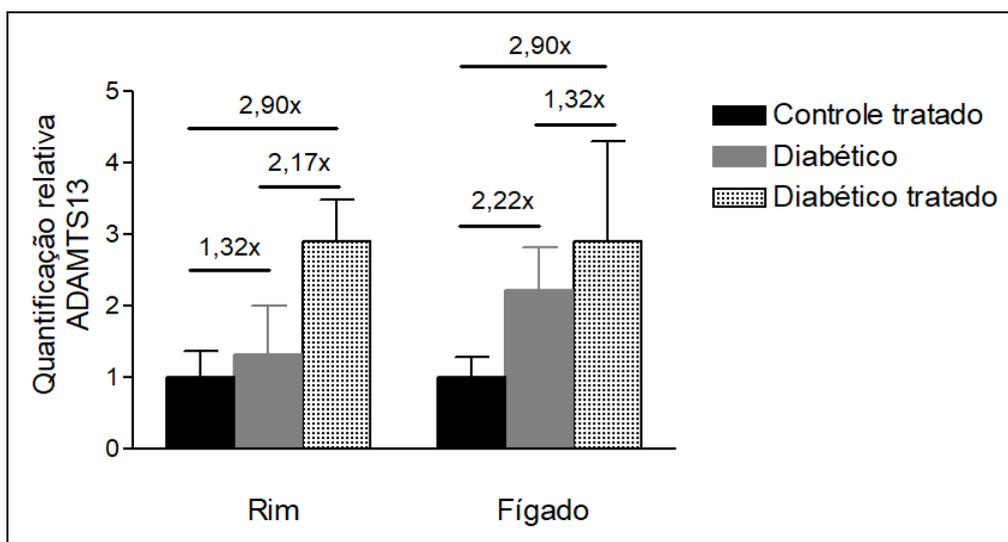


Figura 17 – Avaliação da expressão gênica renal e hepática da ADAMTS13 nos grupos controle tratado, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C após 8 semanas de diabetes. No rim, a diferença de expressão da ADAMTS foi de 1,32x nos animais diabéticos e 2,90x nos diabéticos tratados quando comparada aos controles tratados com peptídeo C. Entre os grupos diabéticos a diferença de expressão foi de 2,17x. No fígado, a expressão da ADAMTS foi maior (2,22x) nos animais diabéticos e diabéticos tratados (2,90x) quando comparada aos controles tratados com peptídeo C. Entre os grupos diabéticos a diferença de expressão foi de 1,32x.

A expressão gênica da eNOS no rim foi semelhante nos grupos DN (1,35x) e DT (1,82x), quando comparados ao grupo CT (Figura 18). A expressão renal da eNOS no grupo DT foi também semelhante ao grupo DN (1,35x maior).

Da mesma forma, na aorta, a expressão entre os grupos foi semelhante: 1,04x entre DN e CT; 1,03x entre DT e CT; e 1,03x entre DN e DT.

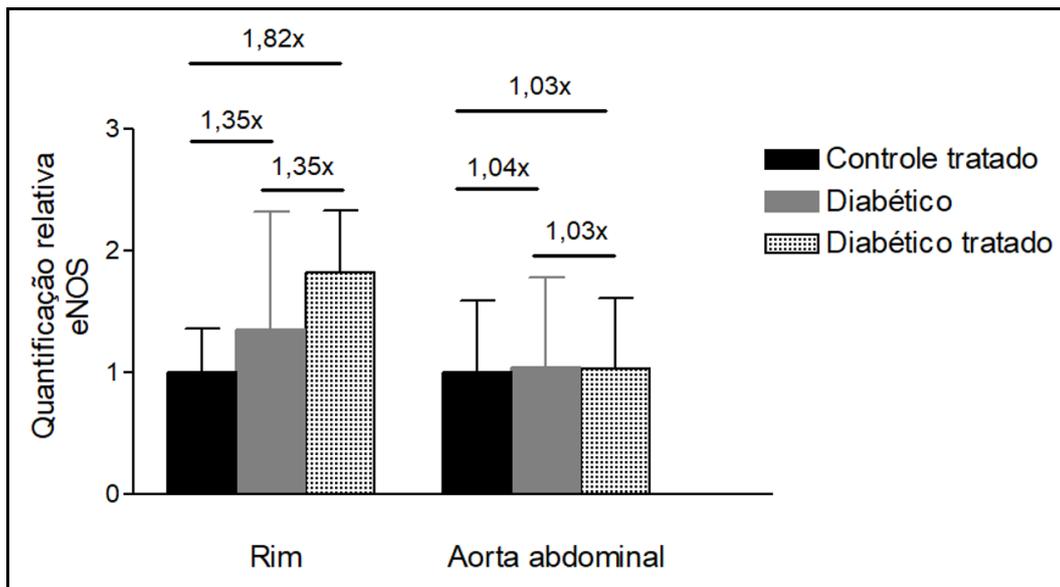


Figura 18 – Avaliação da expressão gênica no rim e na aorta abdominal da eNOS nos grupos controle tratado, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C após 8 semanas de diabetes. A expressão gênica da eNOS no rim foi semelhante entre os grupos: 1,35x entre DN e CT; 1,82x entre DT e CT; 1,35x entre DT e DN. Na aorta, a expressão entre os grupos também foi semelhante: 1,04x entre DN e CT; 1,03x entre DT e CT; e 1,03x entre DN e DT. Abreviações: DN, diabético não tratado; DT, diabético tratado com peptídeo C; CT, controle tratado com peptídeo C.

6.2.5 Efeito do peptídeo C na inflamação e no estresse oxidativo

Para avaliar o perfil inflamatório no modelo animal de DM1 de início recente, no presente estudo os valores séricos e urinários das citocinas inflamatórias IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ foram medidos (Tabela 12). Foram observados níveis urinários aumentados no grupo DN quando comparado ao grupo CT de IL4 ($p=0,023$) e de $TNF\alpha$ ($p=0,021$). Para estas citocinas não foram observadas diferenças significativas quando comparados os grupos DN e DT com peptídeo C ($p>0,05$). Já para as citocinas IL10 e IL17 foram observados níveis urinários significativamente maiores no grupo DN quando comparado aos grupos CT e DT com peptídeo C ($p=0,015$ e $p=0,007$, respectivamente).

Tabela 12 – Avaliação dos níveis de citocinas dos grupos controle tratado com peptídeo C, diabético e diabético tratado com peptídeo C após 8 semanas de diabetes.

	CT (n=9)	DN (n=10)	DT (n=11)	p
IL2 sérica (pg/mL)¹	0,87 ± 2,13	1,25 ± 3,67	0,10 ± 0,19	0,559
IL2 urinária (pg/18horas)²	0,62 (2,40)	7,15 (43,88)	0,00 (14,15)	0,283
Razão IL2 soro/urina²	0,00 (-)	0,00 (1,28)	0,10 (-)	1,000
IL4 sérica (pg/mL)¹	1,98 ± 3,77	0,63 ± 0,57	0,49 ± 1,20	0,360
IL4 urinária (pg/18horas)²	1,00 (0,72) ‡	18,35 (16,86)	8,53 (8,17)	0,023*
Razão IL4 soro/urina¹	4,75 ± 10,44	0,49 ± 0,48	1,32 ± 3,25	0,524
IL6 sérica (pg/mL)²	0,25 (0,86)	1,11 (13,99)	2,90 (-)	0,224
IL6 urinária (pg/18horas)²	1,76 (2,19)	16,72 (58,76)	0,00 (25,55)	0,161
Razão IL6 soro/urina¹	1,27 ± 1,38	3,67 ± 4,03	6,15 ± 8,51	0,578
IL10 sérica (pg/mL)¹	3,87 ± 4,45	9,18 ± 10,69	2,54 ± 2,57	0,615
IL10 urinária (pg/18horas)¹	14,10 ± 10,65 ‡	344,00 ± 343,23 §	80,56 ± 118,28	0,015*
Razão IL10 soro/urina	0,86 (-)	0,15 (1,08)	0,13 (-)	0,169

2

Continua

IL17 sérica (pg/mL) ¹	0,55 ± 0,78	2,89 ± 3,59	2,21 ± 3,13	0,870
IL17 urinária (pg/18horas) ¹	2,29 ± 1,58 ‡	26,07 ± 23,23 §	4,65 ± 8,97	0,007*
Razão IL17 soro/urina ¹	0,82 ± 1,15	1,90 ± 2,27	1,99 ± 2,82	0,938
IFNγ sérico (pg/mL) ²	0,36 (1,90)	0,00 (3,08)	0,36 (2,65)	0,698
IFNγ urinário (pg/18horas) ¹	2,43 ± 1,98	17,97 ± 22,37	16,64 ± 17,04	0,177
Razão IFNγ soro/urina ²	0,25 (2,89)	0,00 (1,32)	0,13 (1,77)	0,687
TNFα sérico (pg/mL) ²	2,68 (3,27)	3,76 (3,64)	4,49 (1,10)	0,832
TNFα urinário (pg/18horas) ¹	6,95 ± 2,99 ‡	88,49 ± 86,47	35,29 ± 22,78	0,021*
Razão TNFα soro/urina ¹	1,48 ± 1,25	0,98 ± 0,62	1,96 ± 1,03	0,328

1 – média e desvio-padrão – ANOVA *post hoc* LSD. 2 – mediana (intervalo interquartilico) – Kruskal, seguido de Mann-Whitney e correção de Bonferroni. ‡Diferença significativa entre os grupos controle tratado e diabético. §Diferença significativa entre os grupos diabético e diabético tratado. CT: controle tratado com peptídeo C; DN: diabético não tratado com peptídeo C; DT: diabético tratado com peptídeo C. *Valor p significativo <0,05.

A expressão gênica renal das citocinas IL6, IL10 e TNF α foi avaliada por meio de PCR em tempo real (Figura 19). Para a citocina IL6, foi observada maior expressão no grupo DN em relação ao grupo CT (2,22x), mas semelhante ao grupo DT com peptídeo C (1,81x). Por outro lado, a expressão no grupo DT foi semelhante quando comparada ao grupo CT (1,22x maior apenas). Da mesma forma, para a citocina TNF α , foi observada expressão maior no grupo DN em relação ao CT (2,83x), mas semelhante ao grupo DT com peptídeo C (1,79x). O grupo DT apresentou expressão de TNF α de apenas 1,58x maior do que o grupo CT.

Por fim, para a expressão da citocina anti-inflamatória IL10, foi observada maior expressão no grupo DT com peptídeo C quando comparado aos grupos CT (4,86x) e DN (2,94x). O grupo DN apresentou um aumento de apenas 1,63x na expressão de IL10 quando comparado ao grupo CT.

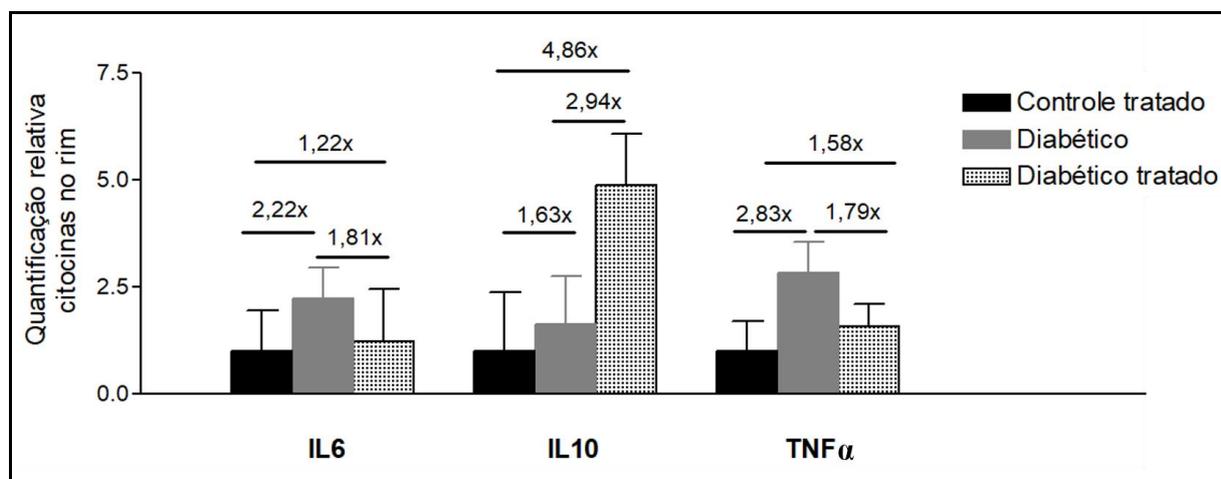


Figura 19 – Avaliação da expressão gênica renal de citocinas nos grupos controle tratado, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C após 8 semanas de diabetes. A expressão gênica renal para a citocina IL6 entre os grupos foi: 2,22x entre DN e CT; 1,22x entre DT e CT; 1,81x entre DT e DN. Para IL10, a expressão entre os grupos foi: 1,63x entre DN e CT; 4,86x entre DT e CT; e 2,94x entre DN e DT. Para TNF α , a expressão entre os grupos foi: 2,83x entre DN e CT; 1,58x entre DT e CT; e 1,79x entre DN e DT. Abreviações: DN, diabético não tratado; DT, diabético tratado com peptídeo C; CT, controle tratado com peptídeo C.

A expressão da enzima SOD na aorta abdominal foi 2,50x maior no grupo DN quando comparado ao grupo CT, mas semelhante ao grupo DT (1,04x maior). O grupo DT apresentou expressão de SOD 2,41x maior quando comparado ao grupo CT (Figura 20).

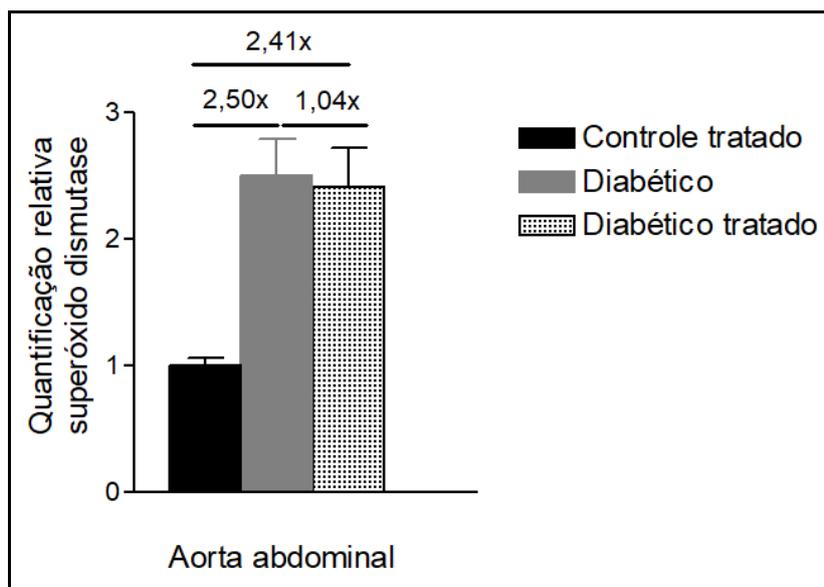


Figura 20 – Avaliação da expressão gênica na aorta abdominal da superóxido dismutase (SOD) nos grupos controle tratado, diabético não tratado e diabético tratado com peptídeo C após 8 semanas de diabetes. A expressão da SOD foi maior (2,50x) nos animais diabéticos e diabéticos tratados (2,41x) quando comparada aos controles tratados com peptídeo C. Entre os grupos diabéticos a diferença de expressão foi de 1,04x.

As análises de correlação de maior relevância clínica estão representadas na Tabela 13, levando-se em consideração os três grupos simultaneamente, em função do tamanho amostral. A ADAMTS13 urinária em nanograma por miligrama de creatinina apresentou correlação significativamente positiva com microalbuminúria, creatinúria e níveis de glicose. Ainda, apresentou correlação significativa positiva com as citocinas urinárias IL4, IFN γ , IL6 e TNF α . As citocinas TNF α e IFN γ na urina apresentaram ainda correlação positiva com níveis urinários de glicose plasmática, microalbuminúria, creatinúria e com todas as citocinas estudadas na urina. Para IL2, IL4, IL6, IL10 e IL17 foi observada correlação com as demais citocinas, no entanto,

com os demais parâmetros não foi observada correlação ou a mesma foi fraca. O f_vW plasmático não apresentou correlação com as variáveis analisadas.

Tabela 13 – Análises de correlações

	ADAMTS13 urina (ng/mg Cr)	Microalbuminúria (μ g/18h)	Creatinúria (mg/18h)	Glicose (mg/dL)	TNF α (pg/18h)	IL2 (pg/18h)	IL4 (pg/18h)	IFN γ (pg/18h)	IL6 (pg/18h)	IL10 (pg/18h)	IL17 (pg/18h)
ADAMTS13 urina (ng/mg Cr)	-	r=0,874 p<0,001*	r=0,561 p=0,002*	r=0,751 p=0,001*	r=0,556 p=0,004*	r= - 0,874 p=0,626	r=0,421 p=0,036*	r=0,707 p<0,001*	r= - 0,504 p=0,014*	r=0,394 p=0,051	r=0,332 p=0,104
Microalbuminúria (μ g/18h) ¹	r=0,874 p<0,001*	-	r=0,520 p=0,016*	r=0,527 p=0,044*	r=0,483 p=0,036*	r=0,158 p=0,517	r=0,423 p=0,071	r=0,683 p=0,001*	r= - 0,317 p=0,215	r=0,480 p=0,038*	r=0,371 p=0,118
Creatinúria (mg/18h) ¹	r=0,561 p=0,002*	r=0,520 p=0,016*	-	r=0,556 p=0,011*	r=0,572 p=0,003*	r= - 0,217 p=0,625	r=0,639 p=0,001*	r=0,454 p=0,023*	r= - 0,636 p=0,001*	r=0,655 p<0,001*	r=0,625 p=0,001*
Glicose (mg/dL) ¹	r=0,751 p=0,001*	r=0,527 p=0,044*	r=0,556 p=0,011*	-	r=0,723 p<0,001*	r= - 0,300 p=0,259	r=0,586 p=0,017*	r=0,566 p=0,022*	r= - 0,659 p=0,010*	r=0,514 p=0,041*	r=0,586 p=0,017*
TNF α (pg/18h)	r=0,556 p=0,004*	r=0,483 p=0,036*	r=0,572 p=0,003*	r=0,723 p<0,001*	-	r=0,476 p=0,016*	r=0,904 p<0,001*	r=0,746 p<0,001*	r=0,766 p<0,001*	r=0,730 p<0,001*	r=0,873 p<0,001*
IL2 (pg/18h) ²	r= - 0,874 p=0,626	r=0,158 p=0,517	r= - 0,217 p=0,625	r= - 0,300 p=0,259	r=0,476 p=0,016*	-	r=0,531 p=0,006*	r=0,534 p=0,006*	r=0,752 p<0,001*	r=0,518 p=0,008*	r=0,470 p=0,018*

1 – Pearson; 2 – Spearman; *Valor p significativo <0,05. Abreviação: Cr, creatinina.

Tabela 13 – Análises de Correlações (continuação)

	ADAMTS13 urina (ng/mg Cr)	Microalbuminúria (µg/18h)	Creatinúria (mg/18h)	Glicose (mg/dL)	TNF α (pg/18h)	IL2 (pg/18h)	IL4 (pg/18h)	IFN (pg/18h)	IL6 (pg/18h)	IL10 (pg/18h)	IL17 (pg/18h)
IL4 (pg/18h) ¹	r=0,421 p=0,036*	r=0,423 p=0,071	r=0,639 p=0,001*	r=0,586 p=0,017*	r=0,904 p<0,001*	r=0,531 p=0,006*	-	r=0,666 p<0,001*	r=0,689 p<0,001*	r=0,798 p<0,001*	r=0,913 p<0,001*
IFN γ (pg/18h) ¹	r=0,707 p<0,001*	r=0,683 p=0,001*	r=0,454 p=0,023*	r=0,566 p=0,022*	r=0,746 p<0,001*	r=0,534 p=0,006*	r=0,666 p<0,001*	-	r=0,900 p<0,001*	r=0,679 p<0,001*	r=0,638 p=0,001*
IL6 (pg/18h) ²	r= - 0,504 p=0,014*	r= - 0,317 p=0,215	r= - 0,636 p=0,001*	r= - 0,659 p=0,010*	r=0,766 p<0,001*	r=0,752 p<0,001*	r=0,689 p<0,001*	r=0,900 p<0,001*	-	r=0,784 p<0,001*	r=0,833 p<0,001*
IL10 (pg/18h) ¹	r=0,394 p=0,051	r=0,480 p=0,038*	r=0,655 p<0,001*	r=0,514 p=0,041*	r=0,730 p<0,001*	r=0,518 p=0,008*	r=0,798 p<0,001*	r=0,679 p<0,001*	r=0,784 p<0,001*	-	r=0,911 p<0,001*
IL17 (pg/18h) ¹	r=0,332 p=0,104	r=0,371 p=0,118	r=0,625 p=0,001*	r=0,586 p=0,017*	r=0,873 p<0,001*	r=0,470 p=0,018*	r=0,913 p<0,001*	r=0,638 p=0,001*	r=0,833 p<0,001*	r=0,911 p<0,001*	-

1 – Pearson; 2 – Spearman; *Valor p significativo <0,05. Abreviação: Cr, creatinina.

7 DISCUSSÃO

7.1 Aspectos metabólicos, renais e hemostáticos no modelo animal de diabetes mellitus tipo 1

O DM1 experimental pode ser induzido quimicamente pela administração de substâncias que destroem seletivamente as células β pancreáticas. No entanto, deve-se levar em consideração que a nefrotoxicidade no modelo pode ocorrer devido à administração de altas doses dessas substâncias (Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001), e não necessariamente devido à complicação do DM1.

A STZ foi considerada a droga diabetogênica mais apropriada para o presente estudo, uma vez que sua ação é mais específica para o pâncreas. Esta droga pode aumentar a glicosilação protéica pela inibição da O-GlcNac-seletiva N-acetil- β -D-glicosaminoxidase (enzima que remove o O-GlcNac das proteínas), sendo o pâncreas mais sensível à STZ do que a mesma enzima em outros tecidos (Konrad *et al.*, 2001).

Além disso, a fim de reduzir uma possível nefrotoxicidade inespecífica da STZ, o esquema de injeções múltiplas de baixas doses da droga para induzir o diabetes foi utilizado. Para isso, foram realizadas administrações diárias, por via intraperitoneal, o que normalmente induz um repetido e baixo grau de dano às células β , acompanhado por insulite autoimune secundária (Alghamdi e Advani, 2014; Kong *et al.*, 2013).

No presente estudo, os animais foram submetidos à pesagem e à aferição da glicemia no dia anterior à indução experimental do diabetes com STZ ou à administração de tampão citrato de sódio (grupo controle) e não foi encontrada diferença entre os grupos, prevenindo a inserção de viés experimental na escolha dos animais.

A análise da excreção urinária de creatinina de um grupo piloto revelou que três dias após a indução do diabetes já foi possível evidenciar um aumento significativo da hiperfiltração, o qual se manteve constante até o final do experimento (tabela 1).

Três dias após a administração intraperitoneal de STZ ou tampão citrato de sódio (grupo controle), o diabetes foi confirmado pelos níveis de glicose superiores à 250mg/dL. Ao longo do experimento, os animais diabéticos mantiveram características clínicas do estado insulinênico, como perda de peso corporal (embora apresentassem polifagia) e hiperglicemia. Por outro lado, o grupo controle apresentou ganho de peso corporal significativo, bem como normoglicemia. A indução do DM1 causou redução de aproximadamente 20% no peso corporal dos animais e aumento de duas a três vezes nos níveis da glicemia capilar após 8 semanas de administração da STZ (tabela 2). Em suma, as observações acima citadas corroboram para a conclusão de que a administração de STZ foi suficiente para mimetizar o *status* de DM1 (Barutta *et al.*, 2011; Matsushita *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2003).

Os animais diabéticos mantidos em gaiolas metabólicas mostraram aumento significativo na ingestão de água, bem como aumento do volume urinário. Estes achados justificam-se pela hiperglicemia presente nestes animais que, ao exceder o limiar renal de reabsorção de glicose, promove a glicosúria. Esta, por sua vez, está associada a diurese osmótica com conseqüente perda de fluidos e eletrólitos (o que justifica a poliúria), bem como a ingestão de água compensatória (polidipsia) (SBD, 2017). Portanto, é clara a relação entre a ingestão hídrica e a perda urinária nesses animais em função da hiperglicemia induzida por STZ. Além disso, observou-se que a excreção de cloretos foi maior no grupo diabético em relação ao grupo controle (tabela 3). Os cloretos são os ânions mais abundantes nos fluidos corporais e a diurese excessiva é sempre acompanhada de maior excreção de cloretos, uma vez que são livremente filtrados nos glomérulos (Burtis e Ashood, 2008) o que corrobora com os resultados acima descritos.

No presente estudo o grupo diabético apresentou níveis significativamente elevados de albumina na urina em relação ao grupo controle (tabela 3). Sabe-se que além da poliúria, polidipsia, perda de peso e polifagia, a hiperglicemia no DM1 está, a longo prazo, associada à nefropatia (WHO, 1999). A nefropatia diabética é inicialmente caracterizada pela excreção de pequenas quantidades de albumina na urina e o diagnóstico consiste no encontro de uma TFG inferior a 60 mL/min/1,73m² durante um período de três meses ou mais (KDOQI, 2002). Cumpre ressaltar que, sem

intervenções específicas, 80% dos pacientes portadores de DM1 com microalbuminúria evoluirão para nefropatia clínica e hipertensão e 50% destes apresentarão insuficiência renal crônica terminal, num prazo de 10 anos, sendo necessário recorrer à diálise ou ao transplante renal (ADA, 2004).

Em nosso estudo, não foi observada diferença significativa entre os níveis séricos de creatinina e ureia entre os grupos diabético e controle, o que justifica não ter sido observado aumento da DEC quando comparados os grupos estudados (tabela 3). De fato, os modelos de diabetes induzidos por STZ apresentam apenas modesta alteração nos níveis séricos dos compostos nitrogenados, como creatinina e ureia, o que nos leva a concluir que o modelo utilizado simula a primeira fase da nefropatia diabética, caracterizada pela hiperfiltração glomerular (Kong *et al.*, 2013). A hiperfiltração glomerular pode ser observada desde as fases iniciais do diabetes e está associada ao aumento da pressão intra-renal e à diminuição do número de néfrons funcionais. O aumento da perfusão glomerular e da pressão intraglomerular em cada néfron ocorrem devido à redução adaptativa da resistência vascular intra-renal associada à dilatação inapropriada das arteríolas aferente, principalmente, e eferente (Brenner *et al.*, 1996). Além da hiperfiltração glomerular, o início do diabetes pode ser caracterizado por presença de albuminúria e aumento da TFG, devido à vasodilatação inapropriada da arteríola aferente (Hills *et al.*, 2010). Apenas na fase seguinte da doença há diminuição progressiva da TFG, o que caracteriza a DRC (KDOQI, 2002).

Corroborando nossos resultados, Samnegard *et al.* (2005) observaram uma TFG semelhante entre grupos diabéticos e não diabéticos 8 semanas após indução de diabetes com STZ, embora esses camundongos tenham apresentado hiperfiltração glomerular 4 semanas após o início do diabetes (Samnegard *et al.*, 2005). Em contraste, estudos prévios com ratos diabéticos demonstraram elevação da TFG e aumento da excreção urinária de albumina quando comparados a animais controles, 2 semanas após a administração de STZ (Sjoquist *et al.*, 1998; Samnegard *et al.*, 2001). Segundo estes estudos, os animais diabéticos quando avaliados 2 e 4 semanas após o início da doença desenvolveram alterações renais semelhantes às encontradas na fase inicial de DM1 em humanos (Hills *et al.*, 2010). Após 8 semanas, houve uma diminuição da hiperfiltração glomerular, não sendo observadas

diferenças entre os grupos diabético e controle, o que sugere a existência de uma etapa de pós-hiperfiltração na fase inicial da nefropatia diabética (Kong *et al.*, 2013). Em concordância com nossos achados, estudos já demonstraram aumento na excreção de albumina no grupo diabético após a indução da doença (Okada *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2011). Desta forma, os resultados obtidos nestes estudos confirmam ser este o modelo mais apropriado para a investigação das alterações renais comumente observadas na primeira fase da nefropatia diabética. Cumpre ainda ressaltar que a microalbuminúria presente na nefropatia diabética inicial está fortemente relacionada à disfunção do endotélio renal e à ocorrência de eventos cardiovasculares, justificando a importância de se diagnosticar precocemente esta disfunção para a aplicação de devidas medidas preventivas às complicações do DM1 (Stehouwer *et al.*, 1995).

No presente estudo, o grupo diabético não apresentou aumento do peso renal relativo ($p > 0,05$) 8 semanas após o diabetes. Isto sugere que as alterações renais provocadas pela STZ foram recentes, sendo precoces para demonstrar hipertrofia renal significativamente maior nos animais diabéticos (tabela 3). No entanto, já foi demonstrado aumento do peso do rim em camundongos diabéticos (Barutta *et al.*, 2011; Matsushita *et al.*, 2011) e a hipertrofia renal pode ser observada precocemente em pacientes com nefropatia diabética secundária ao DM1 (Qi *et al.*, 2005). Esta divergência entre os estudos citados pode ser justificada pelo tempo de avaliação após a indução do diabetes – no estudo de Barutta *et al.* (2011), os animais foram avaliados por 14 semanas após a indução do diabetes.

Os modelos que empregam ratos e camundongos tratados com STZ são amplamente utilizados no estudo da nefropatia diabética precoce devido à sua relação custo-benefício e à ausência de lesões renais avançadas. Embora grande número de modelos murinos de nefropatia diabética (incluindo as induzidas artificialmente, espontânea e geneticamente modificadas - *knockout* e transgênicos) tenha sido desenvolvido, nenhum deles apresenta alterações renais que refletem as observadas em humanos (Kong *et al.*, 2013). O comitê do Consórcio de Complicações Diabéticas (DCC – *Diabetic Complications Consortium*) propõe três critérios para modelo murino desejável de nefropatia diabética: (1) declínio maior ou igual a 50% na TFG; (2) aumento superior a 5000% na albuminúria, comparado a

controles com a mesma idade e gênero; (3) achados histopatológicos que incluem esclerose mesangial (aumento de 50% no volume do mesângio), qualquer grau de hialinose arteriolar, espessamento da membrana basal glomerular (aumento superior a 50% em comparação com os valores basais) e fibrose túbulo-intersticial. Entretanto, até o momento, não há modelos murinos que atendam a todos os três critérios.

Ainda, no presente estudo, os níveis de ADAMTS13 foram avaliados no grupo diabético antes da indução do diabetes, 30 e 60 dias após a última dose de STZ, a fim de verificar a relação entre a alteração renal e excreção de ADAMTS13. Assim como foi observado para creatinúria e microalbuminúria, os níveis urinários de ADAMTS13 aumentaram significativamente ao longo da evolução do diabetes, contudo não há diferença significativa quando comparados 30 e 60 dias após o tratamento com STZ (tabela 4).

Estudos anteriores do nosso grupo com doenças que cursam com disfunção renal, como pacientes sob hemodiálise, transplantados renais e mulheres com pré-eclampsia, demonstraram redução nos níveis plasmáticos de ADAMTS13 quando comparado a um grupo controle hígido (Alpoim *et al.*, 2011; Rios *et al.*, 2012a; Rios *et al.*, 2012b; Rios *et al.*, 2011). Sabe-se que nos pacientes com diabetes e alteração da função renal, também há redução nos níveis da ADAMTS13 plasmática, no entanto os mecanismos envolvidos ainda não estão bem estabelecidos. Estudos têm sugerido a perda da ADAMTS13 na urina; degradação da ADAMTS13 por proteases plasmáticas; e síntese hepática e/ou renal reduzidas da ADAMTS13 em várias condições clínicas associadas às complicações hemostáticas (Manea *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2008).

No presente estudo, os camundongos diabéticos não apresentaram alterações significativas nos níveis plasmáticos de fvW e de ADAMTS13, quando comparados ao grupo controle. Contudo, foram observados níveis significativamente elevados da ADAMTS13 na urina do grupo diabético, sugerindo perda dessa protease na urina, o que pode estar associado à hiperfiltração observada nestes animais (tabela 5). A ausência de alteração nos níveis plasmáticos de ADAMTS13, apesar da perda da protease na urina, pode ser explicada por um mecanismo compensatório, no qual a

síntese da ADAMTS13 estaria aumentada a fim de contrabalancear a atividade do fvW.

É importante ressaltar a correlação positiva dos níveis urinários da ADAMTS13 com a glicemia capilar e microalbuminúria (tabela 6). Esses resultados sugerem que a perda urinária desta protease é proporcional à hiperglicemia e disfunção renal, podendo ser indicativo destas complicações. Além disso, a análise de regressão linear demonstrou que a microalbuminúria e glicemia estão independentemente associadas aos níveis da ADAMTS13 urinária, corroborando os resultados acima.

Constatou-se ainda uma expressão gênica hepática de ADAMTS13 maior (2,53x) no grupo diabético quando comparado ao grupo controle (figura 13). Contudo, a expressão renal não foi diferente entre os grupos (1,00x). Dessa forma, os dados sugerem que o aumento da expressão hepática da ADAMTS13 no grupo diabético contribui para a manutenção dos níveis plasmáticos de ADAMTS13, apesar da excreção aumentada da proteína na urina, tornando-os semelhantes ao grupo controle. Ao compararmos a expressão hepática e renal da ADAMTS13 no grupo diabético, foi observada uma expressão muito maior no fígado (10,97x) em relação ao rim ($p < 0,05$), corroborando mais uma vez com a hipótese de que a expressão hepática é importante na manutenção dos níveis plasmáticos da enzima. De fato, sabe-se que a ADAMTS13 é produzida principalmente no fígado (Watanabe *et al.*, 2009), embora também ocorra, em menor magnitude, a produção desta protease no rim (Manea *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2013). Não se pode ainda descartar a hipótese de que os níveis plasmáticos da ADAMTS13 sejam mantidos também pela expressão aumentada nas plaquetas (Suzuki *et al.*, 2004) e nas células endoteliais (Turner *et al.*, 2006), entretanto esta hipótese não foi investigada no presente estudo.

Apesar do aumento da expressão gênica endotelial do FvW no grupo diabético quando comparado ao controle, não observamos diferença nos níveis plasmáticos do fvW entre os grupos estudados (Figura 14). Este achado pode ser explicado pela presença de níveis da ADAMTS13 suficientes para a degradação dos grandes multímeros no grupo diabético, provenientes principalmente da produção hepática. Além disso, os níveis do fvW podem ainda ser regulados por outras proteases como

a plasmina (Tersteeg *et al.*, 2014), contribuindo para a clivagem dos multímeros. Sabe-se que os níveis de fvW aumentam quando as células endoteliais são lesadas ou estimuladas, podendo ser utilizado como marcador de lesão e disfunção endotelial (Stehouwer *et al.*, 1995; Lip e Blann, 1997; Vischer, 2006). Níveis elevados do fvW têm sido descritos em associação com aterosclerose e diabetes (Lip e Blann, 1997; Rurali *et al.*, 2013). Lopes *et al.* (2007) observaram níveis séricos elevados do fvW em ratos diabéticos tratados com STZ, eutanasiados 8 semanas após a indução do diabetes, quando comparados ao grupo controle, mas sem avaliação dos níveis de ADAMTS13. Embora, o fvW tenha sido descrito como marcador de disfunção endotelial, o seu papel na lesão vascular presente no diabetes ainda não está bem estabelecido. O fvW pode ser um fator de risco para a disfunção endotelial, e não apenas marcador de lesão no endotélio no DM. Além da elevação dos níveis do fvW, outros mecanismos podem estar associados a lesão endotelial que incluem redução da síntese de NO, aumento da síntese de AGEs e produção de mediadores inflamatórios (Schalkwijk e Stehouwer, 1995).

7.2 O efeito do peptídeo C nos parâmetros metabólicos, renais, hemostáticos, inflamatórios e no estresse oxidativo no modelo animal de diabetes mellitus tipo 1

A fim de estudar o efeito do peptídeo C mais especificamente, a administração concomitante com insulina não foi realizada. O grupo controle também foi tratado com o peptídeo C para verificar se o tratamento poderia levar à alguma alteração na função renal, uma vez que sua excreção é realizada pelos rins (Henriksen *et al.*, 1987; Melles *et al.*, 2004). A ausência de alterações nos níveis de albuminúria, antes e após a administração do peptídeo, neste grupo sugere que não há alteração na filtração renal, corroborando com os resultados obtidos em outros estudos que mostram que em animais e humanos saudáveis o peptídeo C não tem efeito fisiológico renal (Johansson *et al.*, 1992a; Wahren & Larsson, 2015).

Foi observado que o peso corporal e a glicemia não foram influenciados pelo tratamento com peptídeo C (Tabelas 7 e 8). Em um estudo desenvolvido por Kamikawa *et al.* (2008) em ratos com diabetes induzido por STZ, a administração de

peptídeo C levou à recuperação da perda de peso dos animais, mas não reduziu a concentração plasmática de glicose (Kamikawa *et al.*, 2008). Por outro lado, de acordo com Sato *et al.* (2004), o peptídeo C é capaz de aumentar a utilização de glicose em ratos diabéticos (Sato *et al.*, 2004). A administração de peptídeo C em pacientes com DM1 aumentou o fluxo sanguíneo e a captação de glicose no músculo esquelético durante exercício físico (Johansson *et al.*, 1992a), bem como em todo o organismo (Johansson *et al.*, 1992b). Contudo, a melhora do controle glicêmico não foi observada em um estudo subsequente desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisadores (Johansson *et al.*, 2000). Diferenças no protocolo experimental, seleção de pacientes e/ou metodologia analítica podem explicar essas discrepâncias. Contudo, os resultados sugerem que o peptídeo C possui papel na regulação do metabolismo da glicose.

Samnegard *et al.* (2005) observaram redução da hipertrofia glomerular e da expansão da matriz mesangial em ratos Wistar após tratamento com concentrações fisiológicas de peptídeo C. Semelhante ao nosso estudo, os animais ficaram diabéticos durante 8 semanas, sendo que nas primeiras 4 semanas os animais não receberam nenhum tipo de tratamento e nas 4 semanas seguintes os ratos diabéticos foram tratados com peptídeo C por via subcutânea na dose de 50 pmol/kg/min. Maezawa *et al.* (2006), utilizando a dose de 290 pmol/kg/min de peptídeo C por via subcutânea durante 24 horas, verificaram redução significativa da albuminúria em camundongos C57BL/6 com diabetes induzida por STZ. Ainda, Zhang *et al.* (2001) avaliaram em ratos diabéticos o efeito do peptídeo C na neuropatia utilizando as doses de 10, 100, 500 e 1000 µg/Kg/dia. Após 2 meses de tratamento, as doses iguais ou maiores a 500 µg/Kg/dia (aproximadamente 100 pmol/kg/min) preveniram a diminuição da atividade neural da Na⁺/K⁺ - ATPase, sendo a proteção dependente da dose. Desta forma, no presente estudo, o esquema de tratamento escolhido para administração nos camundongos C57BL/6 diabéticos foi de 500 µg/kg/dia por via subcutânea por 4 semanas, após um período de 4 semanas sem tratamento com o peptídeo.

No presente estudo, o peptídeo C não levou à redução nos níveis urinários de albumina no grupo DT quando comparado ao DN que recebeu apenas solução salina (Tabela 9). Também não foram observadas diferenças significativas entre

estes grupos com relação ao volume urinário, volume de água ingerido e creatinina urinária (Tabela 10). A controvérsia em relação ao achado anteriores pode estar associada ao fato de que o tratamento no presente estudo consistiu na administração diária do peptídeo por via subcutânea, enquanto em outros estudos em animais as administrações foram realizadas por meio de bombas subcutâneas com infusão contínua. Em modelo animal, Nordquist *et al.* (2009) e Samnegard *et al.*, (2005) reportaram redução da taxa de filtração em animais DT com peptídeo C quando comparados ao grupo controle. Em outro estudo, o peptídeo C reduziu significativamente a excreção de albumina urinária em camundongos C57BL/6 com diabetes induzida com STZ (Maezawa *et al.*, 2006). Foi demonstrada, em pacientes com DM1, diminuição da hiperfiltração glomerular e da excreção urinária de albumina após administração do peptídeo C (Johansson *et al.*, 1992b; Johansson *et al.*, 1993).

Uma metanálise realizada por Shaw *et al.* (2015) revelou que após a indução de diabetes utilizando STZ há, em grande parte dos estudos, um período de monitoramento dos animais que varia de 24 horas a 8 semanas antes da administração de peptídeo C ou veículo, o que mostra grande heterogeneidade nos protocolos experimentais baseados na administração de peptídeo C em animais diabéticos. Ainda de acordo com este estudo, os protocolos experimentais diferem com relação à dose, sendo que a mais comum corresponde a 50 pmol/kg/dia (0,2 µg/kg/dia), e o tempo de administração do peptídeo C, que varia de 1 hora a 3 meses (Shaw *et al.*, 2015). Isto mostra a dificuldade em se estabelecer metodologia ideal cujos resultados sejam comparáveis aos diversos estudos com objetivos semelhantes.

No entanto, na análise histológica por meio de microscopia óptica e eletrônica (Figura 15), não foram observadas expansão intersticial, atrofia tubular e hialinose arteriolar que estariam associadas ao maior comprometimento do tecido renal, confirmando que o modelo desenvolvido se adequa ao *status* de nefropatia inicial. Em outro estudo desenvolvido com modelo animal de diabetes induzido por STZ, a hiperglicemia levou a lesão renal leve a moderada com presença de discreta expansão da matriz mesangial (Alghamdi e Advani, 2014). Entretanto, as alterações mais tardias como, hialinose arteriolar e glomerulosclerose nodular, só ocorreram

entre 15 e 30 semanas de hiperglicemia (Breyer *et al.*, 2005) e, por isso, não eram esperadas no modelo do presente estudo.

No presente estudo as microscopias ótica e eletrônica não revelaram alterações no tecido renal dos animais CT, DN e DT com peptídeo C, apesar da hiperfiltração observada nestes grupos. Isto sugere que as alterações renais induzidas por STZ não são suficientes para provocar mudanças estruturais capazes de serem vistas por meio das técnicas utilizadas.

A fisiopatologia da nefropatia diabética ainda não está bem estabelecida, mas está associada à glicosilação não enzimática com consequente espessamento da cápsula de Bowman e hipertrofia glomerular (Hills *et al.*, 2010; Mader *et al.*, 2013; Tsilibary, 2003). Histologicamente, é caracterizada pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular mesangial e no interstício tubular. As características avançadas da nefropatia diabética incluem mesangiólise, aneurisma capilar glomerular e lesões nodulares (Nakagawa, 2009). De forma semelhante ao nosso estudo, Samnegard *et al.*, 2005 não observaram na microscopia eletrônica diferenças significativas na espessura da membrana basal glomerular de ratos Wistar quando comparados os grupos controle, DN e DT com peptídeo C. No entanto, estes pesquisadores evidenciaram por meio de microscopia ótica nos animais diabéticos aumento no volume glomerular e expansão da matriz mesangial, sendo que estas alterações foram prevenidas no grupo diabético tratado com peptídeo C (Samnegard *et al.*, 2005). Em estudo anterior, Samnegard *et al.*, 2001 demonstraram que a administração de peptídeo C em ratos Sprague-Dawley diabéticos preveniu o desenvolvimento de hipertrofia glomerular, reduziu a hiperfiltração glomerular e a excreção de albumina (Samnegard *et al.*, 2001).

Estudo recente, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou em rim de ratos após 8 semanas de diabetes induzida por STZ, a presença de membrana basal glomerular irregularmente espessada, principalmente em torno de laços capilares periféricos, mas que o aumento da matriz mesangial foi encontrado ocasionalmente (Miko *et al.*, 2016). Desta forma, é possível ainda que no presente estudo as alterações morfológicas não tenham sido evidenciadas devido ao pequeno tamanho amostral (4 animais de cada grupo foram avaliados) e à quantidade de

imagens aleatoriamente adquiridas, sendo possível que as regiões da membrana basal glomerular com alteração não tenham sido identificadas.

Quando comparados os níveis urinários de ADAMTS13 (em ng/18 horas e ng/mg cr) nos grupos estudados, foi observada diferença significativa entre o grupo CT e os grupos DN e DT com peptídeo C ($p < 0,01$) (Tabela 11). No entanto, para estes dois últimos grupos, não foram observadas diferenças entre os níveis urinários desta proteína, sugerindo que o peptídeo C não foi capaz de alterar a excreção renal de ADAMTS13. Além disso, os níveis plasmáticos de ADAMTS13 e os níveis plasmático e urinários de fvW não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Os níveis de fvW estão associados à disfunção endotelial, que é mais grave na nefropatia diabética avançada, bem como nos estados de hipercoagulabilidade, comuns em pacientes diabéticos (Lip & BLann, 1997; Nakagawa *et al.*, 2011; Rurali *et al.*, 2013). Sabe-se que a proteólise do fvW pela ADAMTS13 pode ser influenciada por uma variedade de fatores, incluindo deficiência ou disfunção desta protease (Bowen & Colins, 2006). No entanto, em pacientes diabéticos com insuficiência renal, os mecanismos envolvidos nas alterações nos níveis da ADAMTS13 e do fvW ainda não foram completamente esclarecidos. Desta forma, são necessários mais estudos com modelos animais que apresentam nefropatia diabética moderada à severa, a fim de avaliar as alterações nos níveis plasmáticos e urinários destes marcadores ao longo da evolução da doença. Um estudo desenvolvido recentemente por nosso grupo revelou níveis plasmáticos elevados de fvW e de ADAMTS13 em pacientes diabéticos tipo 1 com nefropatia moderada e severa. No entanto, apenas os pacientes com nefropatia severa apresentaram maior atividade da ADAMTS13, sugerindo que as alterações nos níveis do fvW e da ADAMTS13 se correlacionam com a severidade da nefropatia diabética em pacientes com DM1 (Domingueti *et al.*, 2015).

Considerando que as alterações renais descritas nos estudos de histologia renal acima citados foram observadas em glomérulos de animais com 8 semanas de diabetes, nossa hipótese é a de que a perda de ADAMTS13 na urina pode ser devido à hiperfiltração e, conseqüentemente, à ruptura na barreira glomerular. Além

disso, pode estar ocorrendo a perda desta proteína a partir das células tubulares renais danificadas que produzem ADAMTS13 (Manea *et al.*, 2010). Entretanto, estas hipóteses não foram investigadas no presente estudo. O diabetes induzido neste grupo pode ter causado danos à barreira de filtração que não foram revertidos com o subsequente tratamento com o peptídeo por 4 semanas, o que justifica não ter sido observada diferença significativa entre os níveis urinários de ADAMTS13, bem como de albumina e de creatinina, quando comparados os grupos DN e DT. Além disso, os estudos citados, nos quais foram avaliados o efeito do peptídeo C no rim diabético, foram realizados com ratos e não com camundongos C57BL/6, os quais podem diferir em relação às alterações morfológicas e funcionais.

Sabe-se que o fígado é o principal sítio de produção da ADAMTS13, principalmente nas células estreladas hepáticas (HSCs, *Hepatic Stellate Cells*) (Uemura *et al.*, 2005). De fato, nossos resultados mostraram que a expressão hepática da ADAMTS13 no grupo DN e DT foi maior (2,22x e 2,90x, respectivamente) quando comparada ao grupo CT, o que sugere compensação da perda renal da protease (Figura 17). No entanto, o peptídeo C parece não ter efeito sobre os níveis hepáticos da ADAMTS13, uma vez que o tratamento dos animais diabéticos não alterou a expressão desta protease (1,32x).

Corroborando os resultados anteriormente encontrados no nosso estudo, a expressão gênica da ADAMTS13 no rim do grupo DN permaneceu inalterada quando comparada ao CT (1,32x). Contudo, para o grupo DT com peptídeo C, a expressão foi maior (2,90x) em relação ao grupo CT, bem como ao grupo DN (2,17x). A maior expressão gênica da ADAMTS13 no rim diabético pode estar associada a um mecanismo compensatório, induzido pelo peptídeo C, a fim de contrabalancear os níveis do fvW, os quais estão associados ao estado de hipercoagulabilidade normalmente visto no diabetes. De fato, recentemente, Dhanesha *et al.* (2017) demonstraram em camundongos diabéticos *knock-out* para o gene da ADAMTS13 (Adamts13 *-/-*) a presença de trombose intra-renal acompanhada de albuminúria, aumento nos níveis séricos de creatinina e ureia e expansão da matriz mesangial, em comparação ao grupo diabético selvagem que apresentaram, após 26 semanas de diabetes, apenas redução da atividade da ADAMTS13 no plasma e aumento nos níveis do fvW. Neste mesmo estudo, a

deleção do gene do fvW nos camundongos diabéticos Adamts13 $-/-$ melhorou a função renal, inibiu a trombose intra-renal e as alterações histológicas, sugerindo que a piora da nefropatia diabética na deficiência da ADAMTS13 é dependente do fvW (Dhanesha *et al.*, 2017).

Apesar de no presente estudo não terem sido observadas alterações nos níveis plasmáticos e urinários do fvW nos animais diabéticos, a expressão gênica do FVW na aorta abdominal foi significativamente superior (3,52x) no grupo DN quando comparada à expressão no grupo CT (Figura 16). O grupo DT com peptídeo C apresentou também aumento na expressão gênica do FVW quando comparado ao grupo CT (3,31x), apesar de não ter sido observada diferença em relação ao grupo DN (1,06x). Estes achados sugerem aumento na síntese do fvW nos animais diabéticos, o que seria esperado em função da maior predisposição aos eventos tromboembólicos observados em pacientes e animais com a doença. Embora ocorra este aumento na expressão gênica, um possível consumo do fvW poderia explicar o fato de não ter sido observado aumento nos seus níveis no plasma. Além disso, como já discutido, foi observado aumento compensatório na expressão gênica hepática da ADAMTS13, contribuindo para o *clearance* do fvW. De toda forma, o tratamento com peptídeo C parece não ter efeito na regulação dos níveis do fvW e na sua expressão gênica.

Curiosamente, no presente estudo, não foi observada diferença na expressão na aorta abdominal da eNOS nos grupos DN (1,04x) e DT (1,03x) quando comparada à expressão no grupo CT com peptídeo C (Figura 18). Sabe-se que no DM1, a lesão endotelial pode estar associada ao desacoplamento da enzima eNOS, devido ao aumento do estresse oxidativo, o que culmina na redução da produção de NO e comprometimento da vasodilatação (Hadi e Suwaidi, 2007; Forst *et al.*, 2008; Moncada e Higgs, 1993). O aumento da expressão do mRNA (RNA mensageiro) da eNOS (Scalia *et al.*, 2000), bem como dos níveis da proteína eNOS (Kitamura *et al.*, 2003), associados à maior liberação de NO no endotélio vascular e à vasodilatação, foram observados após tratamento de ratos diabéticos e *in vitro* das células com peptídeo C, respectivamente. Ainda, o peptídeo C estimulou o influxo de Ca^{2+} intracelular promovendo aumento da atividade da eNOS em células endoteliais (Wallerath *et al.*, 2003). O aumento da expressão da eNOS foi demonstrado em

células endoteliais com ativação transcricional do gene dependente da via MAPK (Kitamura *et al.*, 2003). Dessa forma, no DM1 a menor expressão gênica da eNOS pode estar associada à hiperglicemia crônica e à ausência de peptídeo C, o que contribuiria para o desenvolvimento das complicações micro e macrovasculares.

De forma semelhante, não foi observada diferença na expressão da eNOS no rim, quando estes grupos foram comparados, provavelmente devido ao estágio inicial do comprometimento vascular e renal. Sabe-se que, ao contrário do que ocorre nos demais tecidos, há aumento de NO e da expressão da eNOS no endotélio renal em resposta à hiperglicemia e que este aumento está associado à progressão da nefropatia diabética (Kamikawa *et al.*, 2008). O peptídeo C é capaz de regular a eNOS presente nos capilares promovendo constrição dos capilares aferentes e dilatação dos capilares glomerulares eferentes no rim, reduzindo a pressão intrarenal e a excreção de albumina (Nordquist *et al.*, 2009). Embora no estágio de nefropatia avaliado no presente estudo ocorra vasodilatação da arteríola aferente com hiperfiltração, é possível que as lesões endoteliais ainda não tenham sido suficientes para levar a alterações na expressão gênica da eNOS.

Com relação à inflamação, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos das citocinas pró e anti-inflamatórias após 8 semanas de diabetes (Tabela 12). Sanchez-Zamora *et al.* (2016) observaram, em camundongos BALB/c com diabetes induzida por STZ, níveis séricos aumentados das citocinas pró-inflamatórias IFN γ (interferon gama), Mif (*Macrophage migration inhibitory factor*), IL12 e IL17, 8 semanas após a indução do diabetes. Ainda, os níveis séricos da citocina anti-inflamatória IL4 foram significativamente menores nos animais diabéticos (Sanchez-Zamora *et al.*, 2016).

Por outro lado, Sun *et al.* (2012) não observaram alterações nos níveis de TNF α e IL6 em camundongos C57BL/6 diabéticos, 4 semanas após a administração de STZ. A produção destas citocinas por macrófagos foi detectada nestes animais apenas 4 meses após o início do diabetes, sugerindo que na fase inicial do diabetes neste modelo animal não há alteração nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias. Ainda de acordo com estes autores, a hiperglicemia crônica está associada à redução da habilidade dos macrófagos em produzir citocinas (Sun *et al.*, 2012).

Desta forma, a ausência de alterações nos níveis séricos das citocinas no presente estudo pode ser explicada pela hiperglicemia nos animais, embora numa fase muito inicial do diabetes, na qual os níveis séricos destas proteínas ainda não sofreram alterações significativas.

Embora não tenha sido observada alteração significativa nos níveis séricos das citocinas estudadas, houve aumento significativo na excreção das citocinas pró-inflamatórias IL17 e TNF α , e das anti-inflamatórias IL4 e IL10 no grupo DN quando comparado ao grupo CT ($p < 0,05$). A avaliação da expressão gênica renal das citocinas revelou um aumento na expressão de IL6 e TNF α no grupo DN quando comparado ao grupo CT (Figura 19). Este resultado sugere que o DM1 induzido por STZ provoca processo inflamatório local, com maior produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüente, aumento na produção de citocinas reguladoras do processo inflamatório.

Importante ressaltar que o tratamento com peptídeo C parece reduzir o processo inflamatório no rim, uma vez que no presente estudo houve redução significativa da excreção da citocina pró-inflamatória IL17 no grupo DT ($p = 0,007$), quando comparado ao grupo DN, com valores que não diferiram do CT.

Também foi observado que o peptídeo C promoveu redução significativa dos níveis urinários da citocina anti-inflamatória IL10 ($p = 0,015$) no grupo DT, em comparação ao DN, embora tenha sido observado aumento da expressão gênica renal de IL10 no grupo DT, o que poderia ser explicado por redução no seu *clearance* devido à ligação por tempo maior ao seu receptor. De fato, já foi demonstrado níveis elevados de citocinas em biópsia de rim (Kimmel *et al.*, 2003), contribuindo para a hipótese de maior utilização da citocina e/ou internalização, juntamente com o seu receptor no tecido renal. Esta mesma hipótese poderia explicar a maior expressão gênica renal de IL6 no grupo DN em relação ao CT, embora não tenham sido observadas alterações nos níveis séricos e urinários desta proteína.

Por outro lado, no presente trabalho, o tratamento com peptídeo C não reduziu significativamente a expressão gênica das citocinas IL6 e TNF α , quando comparados os grupos DN e DT. O aumento da expressão de IL6 já foi reportado no rim de ratos diabéticos (Navarro *et al.*, 2006). Este aumento foi associado a

alterações nas células mesangiais e podócitos, bem como ao aumento na excreção de albumina na urina (Navarro-González et al., 2011).

Embora no presente estudo o peptídeo C não tenha promovido alteração nos níveis séricos, urinários e na expressão gênica renal da $TNF\alpha$, foi observada correlação significativa positiva entre os níveis urinários desta citocina com a glicemia, microalbuminúria, creatinúria e outras citocinas pró e anti-inflamatórias. Esses resultados sugerem que a perda urinária de $TNF\alpha$ é proporcional à glicemia, bem como à disfunção e inflamação renal, sendo indicativo da evolução e progressão da doença renal diabética, podendo servir como valioso marcador diagnóstico. De fato, DiPetrillo *et al.* (2003) demonstraram em ratos diabéticos, 20 dias após a administração de STZ, que a concentração urinária de $TNF\alpha$ estava associada à retenção de sódio e à hipertrofia renal. Ainda foi demonstrado que a inibição do $TNF\alpha$ durante o diabetes pode atenuar as alterações precoces da nefropatia diabética (DiPetrillo *et al.*, 2003). Além disso, em ratos diabéticos as concentrações urinárias e no interstício renal de $TNF\alpha$ estão elevadas 2 semanas antes da detecção de albumina na urina, o que sugere um papel precoce do $TNF\alpha$ na patogênese da alteração renal diabética, o qual antecede a microalbuminúria (Kalantarina *et al.*, 2003).

Por outro lado, foi observada expressão gênica aumentada da SOD na aorta endotelial no grupo DN quando comparado ao grupo CT (2,50x), sugerindo mecanismo compensatório a fim de reduzir o estresse oxidativo presente nos animais diabéticos (Figura 20). No entanto, o peptídeo C não alterou a expressão gênica da SOD no grupo DT em comparação do DN (1,04x), mas continuou apresentando maior expressão quando comparado do CT (2,41x). Sabe-se que o peptídeo C promove a redução da formação de ROS em células endoteliais de camundongos com diabetes induzida por STZ. Este efeito foi obtido por meio da inibição da ativação de NAD(P)H oxidase via RAC-1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) (Cifarelli *et al.*, 2011) e AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Bhatt *et al.*, 2013a). O peptídeo C também preveniu a formação de ROS ao inibir a ativação da transglutaminase 2 (Bhatt *et al.*, 2013b) e a caspase 3, bem como ao estimular a atividade da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (*B cell CLL/lymphoma 2*) (Cifarelli *et al.*, 2011). Segundo o nosso conhecimento, não há relato prévio na literatura se o

peptídeo C pode influenciar a expressão gênica da SOD. Desta forma, os nossos resultados sugerem que no modelo animal de diabetes induzido por STZ, após 8 semanas de diabetes, a regulação do estresse oxidativo pela SOD não é influenciada pelo tratamento com peptídeo C. Contudo, são necessários mais estudos a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais este peptídeo produz efeitos antioxidantes no diabetes.

No presente estudo, observou-se que o aumento da perda urinária de ADAMTS13 claramente correlacionou-se com a excreção de albumina e creatinina. Além disso, os níveis urinários de ADAMTS13 foram significativamente correlacionados com a glicemia e citocinas inflamatórias (TNF α , IL4, IFN γ , IL6, IL10 e IL17) sugerindo que a perda de ADAMTS13 na urina segue a doença renal e complicações metabólicas e inflamatórias do diabetes. A correlação positiva entre níveis urinários de ADAMTS13 e de citocinas, sugere que a inflamação no rim está associada ao aumento da perda de ADAMTS13 na urina. No entanto, a inflamação no rim pode ter impedido o aumento compensatório da expressão gênica renal da ADAMTS13, nos animais diabéticos.

Foi demonstrado por Cao *et al.*, (2008) que os níveis do mRNA da ADAMTS13, bem como a sua atividade proteolítica em HSCs primários de ratos e em células endoteliais primárias de veia umbilical humana (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), foram significativamente reduzidos após tratamento com IFN γ , IL4 e TNF α . No entanto, essas citocinas não alteraram os níveis do fvW em HUVECS (Cao *et al.*, 2008). Um estudo recente também demonstrou que, em condições pró-inflamatórias, como sepse, as citocinas plasmáticas podem diminuir significativamente os níveis de mRNA da ADAMTS13 e sua atividade proteolítica (Ekaney *et al.*, 2015). Ono *et al.* (2006) também relataram correlação entre sepse, desenvolvimento de insuficiência renal sistêmica e diminuição nos níveis de ADAMTS13 (Ono *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a atividade da ADAMTS13 pode ser regulada por proteases, incluindo trombina e plasmina (Crawley *et al.*, 2005; Feys *et al.*, 2010). Em um estudo utilizando uma linhagem de células de podócitos de ratos condicionalmente imortalizadas, a IL6 diminuiu a expressão de mRNA de ADAMTS13, enquanto a IL4 reduziu a expressão do gene ADAMTS13 sem diminuição do seu nível de proteína (Shen *et al.*, 2013). Desta

forma, nossos resultados sugerem que o tratamento com peptídeo C pode ter sido capaz de aumentar a expressão gênica renal de ADAMTS13, ao reduzir a inflamação neste órgão.

Apesar de alguns estudos terem sugerido que o desbalanço entre os níveis de fvW e ADAMTS13 pode estar associado à doença renal em pacientes com DM, as evidências experimentais dos mecanismos associados ainda são escassas. Dessa forma, os achados do nosso estudo sugerem um mecanismo no qual o aumento da expressão hepática da ADAMTS13 teria papel importante na compensação da perda urinária desta proteína, bem como uma relação desta perda com a lesão renal. Além disso, até o momento não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito do peptídeo C nos níveis do fvW e da ADAMTS. O resumo dos resultados do presente trabalho estão na Figura 21.

Como limitações deste estudo podemos citar: 1) a ausência de alterações renais mais avançadas, o que pode dificultar a extrapolação dos resultados para pacientes portadores de doença renal crônica; 2) a administração de peptídeo C foi realizada por meio de aplicação de dose única diária, o que torna difícil à comparação com estudos que utilizaram bombas de infusão contínua da droga; 3) não foi avaliada a presença de angiopatia trombótica no rim. No entanto, os resultados deste estudo poderão contribuir para o melhor entendimento das alterações hemostáticas que ocorrem no DM1, bem como dos efeitos da administração de peptídeo C, em modelo animal de diabetes. Este estudo abre perspectivas para novas investigações que possam complementar o entendimento da fisiopatologia do DM1.

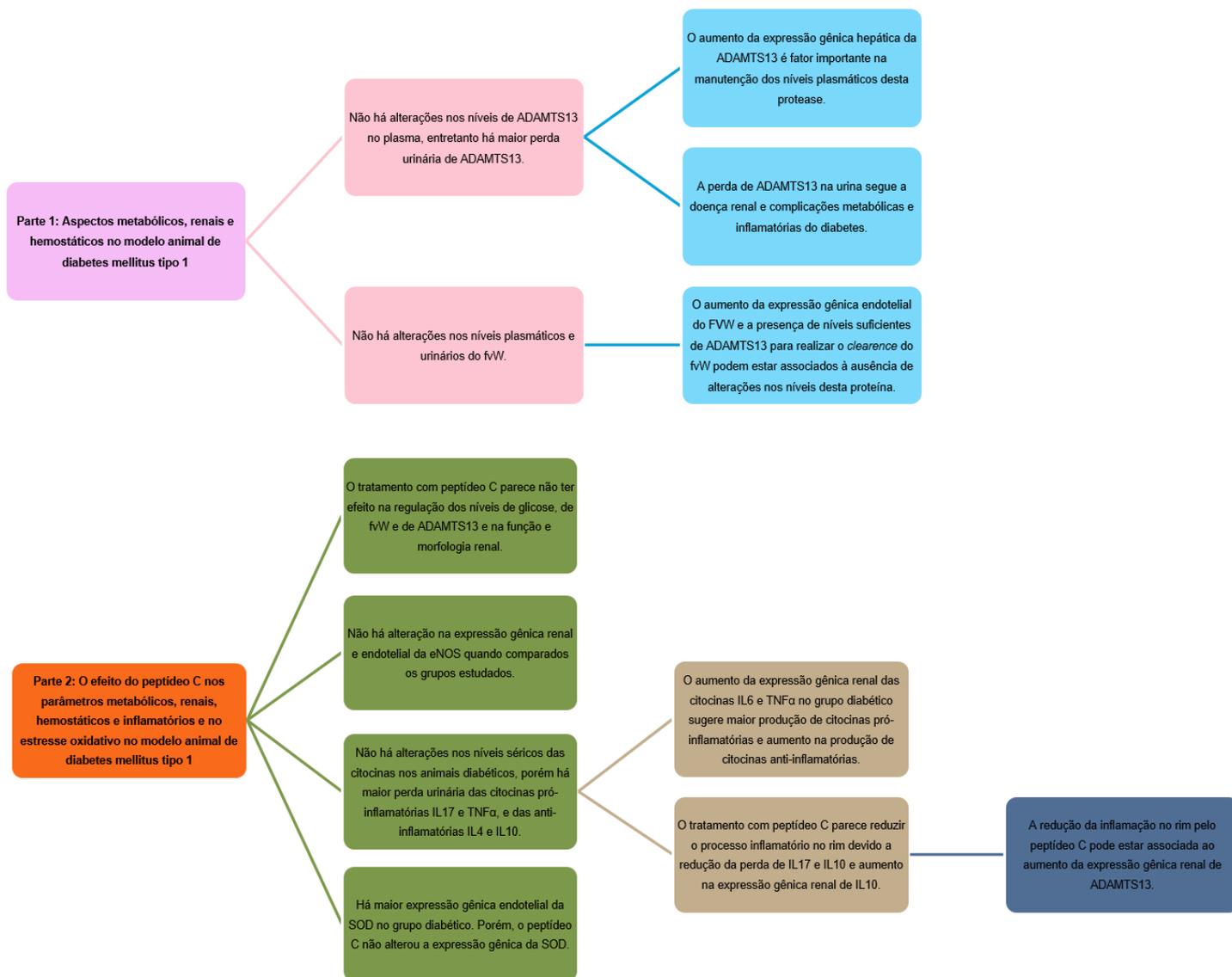


Figura 21 – Resumo dos resultados. Abreviações: fvW: fator de von Willebrand; SOD: superóxido dismutase.

8 CONCLUSÕES

No modelo animal de DM1 com doença renal inicial não há alteração nos níveis plasmáticos de ADAMTS13 e fvW, apesar da maior perda urinária de ADAMTS13, sugerindo que o aumento da expressão gênica hepática pode ter um papel central na compensação da perda urinária desta protease. Além disso, a perda de ADAMTS13 na urina segue a doença renal e complicações metabólicas e inflamatórias do diabetes. O tratamento com peptídeo C pode ter efeito anti-inflamatório no rim diabético ao reduzir a excreção de IL17 e IL10 e aumentar a expressão gênica renal de IL10, o que pode estar associado ao aumento da expressão gênica renal de ADAMTS13.

9 PERSPECTIVAS

- Avaliar o padrão de clivagem da proteína ADAMTS13 por meio de Western blot;
- Avaliar a atividade da ADAMTS13;
- Comparar os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (teste TBARS) e o potencial anti-oxidante do plasma (método MTT), nos grupos estudados;
- Avaliar os níveis de fvW e ADAMTS13 em camundongos com maior tempo de diabetes.
- Avaliar os níveis de NO por citometria de fluxo.
- Avaliar a geração de trombina.

REFERÊNCIAS

ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Nephropathy in Diabetes. **Diabetes Care** 2004; 27(S1): S79-83.

ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care** 2017;40(Suppl 1):S1-131.

ALGHAMDI T, ADVANI A. Animal and cell culture models in diabetic nephropathy. **Diapedia** 2014; 8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14496/dia.71040851234.8>. Acesso em: 28 de novembro de 2017.

ALPOIM PN, GOMES KB, GODOI LC, RIOS DR, CARVALHO MG, FERNANDES AP, DUSSE LM. ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood,group assessment in preeclampsia. **Clin Chim Acta**. 2011; 412(23-24): 2162-6.

AL-RASHEED NM, WILLARS GB, BRUNSKILL NJ. C-peptide signals via Galpha i to protect against TNF-alpha-mediated apoptosis of opossum kidney proximal tubular cells. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17:986–95.

ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. **Arthritis Res Ther** 2009; 11:257.

ARIMOTO M, KOMIYAMA Y, OKAMAE F, ICHIBE A, TERANISHI S, TOKUNAGA H, et al. A case of thrombotic thrombocytopenic purpura induced by acute pancreatitis. **Int J Gen Med** 2012; 5:307-11.

BAIN SC, PRINS JB, HEARNE CM, RODRIGUES NR, ROWE BR, PRITCHARD LE, et al. Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals. **Nat Genet** 1992; 2:212–5.

BARARUTTA F, PISCITELLI F, PINACH S, BRUNO G, GAMBINO R, RASTALDI MP, et al. Protective Role of Cannabinoid Receptor Type 2 in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. **Diabetes** 2011;60(9): 2386-96.

BAYNES JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes** 1991;40(4):405-12.

BELL GI, HORITA S, KARAM JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes** 1984;33:176-83.

BERBER E. The Molecular Genetics of von Willebrand Disease. **Turk J Hematol** 2012;29:313-324.

BERNARDO A, BALL C, NOLASCO L, MOAKE JF, DONG JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. **Blood** 2004;104:100-6.

BERTOLUCI MC, MOREIRA RO, FALUDI O, IZAR MC, SCHAAN BD, VALERIO CM. Brazilian guidelines on prevention of cardiovascular disease in patients with diabetes: a position statement from the Brazilian Diabetes Society (SBD), the Brazilian Cardiology Society (SBC) and the Brazilian Endocrinology and Metabolism Society (SBEM). **Diabetol Metab Syndr** 2017;9:53.

BHATT MP, LIM YC, HA KWON-SOO. C-peptide replacement therapy as an emerging strategy for preventing diabetic vasculopathy. **Cardiovas Res** 2014;104:234-4.

BHATT MP, LIM YC, KIM YM, HA KS. C-peptide activates AMPK alpha and prevents ROS-mediated mitochondrial fission and endothelial apoptosis in diabetes. **Diabetes** 2013a; 62:3851-62.

BHATT MP, LIM YC, HWANG J, NA S, KIM Y, HA K. C-Peptide prevents hyperglycemia-induced endothelial apoptosis through inhibition of reactive oxygen species-mediated transglutaminase 2 activation. **Diabetes** 2013b; 62:243-253.

BOLZAN AD, BIANCHI MS. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res** 2002; 512(2):121-134.

BOWEN DJ, COLLINS PW. Insights into von Willebrand factor proteolysis: clinical implications. **Br J Haematol**. 2006; 133: 457-467.

BRENNER BM, LAWLER EV, MACKENZIE HS. The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. **Kidney Int.** 1996; 49: 1774-1777.

BREYER MD, BÖTTINGER E, BROSIUS FC, COFFMAN TM, HARRIS RC, HEILIG CW, et al. Mouse Models of Diabetic Nephropathy. **J Am Soc Nephrol** 2005;16:27-45.

BROWNLEE M. The Pathobiology of Diabetic Complications. **Diabetes** 2005; 54:1615-25.

BRUNSKILL NJ. C-peptide and diabetic kidney disease. **J Intern Med.** 2017;281(1):41-51.

BURTIS C.A., ASHOOD E.R. Tietz Fundamentos em Química Clínica. 6a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

CAO W, NIIYA M, ZHENG X, SHANG D, ZHENG XL. Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. **J Thromb Haemost.** 2008; 6:1233-1235.

CHATZIGEORGIU A, HALAPAS A, KALAFATAKIS K, KAMPER E. The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. **In vivo** 2009; 23:245-258.

CHIANG JL, KIRKMAN MS, LAFFEL LMG, PETERS AL. Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care** 2014;37:2034–2054.

CHUNG JO, CHO DH, CHUNG DJ, CHUNG MY. Relationship between serum C-peptide level and diabetic retinopathy according to estimated glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. **J Diabetes Complications** 2015; 29:350–355.

CIFARELLI V, GENG X, STYCHE A, LAKOMY M, TRUCCO M, LUPPI P. C-peptide reduces high glucose-induced apoptosis of endothelial cells and decreases NAD(P)H-oxidase reactive oxygen species generation. **Diabetologia** 2011;54:2702-12.

CONSÓRCIO DE COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS (DCC). Disponível em: <http://www.diacomp.org/>. Acesso em: 28 de novembro de 2017.

COTTER MA, EKBERG K, WAHREN J, CAMERON NE. Effects of Proinsulin C-Peptide in Experimental Diabetic Neuropathy. **Diabetes** 2003; 52:1812-1817.

CRAWLEY JT, LAM JK, RANCE JB, MOLLICA LR, O'DONNELL JS, LANE DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. **Blood** 2005; 105:1085-93.

DHANESHA N, DODDAPATTAR P, CHORAWALA MR, NAYAK MK, KOKAME K, STABER JM, LENTZ SR, CHAUHAN AK. ADAMTS13 Retards Progression of Diabetic Nephropathy by Inhibiting Intrarenal Thrombosis in Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2017;37(7):1332-1338.

DEVARAJ S, DASU MR, JIALAL I. Diabetes is a proinflammatory state: a translational perspective. **Expert Rev Endocrinol Metab.** 2010;5(1)19-28.

DIPETRILLO K, COUTERMARSH B, GESEK FA. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. **Am J Physiol Renal Physiol** 2003; 284: F113–F121.

DOMINGUETI CP, DUSSE LMS, FÓSCOLO RB, REIS JS, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, ORSI FLDA, et al. Von Willebrand Factor, ADAMTS13 and D-Dimer Are Correlated with Different Levels of Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. **PLoS ONE** 2015; 10(7): e0132784.

DONG JF. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. **Thromb Haemost** 2005; 3:1710–6.

DUFFIELD JS. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney **Semin Nephrol.** 2010; 30:234-254.

EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION, SARWAR N, GAO P, SESHASAI SR, GOBIN R, KAPTOGE S. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration,

and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**. 2010;375(9733):2215-22.

EKANEY ML, , SOSSDORF M, REUKEN PA, CONRADI F, SCHUERHOLZ T, et al. Preserved Expression of mRNA Coding von Willebrand Factor-Cleaving Protease ADAMTS13 by Selenite and Activated Protein C. **Mol Med**. 2015; 21: 355-363.

EKBERG K, JOHANSSON BL. Effect of C-Peptide on Diabetic Neuropathy in Patients with Type 1 Diabetes. **Exp Diabetes Res**, 2008;2008:457912.

FERREIRA AC, GOMES KB, SAMPAIO IB, OLIVEIRA VC, PARDINI VC, GODARD AL. Type 1 diabetes susceptibility determined by HLA alleles and CTLA-4 and insulin genes polymorphisms in Brazilians. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 2009;53(3):368-73.

FEYS HB, VANDEPUTTE N, PALLA R, PEYVANDI F, PEERLINCK K, DECKMYN H, et al. Inactivation of ADAMTS13 by plasmin as a potential cause of thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Thromb and Haemost** 2010;8:2053–62.

FONG DS, AIELLO L, GARDNER TW, KING GL, BLANKENSHIP G, CAVALLERANO JD et al. Retinopathy in diabetes. **Diabetes Care** 2004;27(Suppl. 1): S84–S87.

FORST T, KUNT T, WILHELM B, WEBER MM, PFÜTZNER A. Role of C-Peptide in the regulation of microvascular blood flow. **Exp Diabetes Res**. 2008; 2008: 176245.

FUJIKAWA K, SUZUKI H, MCMULLEN B, CHUNG D. Purification of human von Willebrand factor–cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase Family. **Blood** 2001;98(6):1662-6.

FURLAN M, ROBLES R, LAMMIE B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. **Blood** 1996;87(10):4223-34.

FURLAN M, ROBLES R, MORSELLI B, SANDOZ P, LAMMLE B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. **Thromb Haemost** 1999; 81:8-13.

GHORBANI A, SHAFIEE-NICK R. Pathological consequences of C-peptide deficiency in insulin-dependent diabetes mellitus. **World J Diabetes** 2015;6(1):145-50.

GRAGNANO F, SPERLONGANO S, GOLIA E, NATALE F, BIANCHI R, CRISCI M et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. **Mediators Inflamm.** 2017;2017:5620314.

GROSS JL, SILVEIRO SP, CAMARGO JL, REICHEL AJ, AZEVEDO MJ. Diabetes mellitus: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2002; 46:16-26.

GURLEY SB, CLARE SE, SNOW KP, HU A, MEYER TW, COFFMAN TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2006;290(1):F214-22.

HADI HA, SUWAIDI JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Vasc Health Risk Manag** 2007; 3(6): 853-76.

HENRIKSEN JH, TRONIER B, BULOW JB. Kinetics of circulating endogenous insulin, C-peptide, and proinsulin in fasting nondiabetic man. **Metabolism** 1987;36:463-8.

HILLS CE, BRUNSKILL NJ, SQUIRES PE. C-Peptide as a Therapeutic Tool in Diabetic Nephropathy. **Am J Nephrol** 2010; 31:389-397.

HULME MA, WASSERFALL CH, ATKINSON MA, BRUSKO TM. Central Role for Interleukin-2 in Type 1 Diabetes. **Diabetes** 2012; 61:14-22.

IDO Y, VINDIGNI A, CHANG K, STRAMM L, CHANCE R, HEATH WF, et al. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. **Science** 1997; 277:563-6.

INSEL RA, DUNNE JL, ATKINSON MA, CHIANG JL, DABELEA D, GOTTLIEB PA et al. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. 2015;38(10):1964-74.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. [Internet]. 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017 [acesso em 21 nov 2017]. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.

JANOWSKA J, CHUDEK J, OLSZANECKA-GLINIANOWICZ M, SEMIK-GRABARCZYK E, ZAHORSKA-MARKIEWICZ B. Interdependencies among Selected Pro-Inflammatory Markers of Endothelial Dysfunction, C-Peptide, Anti-Inflammatory Interleukin-10 and Glucose Metabolism Disturbance in Obese Women. **Int J Med Sci**. 2016; 13(7): 490–499.

JENKINS PV, O'DONNELL JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? **Transfusion** 2006;46:1836-1844.

JENSEN T, BORCH-JOHNSEN K, KOFOED-ENEVOLDSEN A, DECKERT T. Coronary heart disease in young type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without diabetic nephropathy: incidence and risk factors. **Diabetologia** 1987; 30:144-8.

JOHANSSON BL, LINDE B, WAHREN J. Effects of C-peptide on blood flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in the exercising forearm of Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia**, 1992a; 35:1151-1158.

JOHANSSON BL, LINDE B, WAHREN J. The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia**, 1992b; 35:121-128.

JOHANSSON BL, KERNELL A, SJOBERG S, WAHREN J. Influence of Combined C-Peptide and Insulin Administration on Renal Function and Metabolic Control in Diabetes Type I*. **J Clin Endocrinol Metab**. 1993; 71(4): 976-81.

JOHANSSON B, BORG K, FERNQVIST-FORBES E, KERNELL A, ODERGREN T, WAHREN J. Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with Type 1 diabetes mellitus. **Diabetic Med.** 2000; 17:181–189.

KALANTARINIA K, AWAD AS, SIRAGY HM. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF α increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. **Kidney Int** 2003; 64: 1208–1213.

KAMIKAWA A, ISHII T, SHIMADA K, MAKONDO K, INANAMI O, SAKANE N, YOSHIDA T, SAITO M, KIMURA K. Proinsulin C-peptide abrogates type-1 diabetes-induced increase of renal endothelial nitric oxide synthase in rats. **Diabetes Metab Res Rev.** 2008; 24(4):331-8.

KDIGO 2012. Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl** 2013;3:1–150.

KDOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. **Am J Kidney Dis** 2002; 39: S1-246.

KEMPPAINEN KM, ARDISSONE AN, DAVIS-RICHARDSON AG, FAGEN JR, GANO KA, LEÓN-NOVELO LG et al. Early Childhood Gut Microbiomes Show Strong Geographic Differences Among Subjects at High Risk for Type 1 Diabetes. **Diabetes Care** 2015;38:329–332.

KIMMEL PL, COHEN DJ, ABRAHAM AA, BODI I, SCHWARTZ AM, PHILLIPS TM. Upregulation of MHC class II, interferon- α and interferon- γ receptor protein expression in HIV-associated nephropathy. **Nephrol Dial Transplant** 2003; 18: 285–292.

KITAMURA T, KIMURA K, MAKONDO K, FURUYA DT, SUZUKI M, YOSHIDA T, SAITO M. Proinsulin C-peptide increases nitric oxide production by enhancing mitogen-activated protein-kinase-dependent transcription of endothelial nitric oxide synthase in aortic endothelial cells of Wistar rats. **Diabetologia** 2003; 46: 1698-1705.

KLEIN R, KNUDTSON MD, LEE KE, GANGNON R, KLEIN BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XXII the twenty-five-year progression of retinopathy in persons with type 1 diabetes. **Ophthalmology** 2008; 115: 1859–68.

KNIP M, AKERBLOM HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 1999;107: S93–S100.

KOCKUM I, SANJEEVI CB, EASTMAN S, LANDIN-OLSSON M, DAHLQUIST G, LERNMARK A, et al. Complex interaction between HLA DR and DQ in conferring risk for childhood type 1 diabetes. **Eur J Immunogenet** 1999; 26: 361–72.

KONG LL, WU H, CUI WP, ZHOU WH, LUO P, SUN J, et al. Advances in Murine Models of Diabetic Nephropathy. **J Diabetes Res.** 2013; 2013:797548.

KONRAD RJ, MIKOLAENKO I, TOLAR JF, LIU K, KUDLOW JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic β -cell O-GlcNAc-selective N-acetyl- β -D-glucosaminidase. **Biochem J** 2001; 356: 31-41.

LACHIN JM, MCGEE P, PALMER JP. Impact of C-Peptide Preservation on Metabolic and Clinical Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes** 2014; 63:739-748.

LAN HY, NIKOLIC-PATERSON DJ, MU W, ATKINS RC. Local macrophage proliferation in the progression of glomerular and tubulointerstitial injury in rat anti-GBM glomerulonephritis. **Kidney Int.** 1995; 48: 753-760.

LANCELLOTTI S, BASSO M, DE CRISTOFARO R. Proteolytic Processing of Von Willebrand Factor by Adamts13 and Leukocyte Proteases. **Mediterr J Hematol Infect Dis** 2013; 5.

LEE TS, SALTSMAN KA, OHASHI H, KING GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86:5141-5145.

LEITER EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: Influence of inbred background, sex, and thymus. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 1982; 79:630-634.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia** 2008; 51: 216–226.

LESLIE RD, ATKINSON MA, NOTKINS AL. Autoantigens IA-2 and GAD in type 1 (insulin-dependent) diabetes. **Diabetologia** 1999; 42:3–14.

LEVEY AS, JONG PE, CORESH J, NAHAS M, ASTOR BC, MATSUSHITA K. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. **Kidney Int** 2011;80:17–28.

LEVY GG, MOTTO DG, GINSBURG D. ADAMTS13 turns 3. **Blood** 2005; 106:11-7.

LEVY GG, NICHOLS WC, LIAN EC, FOROUD T, MCCLINTICK JN, MCGEE BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. **Nature** 2001; 413:488–494.

Li M, Song L, Qin X. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. **J. Cell. Mol. Med** 2014; 18(5):749-75.

LI Y, LIU Y, CHU C. Th17 cells in type 1 diabetes: role in the pathogenesis and regulation by gut microbiome. **Mediators Inflamm** 2015; 2015:638470.

LIM Y, BHATT MP, KWON M, PARK D, LEE S, CHOE J. Prevention of VEGF-mediated microvascular permeability by C-peptide in diabetic mice. **Cardiovasc Res** 2014;101:155–64.

LINDENBLATT N, BRAUN B, MENGER MD, KLAR E, VOLLMAR B. C-peptide exerts antithrombotic effects that are repressed by insulin in normal and diabetic mice. **Diabetologia** 2006; 49: 792–800.

LIP GY, BLANN A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? **Cardiovasc Res**. 1997; 34: 255-265.

LITTLE PJ, CHAIT A, BOBIK A. Cellular and cytokine-based inflammatory processes as novel therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis. **Pharmacol Ther** 2011;255–268.

LOPES RD, NEVES LB, D'ALMEIDA V, CONCEIÇÃO GMS, JUNIOR AG. Homocisteína Plasmática Total e Fator von Willebrand no Diabete Melito Experimental. **Arq Bras Cardiol** 2007;88(4):424-429.

LUPPI P, CIFARELLI V, TSE H, PIGANELLI J, TRUCCO M. Human C-peptide antagonises high glucose-induced endothelial dysfunction through the nuclear factor- κ B pathway. **Diabetologia** 2008;51:1534–1543.

LUPPI P, KALLAS A, WAHREN J. Can C-peptide mediated anti-inflammatory effects retard the development of microvascular complications of type 1 diabetes? **Diabetes Metab Res Rev** 2013; 29: 357–362.

LYONS SE, BRUCK ME, BOWIE EJ, GINSBURG D. Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. **J Biol Chem** 1992; 267:4424–30.

MADER JR, RESCH ZT, MCLEAN GR, MIKKELSEN JH, OXVIG C, MARLER RJ, et al. Mice Deficient in PAPP-A Show Resistance to the Development of Diabetic Nephropathy. **J Endocrinol** 2013; 219(1): 51–58.

MAEZAWA Y, YOKOTE K, SONEZAKI K, FUJIMOTO M, KOBAYASHI K, KAWAMURA H, et al. Influence of C-peptide on early glomerular changes in diabetic mice. **Diabetes Metab Res Rev**. 2006;22(4):313-22.

MANEA M, KRISTOFFERSSON A, SCHNEPPENHEIM R, SALEEM MA, MATHIESON PW, MORGELIN M. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. **Br J Haematol** 2007; 138:651–662.

MANEA M, TATI R, KARLSSON J, BÉKÁSSY ZD, ZARPMAN D, et al. Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. **Pediatr Nephrol** 2010; 25: 87-96.

MANNUCCI PM, CAPOFERRI C, CANCIANI MT. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. **Br J Haematol** 2004; 126: 213-218.

MATSUSHITA Y, OGAWA D, WADA J, YAMAMOTO N, SHIKATA K, SATO C, et al. Activation of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor α Inhibits Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Through Anti-Inflammatory Mechanisms in Mice. **Diabetes** 2011; 60:960-968.

MEEKING DR, CUMMINGS MH, THORNE S, DONALD A, CLARKSON P, CROOK JR, et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. **Diabet Med** 1999; 16: 841-7.

MEIGS JB, MITTLEMAN MA, NATHAN DM, TOFLER GH, SINGER DE, MURPHY-SHEEHY PM, et al. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: The Framingham Offspring Study. **JAMA** 2000; 283(2):221-82.

MELLES E, JORNVALL H, TRYGGVASON S, DANIELSSON KG, EKBERG K, TRYGGVASON K, et al. Degradation of proinsulin C-peptide in kidney and placenta extracts by a specific endoprotease activity. **Cell Mol Life Sci** 2004; 61:2979–82.

MI Q, LY D, ZUCKER P, MCGARRY M, DELOVITCH TL. Interleukin-4 but not Interleukin-10 Protects Against Spontaneous and Recurrent Type 1 Diabetes by Activated CD1d-Restricted Invariant Natural Killer T-Cells. **Diabetes** 2004; 53:1303-1310.

MIKO M, JAKUBOVSKY J, VRABCOVA M, VARGA I. Ultrastructural changes of kidney in diabetic rats. **Bratisl Lek Listy**. 2016;117(3):161-5.

MONCADA S, HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**. 2008; 329: 2002-12.

NAKAGAWA T. A new mouse model resembling human diabetic nephropathy: uncoupling of VEGF with eNOS as a novel pathogenic mechanism. **Clin Nephrol** 2009; 71(2):103-109.

NAKAGAWA T, TANABE K, CROKER BP, JOHNSON RJ, GRANT MB, KOSUGI T, et al. Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol.** 2011; 7(1): 36–44.

NAVARRO-GONZÁLEZ JF, MORA-FERNÁNDEZ C, MUROS DE FUENTES M, GARCÍA-PÉREZ J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol.** 2011; 7(6):327-40.

NAVARRO JF, MILENA FJ, MORA C, LEÓN C. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. García J. **Am J Nephrol.** 2006;26(6):562-70.

NORDQUIST L, BROWN R, FASCHING A, PERSSON P, PALM F. Proinsulin C-peptide reduces diabetes-induced glomerular hyperfiltration via efferent arteriole dilation and inhibition of tubular sodium reabsorption. **Am J Physiol Renal Physiol** 2009; 297:F1265–72.

OKADA S, SHIKATA K, MATSUDA M, OGAWA D, USUI H, KIDO Y, et al. Intercellular Adhesion Molecule-1–Deficient Mice Are Resistant Against Renal Injury After Induction of Diabetes. **Diabetes** 2003; 52: 2586-93.

ONO T, MIMURO J, MADOIWA S, SOEKIMA K, KASHIWAKURA Y, ISHIWATA A, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. **Blood** 2006;107(2):528-34.

PESSIN JE, SALTIEL AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest** 2000;106(2):165-169.

PESTANA RMC, DOMINGUETI CP, DUARTE RCF, FÓSCOLO RB, REIS JS, RODRIGUES AMS et al. Cytokines profile and its correlation with endothelial damage and oxidative stress in patients with type 1 diabetes mellitus and nephropathy. **Immunol Res.** 2016; 64(4):951-60.

POP-BUSUI R, BOULTON AJM, FELDMAN EL, BRIL V, FREEMAN R, MALIK RA. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care** 2017;40:136–154.

PUJIA A, GAZZARUSO C, MONTALCINI T. An update on the potential role of C-peptide in diabetes and osteoporosis. **Endocrine**, 2017;58(3):408–412.

QI Z, FUJITA H, JIN J, DAVIS LS, WANG Y, FOGO AB, et al. Characterization of Susceptibility of Inbred Mouse Strains to Diabetic Nephropathy. **Diabetes** 2005; 54:2628-37.

RAPHAEL I, NALAWADE S, EAGAR TN, FORSTHUBER TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine** 2015; 74(1):5-7.

REDONDO MJ, YU L, HAWA M, MACKENZIE T, PYKE DA, EISENBARTH GS, LESLIE RDG. Heterogeneity of type 1 diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. **Diabetologia** 2001; 44:354–62.

REES DA, ALCOLADO JC. Animal models of diabetes mellitus. **Diabet Med.** 2005; 22(4):359-70.

REININGER AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. **Haemophilia** 2008a; 5:11-26.

REININGER AJ. VWF attributes-impact on thrombus formation. **Thromb Res** 2008b;122 (S4): S9-13.

RIGLER R, PRAMANIK A, JONASSON P, KRATZ G, JANSSON OT, NYGREN PA, et al. Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. **PNAS** 1999;96(23): 13318–23.

RIOS DR, CARVALHO MG, FIGUEIREDO RC, FERREIRA CN, RODRIGUES VL, SOUZA RA, FERNANDES AP, SIMÕES E SILVA AC, GOMES KB, DUSSE LM.

ADAMTS13 and Von Willebrand factor in patients undergoing hemodialysis. **J Thromb Thrombolysis** 2012a; 34(1): 73-8.

RIOS DR, FERNANDES AP, FIGUEIREDO RC, GUIMARÃES DA, FERREIRA CN, SIMÕES E SILVA AC, CARVALHO MG, GOMES KB, DUSSE LM. Relationship between ABO blood groups and von Willebrand factor, ADAMTS13 and factor VIII in patients undergoing hemodialysis. **J Thromb Thrombolysis**. 2012b; 33(4): 416-21.

RIOS DR, MOTA AP, CARVALHO MG, FERNANDES AP, GOMES KB, DUSSE LM, SIMÕES E SILVA AC. ADAMTS13 and von Willebrand factor assessment before and after kidney transplantation. **Clin Chim Acta** 2011; 412(23-24):2353-4.

ROMÃO JE. Doença Renal Crônica: definição, epidemiologia e classificação. **JBN** 2004; 26(3):1-3.

RURALI E, NORIS M, CHIANCA A, DONADELLI R, BANTERLA F, GALBUSERA M, et al. ADAMTS13 predicts renal and cardiovascular events in type 2 diabetic patients and response to therapy. **Diabetes** 2013; 62: 3599–3609.

SADLER, JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood** 2008;112(1):11-18.

SAMNEGARD B, JACOBSON SH, JAREMKO G, JOHANSSON BL, QUIST M. Effects of C-peptide on glomerular and renal size and renal function in diabetic rats. **Kidney Int**. 2001;60:1258–1265.

SAMNEGARD B, JACOBSON SH, JAREMKO G, JOHANSSON BL, EKBERG K, ISAKSSON B, ERIKSSON L, WAHREN J, SJÖQUIST M. C-peptide prevents glomerular hypertrophy and mesangial matrix expansion in diabetic rats. **Nephrol Dial Transplant** 2005;20(3):532–8.

SÁNCHEZ-ZAMORA YI, JUAREZ-AVELAR I, VAZQUEZ-MENDOZA A, HIRIART M, RODRIGUEZ-SOSA M. Altered Macrophage and Dendritic Cell Response in Mif^{-/-} Mice Reveals a Role of Mif for Inflammatory-Th1 Response in Type 1 Diabetes. **J Diabetes Res**. 2016; 2016: 7053963.

SATO Y, OSHIDA Y, HAN YQ, MORISHITA Y, LI L, EKBERG K, JÖRNVALL H, WAHREN J. C-peptide fragments stimulate glucose utilization in diabetic rats. **Cell Mol Life Sci** 2004; 61: 727-732.

SAVAGE B, SALDÍVAR E, RUGGERI ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. **Cell** 1996; 84:289-97.

SCALIA R, COYLE KM, LEVINE BM, BOOTH G, LEFER AM. C-peptide inhibits leukocyte–endothelium interaction in the microcirculation during acute endothelial dysfunction. **FASEB J** 2000;14(14):2357-64.

SCHMIDT AM, STERN DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **TEM** 2000; 11(9):368-375.

SCHALKWIJK CG, STEHOUWER DA. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clinical Science** 2005;109:143–159.

SCHROEDER CAJR, CHEN Y-L, MESSINA EJ. Inhibition of NO synthesis or endothelium removal reveals a vasoconstrictor effect of insulin on isolated arterioles. **Am J Physiol.** 1999; 276:H815-H820.

SESSO RC, LOPES AA, THOMÉ FS, LUGON JR, MARTINS CT. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica. **J. Bras. Nefrol.**2016;39(3):261.

SCHRAM MT, CHATURVEDI N, SCHALKWIJK CG, FULLER JH, STEHOUWER CDA. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes—the EURODIAB Prospective Complications Study. **Diabetologia** 2005;48: 370–378.

SHAW JA, SHETTY P, BURNS KD, FERGUSSON D, KNOL GA. C-peptide as a Therapy for Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One.** 2015; 10(5): e0127439.

SHEN L, LU G, DONG N, MA Z, RUAN C. Simvastatin Increases ADAMTS13 Expression in Podocytes. **Thromb Res** 2013;132:94–99.

SKEPPHOLMA M, KALLNERC A, KALANIA M, JORNESKOGB G, BLOMBACK M, WALLEN H. ADAMTS13 and von Willebrand factor concentrations in patients with diabetes mellitus. **Blood Coagul Fibrinolysis** 2009;20(8):619-26.

SILVEIRA KD, BARROSO LC, VIEIRA AT, CISALPINO D, LIMA CX, BADER M, et al. Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) MAS receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy. **PLoS One** 2013; 8:e66082.

SIMA AA, ZHANG W, SUGIMOTO K, HENRY D, LI Z, WAHREN J, GRUNBERGER G. C-peptide prevents and improves chronic Type I diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. **Diabetologia** 2001; 44(7): 889-97.

SJÖQUIST M, HUANG W, JOHANSSON BL. Effects of C-peptide on renal function at the early stage of experimental diabetes. **Kidney Int**1998;54(3):758–64.

SKYLER JS, BAKRIS GL, BONIFACIO E, DARSOW T, ECKEL RH, GROOP L et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**. 2017;66(2):241:55.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. 2017.

STEFFES MW, SIBLEY S, JACKSON M, THOMAS W. β -Cell Function and the Development of Diabetes-Related Complications in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care** 2003; 26:832-836.

STEHOUWER CD, FISCHER HR, VAN KUIJK AW, POLAK BC, DONKER AJ. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. **Diabetes** 1995;44: 561-4.

STEVENS MJ, ZHANG W, LI F, SIMA AA. C-peptide corrects endoneurial blood flow but not oxidative stress in type 1 BB/Wor rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2004; 287(3):E497-505.

SUMPIO BE, RILEY JT, DARDIK A. Cells in focus: endothelial cell. **Int J Biochem Cell Biol** 2002;34(12):1508-12.

SUN CF, SUN L, MA H, PENG J, ZHEN Y, DUAN K, LIU G, DING W, ZHAO Y. The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. **J Cell Physiol.** 2012;227(4):1670-9.

SUN CF, LIU GQ, ZHAO X, HAN F, XU M, XING J, LIU J. ADAMTS13 Level in Prothrombotic Status and Its Related Factor Analysis. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.** 2016;24(4):1125-31.

SUZUKI M, MURATA M, MATSUBARA Y, UCHIDA T, ISHIBARA H, SHIBANO T, et al. Detection of Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in human platelets. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 313:212-6.

SZKUDELSKI T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol Res** 2001;50: 536-46.

SZMITKO PE, WANG CH, WEISEL RD, DE ALMEIDA J, ANDERSON T, VERMA S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. **Circulation** 2003; 108:1017-23.

TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study. **Ann N Y Acad Sci.** 2008;1150-1-13.

TERSTEEG C, STEVEN M, MEYER SF, SMEETS MWJ, BARENDRECHT AD, ROEST M, et al. Plasmin cleavage of von willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. **Circulation** 2014;129:1320-31.

TERVAERT TWC, MOOYAART AL, AMANN K, COHEN AH, COOK HT, DRACHENBERG CB, et al. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. **J Am Soc Nephrol.** 2010; 21: 556 –563.

TING DS, CHEUNG GC, WONG TY. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review. **Clin Exp Ophthalmol.** 2016;44(4):260-77.

TSAI HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. **Blood** 1996;87(10):4235-44.

TSILIBARY EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. **J Pathol.** 2003; 200: 537-546.

TURNER N, NOLASCO L, TAO Z, DONG JF, MOAKE J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS13. **J Thromb Haemost** 2006; 6:1396-404.

UEMURA M, TATSUMI K, MATSUMOTO M, FUJIMOTO M, MATSUYAMA T, ISHIKAWA M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. **Blood.** 2005; 106: 922-924.

UWAEZUOKE SN. The role of novel biomarkers in predicting diabetic nephropathy: a review. **Int J Nephrol Renovasc Dis.** 2017;10:221-231.

VANBUECKEN DE, GREENBAUM CJ. Residual C-peptide in type 1 diabetes: what do we really know? **Pediatr Diabetes** 2014;15:84–90.

VANBUECKEN DE, GREENBAUM CJ. Residual C-peptide in type 1 diabetes: what do we really know? **Pediatr Diabetes.** 2014;15(2):84-90.

VANE JR, ANGGARD EE, BOTTING RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med** 1990; 323:27–36.

VIANA LV, GROSS JL, CAMARGO JL, ZELMANOVITZ T, COSTA ROCHA EPC, AZEVEDO MJ. Prediction of cardiovascular events, diabetic nephropathy, and mortality by albumin concentration in a spot urine sample in patients with type 2 diabetes. **J Diabetes Complications.** 2012;26(5):407-12.

VISCHER, UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. **J Thromb Haemost** 2006; 4:1186–93.

ZENG G, QUON MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. **J Clin Invest** 1996; 98:894-898.

ZHANG W, YOREK M, PIERSON CR, MURAKAWA Y, BREIDENBACH A, SIMA AAF. Human C-peptide Dose Dependently Prevents Early Neuropathy in the BB/Wor-rat. **Int. J Exp Diabetes Res** 2001; 2:187-193.

ZHENG X, CHUNG D, TAKAYAMA TK, MAJERUS EM, SADLER JE, FUJIKAWA K. Structure of Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Biol Chem** 2001; 44:41059-63.

WAEHRE T, HALVORSEN B, DAMAS JK, YNDESTAD A, BROSSTAD F, GULLESTAD L, KJEKSHUS J, FROLAND SS, AUKRUST P. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF α in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. **Eur Journal of Clin Invest** 2002; 32: 803–810.

WAHREN J, KALLAS A, SIMA AAF. The Clinical Potential of C-Peptide Replacement in Type 1 Diabetes. **Diabetes** 2012;61:761-72.

WAHREN J, LARSSON C. C-peptide: New findings and therapeutic possibilities. **Diabetes Res Clin Pract** 2015; 107:309-19.

WALLERATH T, KUNT T, FORST T, CLOSS EI, LEHMANN R, FLOHR T, et al. Stimulation of endothelial nitric oxide synthase by proinsulin C-peptide. **Nitric Oxide** 2003; 9:95–102.

WATANABE N, IKEDA H, KUME Y, SATOH Y, KANEKO M, TAKAI D, et al. Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis. **Thromb Haemost** 2009;102(2):389-96.

WAUTIER JL, GUILLAUSSEAU PJ. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. **Vasc Med** 1998;3:131-137.

WAUTIER JL, WAUTIER, MP, SCHMIDT AM, ANDERSON GM, HORI O, ZOUKOURIAN C, et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing

oxidant stress in the vasculature: A link between surface-associated AGEs and diabetic complications. **Proc Natl Acad Sci** 1994;91:7742-7746.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, World Health Organization, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on diabetes [Internet]. Geneva; 2016 [acesso em 21 nov 2017]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf

WU J, YAN LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes Metab Syndr Obes** 2015; 8: 181–8.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 199 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Efeito da reposição de peptídeo-C sobre o estresse oxidativo em modelo animal de diabetes tipo 1", que tem como responsável Karina Braga Gomes Borges, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 30/08/2012. Este certificado espira-se em 30/08/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 199 / 2012, related to the Project entitled "Evaluation of reposition effect with peptide-C in oxidative stress using model of diabetes type I", under the supervision of Karina Braga Gomes Borges, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 30/08/2012. This certificate expires in 30/08/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 30/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo B – Artigo publicado com resultados do doutorado

Thrombosis Research 157 (2017) 167–169



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres



Letter to the Editors-in-Chief

Liver up-regulation of ADAMTS13 gene expression and its correlation with renal markers in mice with type 1 diabetes mellitus and nephropathy



1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN) is one of the most important risk factors for cardiovascular disease (CVD), contributing to approximately 45% of end stage renal disease (ESRD) cases [1]. The hypercoagulability state in diabetes results from the imbalance between pro- and anti-coagulant proteins, which leads to thrombotic events [2].

ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motifs, member 13) is the physiological von Willebrand factor (VWF) cleavage protease. This protease is synthesized primarily in the human liver, particularly in hepatic stellate cells (HSCs), but also in platelet, endothelial cells, kidney and other tissues [3]. VWF glycoprotein plays a central role in the blood coagulation system, acting as the major mediator of platelet-vessel wall interaction and platelet adhesion. Ultra large VWF multimers (UL-VWF) are cleaved by ADAMTS13 under fluid shear stress. When ADAMTS13 is deficient, the UL-VWF lead to platelet aggregation and thrombus formation [4].

In diabetic patients, high VWF levels in the presence of albuminuria have been associated with vasculopathy and CVD [5]. Moreover, decreased ADAMTS13 activity/ADAMTS13 antigen levels ration have been associated with renal injury [1]. These findings lead to the hypothesis that ADAMTS13 antigen levels may be affected in patients with nephropathy, although it remains unclear the mechanism underlying altered levels of these proteins in diabetes. Therefore, we investigated, in a type 1 diabetes mellitus (T1DM) animal model, how renal injury may influence the ADAMTS13 antigen levels, by measuring urinary and plasma levels of ADAMTS13 antigen and its gene expression in kidney and liver tissues.

2. Materials and methods

Eight-week-old male C57BL/6 mice received streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, U.S.A.; 50 mg/kg/day, intraperitoneal) (N = 10), for five consecutive days. Mice treated with sodium citrate buffer were used as controls (N = 10). The experiments were conducted in triplicate with n = 3–4 animals per group. Diabetes onset was confirmed by blood glucose levels ≥ 250 mg/dL (digital glucometer - Free Style Optium®, Abbott Laboratories®, Abbot Park, Chicago, IL, U.S.A.). This study was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and approved by The Committee on the Ethics of Animal Experimentation of the University of Minas Gerais (Permit Number: 199/2012).

Before STZ treatment, on day 3 after diabetes onset and after 8 weeks of STZ treatment, the mice were placed in metabolic cages and 18-hour

urine samples were collected. Blood samples were collected from the brachial vein, under ketamine and xylazine anesthesia (150 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). Urea and creatinine (Cr) levels were determined using enzymatic kits (Uréia-PP® and Creatinina®, respectively, Gold Analisa Diagnostica®, Belo Horizonte, MG, Brazil), and the creatinine clearance (CrC) was calculated $\{(\text{urine creatinine concentration (mg/dL)} \times \text{urine volume (mL/min)}) / \text{serum creatinine concentration (mg/dL)}\}$. Urinary albumin excretion (UAE), VWF antigen plasma levels and ADAMTS13 antigen levels in plasma and urine were detected by ELISA kit (Mouse Albumin®, Bethyl Laboratories®, Inc., Montgomery, TX, U.S.A.; IMUBIND®FvW and IMUBIND®ADAMTS13, American Diagnostica®, Stamford, CT, U.S.A, respectively). Total RNA was extracted from kidney and liver by TRIzol® reagents (Ambion®, Austin, TX, U.S.A). The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed in only one-step, using TaqMan RNA-to-CT™ 1-Step kit®, and mouse-specific ADAMTS13 and 18S ribosomal TaqMan® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, U.S.A). The relative quantification of ADAMTS13 cDNA was determined using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis was performed using the software SPSS v.17.0. Results were expressed as mean \pm SD or median and interquartile range and the difference between the two groups was assessed by *t*-test and Mann Whitney test, respectively. Correlations were investigated by Pearson test and a multivariate linear regression analysis was applied to identify the independent predictors of ADAMTS13 urinary among the variables with a *P*-value < 0.2 in the univariate analysis. *P*-value < 0.05 was considered significant.

3. Results

Before STZ treatment, data from control and diabetic mice groups showed no significant differences in blood glucose levels, body weight and creatinine levels (data not shown, all *P* > 0.05). Three days after STZ administration, glucose levels were ≥ 250 mg/dL, in all treated mice. The urinary creatinine levels were significantly higher in STZ-diabetic mice (1.86 ± 0.93 mg/18 h), when compared to control group (0.85 ± 0.14 mg/18 h; *P* = 0.001). Metabolic and physiological data of control and diabetic groups, at 8 weeks after STZ treatment, are showed in Table 1. The groups did not differ regarding serum urea, serum and urinary creatinine, CrC and relative kidney weight (*P* > 0.05). Blood glucose, water intake and urinary volume were significantly higher in diabetic group, than in controls (*P* < 0.001). In contrast, body weight was significantly lower in diabetic group when compared to control group (*P* < 0.001). The UAE was also significantly increased in diabetic as compared to control group (*P* < 0.001). Urinary levels of ADAMTS13 antigen were higher in diabetic mice when compared to control group (*P* = 0.001). However, ADAMTS13 antigen plasma levels did not differ significantly between diabetic and control groups (*P* = 0.266). A significant difference was also observed when ADAMTS13 antigen levels were evaluated in nanograms per milligram of creatinine (*P* = 0.001) or in 18-hour urine samples (*P* = 0.014). The urinary levels of ADAMTS13 antigen evaluated in nanogram per milligram of creatinine

<http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.028>
0049-3848/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Metabolic and physiological data of control and diabetic groups at 8 weeks after treatment with streptozotocin.

Variable	Control (N = 10)	Diabetic (N = 10)	P
Blood glucose (mg/dL)	147.3 ± 27.8	432.4 ± 62.7	<0.001*
Body weight (g)	25.45 ± 1.07	20.10 ± 1.66	<0.001*
Urine volume (mL/18 h)	1.52 ± 0.61	20.25 ± 7.46	<0.001*
Serum urea (mg/dL)	69.05 ± 10.48	59.69 ± 9.23	0.065
Serum creatinine (mg/dL)	0.48 ± 0.24	0.37 ± 0.24	0.381
Urinary creatinine (mg/18 h)	1.11 (0.35)	4.49 (3.73)	0.051
CrC (mL/min)	0.50 ± 0.78	0.76 ± 0.48	0.454
UAE (µg/18 h)	32.99 ± 10.80	131.11 ± 24.68	<0.001*
Relative kidney weight (mg/g body weight)	0.67 (0.10)	0.73 (0.17)	0.104
Water intake (mL/18 h)	6.56 ± 3.79	27.36 ± 10.48	<0.001*
Plasma ADAMTS13 antigen (ng/mL)	474.16 (362.32)	317.24 (440.72)	0.266
Urinary ADAMTS13 antigen (ng/mL)	4.56 ± 3.56	14.94 ± 5.57	0.001*
Urinary ADAMTS13 antigen (ng/18-hour urine sample)	6.49 (5.21)	493.51 (467.40)	0.014*
Urinary ADAMTS13 antigen (ng/mg Cr)	7.71 ± 5.66	53.17 ± 17.40	0.001*
Plasma VWF (mU/mL)	68.00 ± 33.81	50.88 ± 30.77	0.370

CrC (creatinine clearance); UAE (urinary albumin excretion); Cr (creatinine); VWF (von Willebrand factor). Data are shown as mean ± SD or median (interquartile range). Mean were compared by Student *t*-test and median by Mann-Whitney test.

* *P* < 0.05.

showed a significant and positive correlation with UAE ($r = 0.820$; $P = 0.001$) and blood glucose levels ($r = 0.901$; $P < 0.001$). Curiously, VWF plasma levels were similar in diabetic and control groups ($P = 0.370$). The linear regression analysis showed that the variables independently associated to ADAMTS13 were UAE ($P = 0.001$, $\beta = 4.74$) and blood glucose levels ($P < 0.001$, $\beta = 6.57$), corroborating the results above.

Therefore, we investigated ADAMTS13 gene expression in liver and kidney tissues at 8 weeks after STZ treatment. In diabetic and control groups, a higher ADAMTS13 gene expression was observed in liver when compared to kidney tissue ($P < 0.05$). However, when the comparison was applied between the groups, ADAMTS13 gene expression in liver was higher in diabetic than control group (2.53×). This difference was not observed when compared the expression in kidney (1.00×) between both groups (Fig. 1).

4. Discussion

After 8 weeks post diabetes induction, serum creatinine, CrC and urea serum levels did not differ between the groups, but increased urinary albumin levels were seen in diabetic group. In fact, STZ-treated models develop a glomerular hyperfiltration with modest serum alteration of these metabolites [6,7]. In addition, UAE increased progressively in diabetic group during the observation period, after the induction of diabetes, according to Matsushita et al. [8].

Previously, our group showed that VWF and ADAMTS13 antigen plasma levels were increased in T1DM patients with mild and severe renal dysfunction, but ADAMTS13 activity was higher only in the severe renal dysfunction [1], suggesting that alterations in VWF and ADAMTS13 antigen levels correlate with the nephropathy severity in T1DM patients. The VWF proteolysis by ADAMTS13 may be influenced by a variety of factors, including deficiency or dysfunction of this protease [4]. However, in diabetic patients with impaired renal function, the mechanisms involved in changes of ADAMTS13 and VWF levels are not yet completely established. Here, increased urinary loss of ADAMTS13 in STZ-induced diabetic mice was observed and, noteworthy, correlated

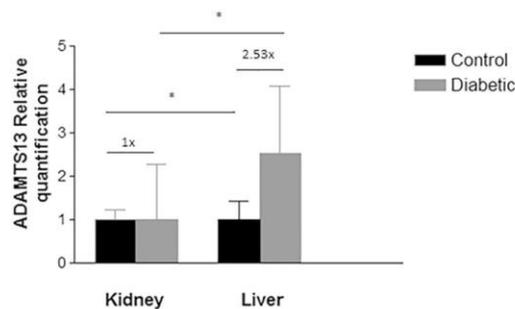


Fig. 1. Relative quantification of ADAMTS13 gene expression in kidney and liver tissues in control and diabetic groups. ADAMTS13 gene expression is higher in liver when compared to kidney in each group ($*P < 0.05$). In liver tissue, ADAMTS13 gene expression was higher (2.53×) in diabetic animals when compared to controls, but it did not differ in kidney tissue between control and diabetic groups (1.00×).

with albumin excretion. Moreover, urinary levels of ADAMTS13 antigen when evaluated in nanograms per milligram creatinine were also significantly correlated to hyperglycemia, suggesting that the loss of ADAMTS13 in urine follows the evolution of kidney disease and metabolic complications in diabetes.

Kidney, platelets, and vascular endothelial cells may produce ADAMTS13, but liver remains as the major site of ADAMTS13 synthesis [3]. In fact, our data demonstrated that STZ-diabetic mice showed more than two-fold change in ADAMTS13 mRNA production in liver, when comparing to control group, while renal ADAMTS13 gene expression remained unchanged. This finding may lead to the proposal that the liver is the main organ responsible for maintaining the normal levels of ADAMTS13 in DN, in order to compensate its urine loss. Corroborating our results, Watanabe et al. demonstrated that ADAMTS13 plasma activity was increased in rats with cholestasis and steatohepatitis and had a significant correlation with ADAMTS13 production in the liver [9]. These findings indicate a significant role of HSCs in regulation of ADAMTS13 activity. The ADAMTS13 gene expression in kidney has been described in podocytes, glomerular endothelium cells, glomerular basement membrane and tubular epithelial cells. ADAMTS13 was also detected in tubuli and in the urine of patients with tubular disorders. Thus, it was proposed that ADAMTS13 in the urine originates from damage in glomerular filtration or injury in tubular cells, since ADAMTS13 is a large protein and should not be filtered into the urine [10].

To our knowledge, this is the first study that evaluated ADAMTS13 and VWF levels in STZ-diabetic mice, as well as ADAMTS13 gene expression in kidney and liver tissues. Our study demonstrated increased urinary ADAMTS13 antigen levels in diabetic mice correlated with renal complications, while its plasma levels remain unchanged. The data suggest a central role of liver up-regulation of ADAMTS13 expression in DN and the correlation of ADAMTS13 urinary loss with renal injury.

Acknowledgements

We thank Mauro Martins Teixeira for the technical support. ACS, LMSD, APF and KBG are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

Conflicts of interest

The author declares no conflicts of interest.

Funding sources

This work was supported by FAPEMIG, CNPq/Brazil, CAPES and PRPq/UFMG.

References

- [1] C.P. Domingueti, L.M.S. Dusse, R.B. Fóscolo, J.S. Reis, J.M. Annichino-Bizzacchi, F.L. Orsi, et al., Von Willebrand factor, ADAMTS13 and D-dimer are correlated with different levels of nephropathy in type 1 diabetes mellitus, *PLoS One* 10 (2015), e0132784.
- [2] H.K. Kim, J.E. Kim, S.H. Park, Y.I. Kim, I.S. Nam-Goong, E.S. Kim, High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications, *J. Diabetes Complicat* 28 (2014) 365–369.
- [3] M. Uemura, K. Tatsumi, M. Matsumoto, M. Fujimoto, T. Matsuyama, M. Ishikawa, et al., Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver, *Blood* 106 (2005) 922–924.
- [4] D.J. Bowen, P.W. Collins, Insights into von Willebrand factor proteolysis: clinical implications, *Br. J. Haematol.* 133 (2006) 457–467.
- [5] G.Y. Lip, A. Blann, Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc. Res.* 34 (1997) 255–265.
- [6] L.L. Kong, H. Wu, W.P. Cui, W.H. Zhou, P. Luo, J. Sun, et al., Advances in murine models of diabetic nephropathy, *J. Diabetes Res.* 2013 (2013) 797548.
- [7] B. Samnegard, S.H. Jacobson, G. Jaremko, B.L. Johansson, K. Ekberg, B. Isaksson, et al., C-peptide prevents glomerular hypertrophy and mesangial matrix expansion in diabetic rats, *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 (2005) 532–538.
- [8] Y. Matsushita, D. Ogawa, J. Wada, N. Yamamoto, K. Shikata, C. Sato, et al., Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice, *Diabetes* 60 (2011) 960–968.
- [9] N. Watanabe, H. Ikeda, Y. Kume, Y. Satoh, M. Kaneko, D. Takai, et al., Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis, *Thromb. Haemost.* 102 (2009) 389–396.
- [10] M. Manea, R. Tati, J. Karlsson, Z.D. Békássy, D. Karpman, Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells, *Pediatr. Nephrol.* 25 (2010) 87–96.

M.T. Alves

*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

M.M.O. Ortiz

G.V.O.P. Reis

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

K.F. Rodrigues

*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

C.P. Domingueti

*Campos Centro Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del Rei,
Divinópolis, MG, Brazil*

P.A.S. Carmo

Exército Brasileiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

A.C.S. Silva

*Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal
de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

L.M.S. Dusse

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

S.A. Araújo

*Anatomia Patológica, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG,
Brazil*

A.P. Fernandes

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

K.B. Gomes

*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

*Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas
Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG CEP
31270-901, Brazil.

E-mail address: karinabgb@ufmg.br.

11 May 2017

Available online xxx

Anexo C – Resultados parciais do doutorado apresentados em eventos científicos

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

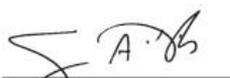
NÍVEIS URINÁRIOS AUMENTADOS DE ADAMTS13 SE CORRELACIONAM COM A DOENÇA RENAL NO MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

dos autores: MICHELLE TEODORO ALVES VIEIRA; MYLENA MAYRA OLIVEIRA ORTIZ; GUILHERME VICTOR OLIVEIRA PIMENTA DOS REIS; KATHRYNA FONTANA RODRIGUES; CAROLINE PEREIRA DOMINGUETI; PAULA ALVES SANTOS DO CARMO; ANA CRISTINA SIMÕES E SILVA; LUCI MARIA SANTANA DUSSE; STANLEY DE ALMEIDA ARAUJO; ANA PAULA FERNANDES; KARINA BRAGA GOMES BORGES, foi apresentado, na modalidade Oral, no evento XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes ocorrido de 16 a 18 de novembro de 2017 no Transamerica Expo Center em São Paulo/SP.

São Paulo, 18 de novembro de 2017




JOÃO EDUARDO NUNES SALLES
Presidente do XXI Congresso da
Sociedade Brasileira de Diabetes


SÉRGIO ATALA DIB
Presidente da Comissão Científica

REALIZAÇÃO



GERENCIAMENTO





50º Congresso Brasileiro de
Patologia Clínica
Medicina Laboratorial

2º Congresso Brasileiro de
Informática Laboratorial

23º Congresso da **ALAPAC/ML**

SBPC/ML & IFCC

Joint Symposium 2016

The Best of AACC 2016

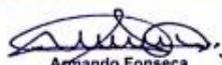
Centro de Convenções SulAmérica Rio de Janeiro RJ
27 a 30 de setembro de 2016

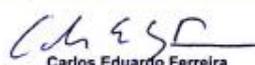
certificado de participação

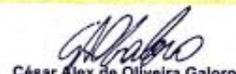
MYLENA MAIRA OLIVEIRA ORTIZ

participou

na qualidade de autor responsável do tema livre "**NÍVEIS URINÁRIOS ELEVADOS DE ADAMTS13 ESTÃO ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO RENAL NO MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1**", tendo como co-autores "BORGES, K. B. G., ALVES, M. T., FERNANDES, A. P., REIS, G. V. O. P.".


Amândio Fonseca
Presidente do 50º Congresso Brasileiro de
Patologia Clínica/Medicina Laboratorial


Carlos Eduardo Ferreira
Coordenador da Comissão Científica do 50º Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial


César Alex de Oliveira Galoro
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2016/2017

Realização 





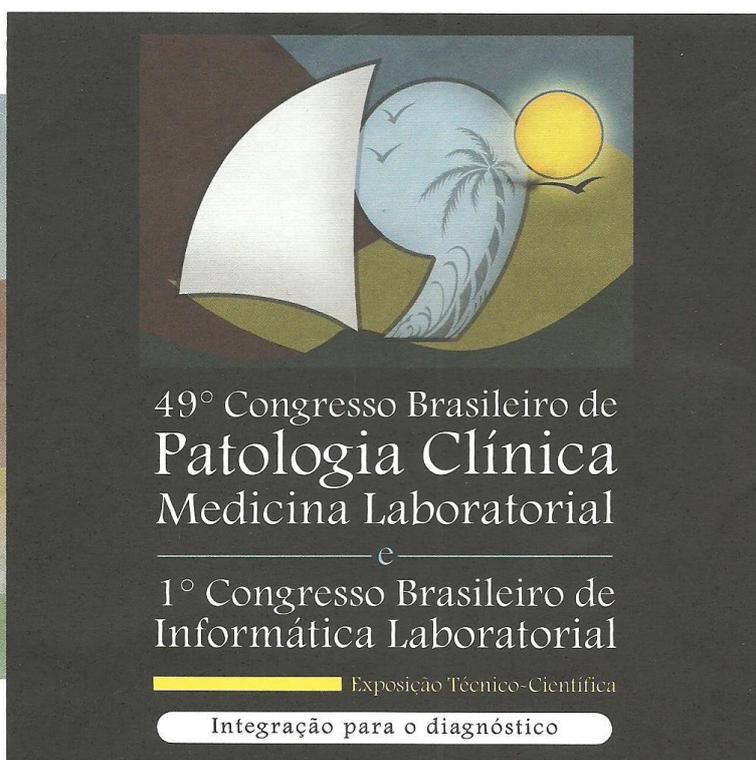




Scanned by CamScanner

certificado de participação

MICHELLE TEODORO ALVES



participou

na qualidade de autor responsável do tema livre "**ADAMTS13 GENE EXPRESSION IS INCREASED IN KIDNEY AND LIVER IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS ANIMAL MODEL**", tendo como co-autores "REIS, G. V. O. P., BORGES, K. B. G., DOMINGUETI, C. P., FERNANDES, A. P.".

Tadeu Sobreira
Presidente do 49º Congresso Brasileiro de
Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

César Alex de Oliveira Galoro
Coordenador da Comissão Científica do 49º Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Paula Távora
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial - Biênio 2014/2015

29 de setembro a **2** de outubro de **2015**
Fortaleza - CE - centro de Eventos do Ceará

Realização



PO042-WED

Anti-ADAMTS13 antibody features (IG isotype titers, functional ADAMTS13 inhibitor and circulating immune complexes [CIC] in patients with acquired thrombosis thrombocytopenic purpura (ATTP) at first consultation in our institution

Kempfer AC¹, Paiva J², Sanchez-Luceros A², Alberto F², Woods A¹, Casinelli MM² and Lazzari MA¹

¹Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina; ²Hemostasia y Trombosis, Instituto De Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional De Medicina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Background: aTTP form is often caused by circulating antibody (ab). The formation of CIC may be a pathophysiologic mechanism in aTTP.

Aims: To evaluate the relationship of ADAMTS13-measurements in 40 patients (P), 28 in acute phase (ap) and 12 non acute phase (nap).

Methods: ADAMTS13 activity (act), antigen (ag) and Free IgG anti-ADAMTS13 ab (free IgG ab) were evaluated by ELISA kits. Functional ADAMTS13 inhibitor (FI) was detected as Ferrari (2007) described. Detection of CIC by co-immunoprecipitation (WB) and ELISA with rabbit anti-ADAMTS13 (ABCAM). Informed consent and ethical approval were obtained.

Results: In ap, act was severely reduced in 26/28P (93%) and reduced in 2/28P (7%). Within 26P Ag was undetectable in 7 (27%), severely reduced in 3 (11%) and reduced in 14 (54%). FI was positive in 24/28P (86%). Free IgG ab was positive in 24/28P (86%). In nap, act was severely reduced in 3/12P (25%) and reduced in 6/12P (50%). Within those 12P, ag was severely reduced in 1 (8%) and reduced in 6 (50%). FI was positive in 8/11P (73%). Free IgG ab was positive in 10/12P (83%). Both Free IgM ab and IgA ab were positive in 1/12P (8%). The capturing ab for CIC showed good sensitivity when tested using a P with a CIC of cut-off of 1.93 normalized OD units. The nonparametric correlation $n = 9$, Spearman $r = 0.695$, $P < 0.04$ between CIC-ELISA and WB was significant ($\alpha=0.05$). In ap, CIC was detected in 9/28P, in 8/26P with severe act deficiency the prevalence of CIC was 33% (95% CI, 16–50%) and in 1/28P with reduced act. Within those 9P, the ag was undetectable in 2P, severely reduced in 2P and reduced in 4P; free IgG ab in 5P and positive FI in 8P. In nap, CIC was detected in 3/12P and in 2/6P with reduced act the prevalence of CIC was 40% (95% CI, 9–70%). Within those 3P ag was reduced in 2, free IgG ab in 2P and negative FI

Conclusion: Only one-third of P with aTTP displayed CIC. If the determination of circulating CIC in a first consultation is of value in predicting potential relapse will be further investigated increasing the number of P with aTTP.

Disclosure of Interest: None declared.

PO043-WED

ADAMTS13 gene expression is increased in kidney and liver in type 1 diabetes mellitus animal model

Alves MT¹, Reis GVOP², Bosco AA³, Quirino BM³, Domingueti CP², Fernandes AP² and Gomes KB^{1,2}

¹Instituto de Ciências Biológicas; ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal De Minas Gerais; ³Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brazil

Background: ADAMTS13 is a proteolytic enzyme responsible for large vWF multimers degradation, involved in blood clotting. Its proteolytic activity prevents the deposition of platelets along capillary lumina under the conditions of high shear stress in glomerular capillaries, commonly observed in diabetic nephropathy. This enzyme is primarily

synthesized in the liver, but is also expressed on platelets, endothelial cells and kidney and is normally present in plasma.

Aims: The aim of this study was to compare the ADAMTS13 gene expression in liver and kidney from type 1 diabetic and control (non-diabetic) mice.

Methods: Type 1 diabetes mellitus was induced in male C57BL/6J mice by intraperitoneal injection of 50 mg kg⁻¹ streptozotocin in citrate buffer (pH 4.5) for five days. Mice in the control group were injected with citrate buffer. All procedures were in accordance with the ethical standards of the Ethical Research Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and with the Helsinki Declaration. The mRNA was obtained from liver and kidney tissues and the ADAMTS13 gene expression was investigated by real-time PCR using a hydrolysis probe. Relative quantification was performed in relation to 18S rRNA gene expression by the 2^{-DeltaDeltaCt} analysis method.

Results: The liver showed higher level of ADAMTS13 gene expression when compared to kidney in both groups. Higher ADAMTS13 gene expression was detected in kidney (2.35x) from diabetic animals when compared to control. However, the difference in the ADAMTS13 gene expression in the liver was lower when compared the two groups (1.20x).

Conclusion: The results indicate that hepatic and renal ADAMTS13 gene expression in diabetic mice was higher when compared to control. Besides, the higher level of ADAMTS13 gene expression in kidney could be associated to a hypercoagulability compensatory mechanism observed in diabetic nephropathy.

Disclosure of Interest: None declared. Acknowledgement: Capes, CNPq and Fapemig.

PO044-WED

An activity-based approach to anti-ADAMTS 13 antibodies

Siegemund A, Scholz U and Siegemund T

Centre for Coagulation Disorders, Mvz Dr. Reising-Ackermann and Partners, Leipzig, Germany

Background: Antibodies against coagulation-related entities can be detected by immunological assays as well as activity-based assays. For example, antibodies associated with HIT II are diagnosed with both methods (HIPA test, anti-PF4 ELISA). On the other hand, coagulation factor inhibitors are usually detected in activity-based Bethesda assay while anti-ADAMTS 13 antibodies are detected using an ELISA.

Aims: An activity-based assay similar to the Bethesda method was performed to quantify anti-ADAMTS 13 antibodies. The method was compared to a classical inhibitor ELISA in patients with pathological ADAMTS 13 activity.

Methods: ADAMTS 13 parameters (activity, antigen and inhibitor) were analysed using test systems from Technoclone GmbH (Vienna, Austria). In cases of pathological activity the inhibitor was measured in the ELISA and, additionally, with a Bethesda-like method based on ADAMTS 13-activity measurement after incubation with normal plasma over 2 h.

Results: Discrepancies between immunological and activity-based assays were observed in regard to anti-ADAMTS 13 antibodies. Only 50% of the inhibitors measured in the ELISA method are positive in the Bethesda-like assay. The other half was found to be non-neutralizing and may be not all of them have diagnostic importance. There is no correlation between inhibitor titre in the ELISA and activity-based assay.

Conclusion: Inhibitors in ELISA and activity-based assays show significant discrepancies. Whether those are of diagnostic relevance remains an open question. Furthermore, the Bethesda-like method can be too insensitive to recognize inhibitors against ADAMTS 13. Similar to HIT II or FVIII inhibitors, anti-ADAMTS 13 inhibitors without



CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO "AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE HIPERCOAGULABILIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO EM NO MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1", FOI APRESENTADO NA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA / PRPQ, PROMOVIDA PELA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, NO PERÍODO DE 19-10-2015 A 28-10-2015.

AUTOR(A): GUILHERME VICTOR O PIMENTA DOS REIS

ORIENTADOR(A): KARINA BRAGA GOMES BORGES, DO(A) FACULDADE DE FARMÁCIA.

CO-AUTORES: MICHELLE TEODORO ALVES, ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES, MYLENA MAIRA OLIVEIRA ORTIZ, BÁRBARA MOREIRA QUIRINO

ADELINA MARTHA DOS REIS
PRÓ-REITORA DE PESQUISA



Anexo D – Outros artigos publicados durante o período de doutorado

REV BRAS HEMATOL HEMOTER. 2015;37(3):190-197



Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org



Update article

Resistance of dialyzed patients to erythropoietin



Michelle Teodoro Alves^a, Sandra Simone Vilaça^b, Maria das Graças Carvalho^a,
Ana Paula Fernandes^a, Luci Maria Sant'Ana Dusse^a, Karina Braga Gomes^{a,*}

^a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2014

Accepted 24 November 2014

Available online 17 February 2015

Keywords:

Dialysis

Erythropoietin

Iron

ABSTRACT

Resistance to recombinant human erythropoietin is a common condition in dialyzed patients with chronic kidney disease and is associated with more hospitalizations, increased mortality and frequent blood transfusions. The main cause of hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin in these patients is iron deficiency. However, a high proportion of patients does not respond to treatment, even to the use of intravenous iron, which indicates the presence of other important causes of resistance. In addition to the iron deficiency, the most common causes of resistance include inflammation, infection, malnutrition, inadequate dialysis, and hyperparathyroidism, although other factors may be associated. In the presence of adequate iron stores, other causes should be investigated and treated appropriately.

© 2015 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is considered a public health problem worldwide with high incidence and prevalence rates.¹ In end-stage renal disease (ESRD), renal function must be replaced by dialysis or renal transplantation.² In Brazil, the number of patients on dialysis has increased gradually over the years. According to the Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), 42,695 and 100,397 patients were under dialysis in 2000 and 2013, respectively.³

Anemia is one of the most frequent early complications of CKD.⁴ The main cause is erythropoietin (EPO) deficiency due to impaired kidney function. However, other causes

should be considered when the severity of anemia is inconsistent with the decrease in renal function; when there is evidence of iron deficiency or matching decreases in hemoglobin, leukopenia and/or thrombocytopenia are also found.⁵

The treatment of anemia in CKD patients usually involves the use of recombinant human erythropoietin (rHuEPO). The main cause of rHuEPO treatment failure is the loss or low iron availability.⁶ The prevalence of iron deficiency is very common in CKD, affecting as many as 50% of patients.⁷ However, despite rHuEPO and intravenous iron in the majority of patients, the prevalence of anemia reaches 34% in Brazil.⁸ This indicates the existence of other important factors related to rHuEPO resistance.

* Corresponding author at: Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail address: karinabgb@gmail.com (K.B. Gomes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.02.001>

1516-8484/© 2015 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.



Parvovirus B19 (B19) and cytomegalovirus (CMV) infections and anti-erythropoietin (anti-EPO) antibodies in patients on dialysis hyporesponsive to erythropoietin therapy

Michelle Teodoro Alves^{a,b}, Sandra Simone Vilaça^c, Lara Carvalho Godoi^d, Leonides Rezende Júnior^d, Maria das Graças Carvalho^b, Franciele de Souza Silva^b, Flávia Loli Guimarães^b, Ana Paula Fernandes^b, Luci Maria SantAna Dusse^b, Karina Braga Gomes^{a,b,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Hospital Felício Rocha, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2013

Received in revised form 28 January 2014

Accepted 29 January 2014

Available online 7 February 2014

Keywords:

Anemia

Anti-erythropoietin antibodies

Cytomegalovirus

Dialyzed patients

Parvovirus B19

ABSTRACT

Background: Approximately 10% of patients receiving recombinant human erythropoietin (rHuEPO) do not respond to the treatment. We evaluated parvovirus B19 (B19) and cytomegalovirus (CMV) infections and anti-erythropoietin (anti-EPO) antibodies as potential causes of anemia in dialyzed patients, hyporesponsive to rHuEPO.

Methods: Data from 120 dialyzed patients, receiving rHuEPO alfa, were collected: demographic characteristics, rHuEPO dose, duration of rHuEPO treatment and time on dialysis, etiology of chronic kidney disease and transfusion history. Serology and PCR were performed to address B19 and CMV infection status. An ELISA was developed to detect anti-EPO antibodies.

Results: rHuEPO resistance correlated with high ferritin levels ($p = 0.001$) and short time on dialysis ($p = 0.012$). B19 DNA was found in 10 (8.3%) dialyzed patients and CMV DNA was detected in 33 (27.5%). There was no significant correlation between B19 infection and anemia, while a tendency of correlation between active CMV infection and hemoglobin levels or hematocrit value ($p = 0.069$ and $p = 0.070$, respectively) has been observed. Anti-EPO antibodies were not detected in any patient.

Conclusions: B19 infection is a rare complication in dialyzed patients and should be investigated after exclusion of other common causes, while CMV infection is rather common. The role of CMV infection in the hyporesponsiveness in dialyzed patients should be further evaluated in other studies. Our data suggest that anti-EPO antibodies are not involved in rHuEPO resistance in this population.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Effect of acetylsalicylic acid on platelet activation and oxidative profile in a set of Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus

Rita C.F. Duarte^a, Lillian H. Gonçalves^b, Fernanda M.F. Campos^a, Olindo A.M. Filho^c, Michelle T. Alves^a, Ana P. Fernandes^a, Karina B.G. Borges^a, Luci M.S. Dusse^a, Mayara C. Faria^a, Gisele S. Gonçalves^{a,d}, Adriana A. Bosco^e, Valéria C. Sandrim^e and Maria G. Carvalho^a

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a metabolic disorder associated with hyperactivation of platelets, increased formation of platelet microparticles (PMPs) and oxidative stress that are related to cardiovascular complications. Acetylsalicylic acid (ASA) is an antiplatelet agent used in the prevention of atherothrombosis. The aim of this study was to evaluate the effect of ASA by means of platelet activation and oxidative profile. We collected blood samples of 81 patients with DM2 before and during ASA treatment. These samples were analyzed to determine the levels of 2,3-dinor thromboxane-B2 (2,3-dinor-TXB2), PMPs, thiobarbituric

associated with a better response to ASA intake in these patients, whereas other clinical and laboratory variables showed no association with this drug use. These findings are consistent with previous reports in the literature that patients with DM2 do not benefit in an equal way from the use of ASA for primary prevention of atherothrombotic events. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 25:000–000 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2014, 25:00–00

Vitamin D receptor polymorphisms and the polycystic ovary syndrome: A systematic review

Guilherme Victor Oliveira Pimenta dos Reis¹, Natália Alves Gontijo¹,
Kathryna Fontana Rodrigues², Michelle Teodoro Alves², Cláudia Natália Ferreira³ and
Karina Braga Gomes^{1,2}

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, ²Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, and ³Colégio Técnico (COLTEC), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most frequent endocrinological disorder that affects women of reproductive age, leading to metabolic alterations, such as hyperandrogenism, obesity, menstrual irregularities, insulin resistance, and polycystic ovaries. The etiology remains unclear, but several genetic and environmental factors have been correlated with manifestations of this syndrome. Vitamin D plays important roles in metabolic pathways affected by PCOS, including calcium homeostasis, the insulin pathway, and sex hormone synthesis. Vitamin D concentration has been related with the severity of this disorder, and vitamin D receptor polymorphisms have been shown in some studies to have an association with some of the patterns presented by PCOS. The objective of this study is to provide an up-to-date review about vitamin D receptor polymorphisms and their association with PCOS.

Key words: hyperandrogenism, insulin resistance, obesity, polycystic ovary syndrome, polymorphisms, vitamin D receptor.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Probes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcpr



Duffy blood group system: New genotyping method and distribution in a Brazilian extra-Amazonian population

Marina Lobato Martins^{a,1}, Adão Rogério da Silva^{a,b,1}, Hadassa Campos Santos^c,
Michelle Teodoro Alves^a, Luciana Cayres Schmidt^a, Stela Brener Vertchenko^a,
Luci Maria SantAna Dusse^b, Maria Clara Fernandes da Silva Malta^{a,*}

^a Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais – Hemominas, MG, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy • Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 March 2017
Received in revised form
18 May 2017
Accepted 2 June 2017
Available online xxx

Keywords:
Duffy blood group system
Real-time PCR
Transfusion
Ancestry
Brazil

ABSTRACT

Duffy blood group system is of interest in several fields of science including transfusion medicine, immunology and malariaology. Although some methods have been developed for Duffy polymorphism genotyping, not all of them have been sufficiently described and validated, and all present limitations. At the same time, the frequency of Duffy alleles and antigens in some densely populated regions of the world are still missing.

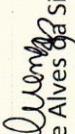
In this study we present new tests for genotyping the major alleles of the Duffy blood system and describe Duffy alleles and antigens in blood donors and transfusion-dependent patients in Minas Gerais, Brazil. A simple and reproducible strategy was devised for Duffy genotyping based on real-time PCR that included SNPs rs12075 and rs2814778. No significant differences between the allele frequencies were observed comparing blood donors and patients. Among the blood donors, the phenotype Fy(a–b+) was the most common and the Fy(a–b–) phenotype, associated with populations of African descent, was remarkably less common among subjects who self-identified as black in comparison to other ethnorracial categories. However, the African ancestry estimated by molecular markers was significantly higher in individuals with the allele associated to the Duffy null phenotype. The genotyping method presented may be useful to study Duffy genotypes accurately in different contexts and populations. The results suggest a reduced risk of alloimmunization for Duffy antigens and increased susceptibility for malaria in Minas Gerais, considering the high frequency of Duffy-positive individuals.

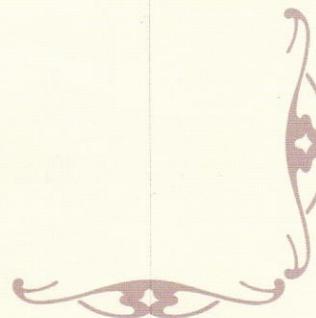
© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

Certificamos que a Mestre **MICHELLE TEODORO ALVES (COORIENTADORA)** participou da banca de defesa da Monografia de Conclusão de Curso da aluna Mylena Maira Oliveira Ortiz, intitulada "*Peptídeo C: Biomarcador de Risco para Doenças Cardiovasculares e sua Relação com o Processo Aterogênico*" realizada na Faculdade de Farmácia da UFMG.

Belo Horizonte, 09 de junho de 2017.


Professora Cristiane Alves da Silva Menezes
Coordenadora do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Minas Gerais



A Coordenadoria de Pós-Graduação e Extensão declara que *Michelle Teodoro Alves* participou das bancas de avaliação como Orientadora do seguinte trabalho de conclusão de curso de Biomedicina da FAMINAS-BH, no segundo semestre de 2015.

Aluno	Título do Trabalho
Adão Rogério da Silva	ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DARC E DA REGIÃO GATA-BOX DE PACIENTES ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Belo Horizonte, 30 de junho de 2016.

Diretora Acadêmica
Ivana de Cássia Raimundo
Diretora Acadêmica

Josyanne Cristina S Honório
Coordenadoria de Pós-Graduação e Extensão

Av. Cristiano Machado, 12001 - Vila Clóris
CEP: 31.744-007 - Belo Horizonte/MG

Educação levada a sério.

FAMINAS-BH
FACULDADE DE MINAS



Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2016

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que **Michelle Teodoro Alves** orientou o estudante Honório Augusto Reis Armond no projeto de pesquisa "Padronização da genotipagem RHCE por PCR em tempo real na Fundação Hemominas", através de Bolsa de Iniciação Científica da FAPEMIG (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), equivalente ao período de 01/03/2015 a 29/02/2016, com carga horária de 20 horas semanais.

Marina Lobato Martins
Gerente de Desenvolvimento
Técnico-Científico
Masp 1050147-6
Fundação Hemominas

Marina Lobato Martins

Coordenadora - Comissão Interna do Programa PIBIC
Fundação HEMOMINAS

Anexo F – Participação em bancas

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

Michelle Tardaro Alves

Atuou como membro da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso (MCC) intitulada "AVALIAÇÃO DA ADEÇÃO À TERAPIA FARMACOLÓGICA E NÃO FARMACOLÓGICA E DO PERFIL DE COMORBIDADES EM PACIENTES DIABÉTICOS INTERNADOS NO HOSPITAL RISOLETA TOLENTINO NEVES." apresentada pela aluna Lais Hott Ramos.

Belo Horizonte, 22 de junho de 2017.

Prane

Prof(a) Dr(a) Cristina Duarte Vianna Soares

Coordenador(a) do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744

cografar@farmacia.ufmg.br www.farmacia.ufmg.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA
DIRETORIA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA E PESQUISA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
Programas de Pós-Graduação *Lato Sensu*

Aos 16 dias do mês de dezembro de 2016, a Comissão Examinadora, composta pelos professores(as):

Kathyma Fontana Rodrigues e Michelle Teodoro Alves reuniu-se para avaliar o trabalho de conclusão de curso de especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas do(a) aluno(a) Vivian Jordania da Silva.

A avaliação do trabalho intitulado: Testes laboratoriais utilizados na detecção da infecção por Zika vírus e as " diferentes amostras biológicas impregnadas " obedeceu aos critérios definidos pelo Núcleo de Trabalhos de Conclusão de Curso, considerando os seguintes itens: apresentação do artigo científico, conteúdo, coerência da proposta, metodologia, revisão de literatura, análise dos resultados e conclusões. No processo de avaliação, os pontos obtidos pelo (a) aluno(a) perfizeram um total de 38 pontos, o que corresponde à situação de aprovada.

Eu, Kathyma Fontana Rodrigues (orientador/a) lavrei a presente ata que segue assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Banca Examinadora:

Orientador (a): Kathyma Fontana Rodrigues
Rodrigues
 Assinatura

Professor (a) Convidado (a): Michelle Teodoro Alves
[Assinatura]
 Assinatura

Coordenadora do Curso: Aline de Oliveira Magalhães Mourão Aline Mourão

Data: 16 / 12 / 16

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA
DIRETORIA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA E PESQUISA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
Programas de Pós-Graduação *Lato Sensu*

Aos 16 dias do mês de dezembro de 2016, a Comissão Examinadora, composta pelos professores(as):

Kathyma Fontana Rodrigues e Michelle Teodoro Alves reuniu-se para avaliar o trabalho de conclusão de curso de especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas do(a) aluno(a) Aline Cristina de Souza Miranda Lucinda.

A avaliação do trabalho intitulado: "Injeção hospitalar em unidades de terapia intensiva e a importância do Staphylococcus aureus como agente causador." obedeceu aos critérios definidos pelo Núcleo de Trabalhos de Conclusão de Curso, considerando os seguintes itens: apresentação do artigo científico, conteúdo, coerência da proposta, metodologia, revisão de literatura, análise dos resultados e conclusões. No processo de avaliação, os pontos obtidos pelo (a) aluno(a) perfizeram um total de 33 pontos, o que corresponde à situação de aprovada.

Eu, Kathyma Fontana Rodrigues (orientador/a) lavrei a presente ata que segue assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Banca Examinadora:

Orientador (a): Kathyma Fontana Rodrigues
Rodrigues
 Assinatura

Professor (a) Convidado (a): Michelle Teodoro Alves
Alves
 Assinatura

Coordenadora do Curso: Aline de Oliveira Magalhães Mourão Aline Mourão

Data: 16 / 12 / 16

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA
DIRETORIA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA E PESQUISA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
Programas de Pós-Graduação *Lato Sensu*

Aos 16 dias do mês de dezembro de 2016, a Comissão Examinadora, composta pelos professores(as):

Kathyrna Fontana Rodrigues e Michelle Teodoro Alves reuniu-se para avaliar o trabalho de conclusão de curso de especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas do(a) aluno(a) Glinda Thuanu Costa Muniz.

A avaliação do trabalho intitulado: “O uso do cabelo como matriz biológica para a determinação de drogas facilitadoras de crimes.” obedeceu aos critérios definidos pelo Núcleo de Trabalhos de Conclusão de Curso, considerando os seguintes itens: apresentação do artigo científico, conteúdo, coerência da proposta, metodologia, revisão de literatura, análise dos resultados e conclusões. No processo de avaliação, os pontos obtidos pelo (a) aluno(a) perfizeram um total de 34 pontos, o que corresponde à situação de aprovada.

Eu, Kathyrna Fontana Rodrigues (orientador/a) lavrei a presente ata que segue assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Banca Examinadora:

Orientador (a): Kathyrna Fontana Rodrigues
Rodrigues
 Assinatura

Professor (a) Convidado (a): Michelle Teodoro Alves
Alves
 Assinatura

Coordenadora do Curso: Aline de Oliveira Magalhães Mourão Aline Mourão

Data: 16 / 12 / 16

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA
DIRETORIA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA E PESQUISA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
Programas de Pós-Graduação *Lato Sensu*

Aos 16 dias do mês de dezembro de 2016, a Comissão Examinadora, composta pelos professores(as):

Kathya Fontana Rodrigues e Michelle Teodoro Alves reuniu-se para avaliar o trabalho de conclusão de curso de especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas do(a) aluno(a) Débora Nascimento da Fonseca.

A avaliação do trabalho intitulado: Validação de um ensaio TaqMan® para o diagnóstico molecular da mutação "202 G>A no gene da glicose 6-fosfato desidrogenase"

obedeceu aos critérios definidos pelo Núcleo de Trabalhos de Conclusão de Curso, considerando os seguintes itens: apresentação do artigo científico, conteúdo, coerência da proposta, metodologia, revisão de literatura, análise dos resultados e conclusões. No processo de avaliação, os pontos obtidos pelo (a) aluno(a) perfizeram um total de 30 pontos, o que corresponde à situação de aprovada.

Eu, Kathya Fontana Rodrigues (orientador/a) lavrei a presente ata que segue assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Banca Examinadora:

Orientador (a): Kathya Fontana Rodrigues
Rodrigues
 Assinatura

Professor (a) Convidado (a): Michelle Teodoro Alves
Alves
 Assinatura

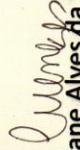
Coordenadora do Curso: Aline de Oliveira Magalhães Mourão Aline Mourão

Data: 16 / 12 / 16

FACULDADE DE FARMÁCIA COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

Certificamos que a Doutoranda **MICHELLE TEODORO ALVES** participou da banca de defesa da Monografia de Conclusão de Curso da aluna Natália Alves Gontijo, intitulada "*Associação dos Polimorfismos Apal, Bsm1, FokI e TaqI no Gene do Receptor de Vitamina D com a Síndrome dos Ovários Policísticos*" realizada na Faculdade de Farmácia da UFMG.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2016.



Professora Cristiane Alves da Silva Menezes
Coordenadora do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Minas Gerais



CERTIFICADO

FACULDADE DE FARMÁCIA
COLEGIADO DO CURSO DE FARMÁCIA



Certificamos que a farmacêutica-bioquímica Msc. **Michelle Teodoro Alves** participou da banca de defesa da monografia de conclusão de curso da aluna **Thais de Cerqueira Lima Nogueira**, intitulada "Influência da microbiota intestinal no diabetes mellitus tipo 2", realizada na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 16 de junho de 2015.


Professora Juliana Alvares

Coordenadora do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

UFMG



ATESTADO DE PARTICIPAÇÃO

Nós, professores abaixo-assinados, declaramos que o(a) discente do curso de Farmácia **Rafaella Teixeira de Melo Diniz**, RA **095350117**, cuja apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso intitulada **“Papel do peptídeo C no desenvolvimento de Complicações Crônicas no Diabetes Mellitus”** apresentada no dia 28/11/2014, foi considerado(a) aprovado(a), observando as orientações da Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Caroline Pereira Domingueti

Caroline Pereira Domingueti
PRESIDENTE (Orientador)

Michele Conceição Pereira

Michele Conceição Pereira
MEMBRO TITULAR

Michele Teodoro Alves

Michele Teodoro Alves
MEMBRO TITULAR

Marcelo Gonzaga de Freitas Araujo
SUPLENTE

Divinópolis, 28 de novembro de 2014.

www.ufsj.edu.br

Campus Rio Preto
13.640-000 - SP
11 3632 2162
11 3632 2162
44.199-1162

Campus São Carlos
13.640-000 - SP
11 3632 2162
11 3632 2162
44.199-1162

Campus Leopoldo de Almeida
13.640-000 - SP
11 3632 2162
11 3632 2162
44.199-1162

Campus São João del-Rei
13.640-000 - SP
11 3632 2162
11 3632 2162
44.199-1162

Campus Santa Cruz da Serra
13.640-000 - SP
11 3632 2162
11 3632 2162
44.199-1162

Campus Dona Lindu
13.640-000 - SP
11 3632 2162
11 3632 2162
44.199-1162

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Certificado

Certificamos que **MICHELLE TEODORO ALVES** compôs a banca examinadora do trabalho intitulado “**ADIPOCINAS: ASPECTOS BIOQUÍMICOS NA OBESIDADE**” apresentado pela aluna *Vanessa Cristina Lima Ferreira* do IV Curso de Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, no dia 26/02/2014.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.



PROFESSOR CARLOS ALBERTO TAGLIATI

COORDENADOR DO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS