

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular

Sara de Castro Oliveira

**ESTRESSE OXIDATIVO E VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DOENÇA  
RENAL DO DIABETES**

Belo Horizonte

2024

Sara de Castro Oliveira

**ESTRESSE OXIDATIVO E VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DOENÇA  
RENAL DO DIABETES**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção de título de mestre junto ao programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Fabio Vasconcellos Comim

Belo Horizonte

2024

Oliveira, Sara de Castro.  
OL48e Estresse Oxidativo e Vesículas Extracelulares na Doença Renal do Diabetes [recursos eletrônicos]. / Sara de Castro Oliveira. - - Belo Horizonte: 2024.  
100f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Fabio Vasconcellos Comim.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Estresse Oxidativo. 2. Vesículas Extracelulares. 3. Nefropatias. 4. Diabetes Mellitus. 5. Dissertação Acadêmica. I. Comim, Fabio Vasconcellos. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WJ 300

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**ATA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**MEDICINA MOLECULAR**

Realizou-se, no dia 21 de maio de 2024 às 14:00 horas, 5º andar, sala 526 / Híbrida, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **ESTRESSE OXIDATIVO E MICROPARTÍCULAS NA DOENÇA RENAL DO DIABETES** apresentada por SARA DE CASTRO OLIVEIRA, número de registro 2021656327, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: **Prof. Fábio Vasconcellos Comim- Orientador (UFMG)**, **Prof. Rafael Noal Moresco (UFSM)**, **Profa. Melissa Orlandin Premaor (UFMG)**. Inicialmente, o presidente fez a apresentação dos demais componentes da Comissão Examinadora. Em seguida, a aluna fez a apresentação de sua Dissertação de Mestrado. Seguiu-se à arguição pela Comissão Examinadora, com a respectiva defesa da aluna. Logo após, a Comissão reuniu-se sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado da avaliação do trabalho final da aluna e a considerou **APROVADA**, sugerindo alteração do título para : "ESTRESSE OXIDATIVO E VESÍCULAS EXTRA-CELULARES NA DOENÇA RENAL DO DIABETES". O resultado final foi comunicado publicamente á candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 21 de maio de 2024.

Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Melissa Orlandin Premaor, Professora do Magistério Superior**, em 27/05/2024, às 08:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Noal Moresco, Usuário Externo**, em 28/05/2024, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Vasconcellos Comim, Professor do Magistério Superior**, em 01/06/2024, às 21:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3262716** e o código CRC **436D9F4B**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA

Professora Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR

Professor Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professora Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Professor Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETORA

Professora Alamanda Kfoury Pereira

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR

Professor Luiz Armando Cunha de Marco

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido Andrey (em memória), por me ensinar que a vida pode ser muito boa, mas imprevisível, e às vezes, curta. Por isso deve ser vivida intensamente.

Ao meu orientador Fabio Vasconcellos Comim pelo apoio incondicional durante toda essa trajetória. Esteve presente e ativo em todas as etapas desse projeto e se tornou um exemplo de mestre, pesquisador e pessoa, me auxiliando em todos os momentos de dúvidas, incertezas e dificuldades. Sem o seu apoio, esse sonho não seria possível.

Aos meus pais Rosana e Luiz e ao meu irmão Arnon pela força e paciência nos momentos complicados pelos quais passei durante a realização desse projeto.

Aos amigos, em especial a Rubinha, por trazer luz e alegria aos dias mais difíceis.

Aos colegas de trabalho, principalmente ao Arnaldo, pelo suporte e conselhos na medicina e na vida.

À banca examinadora (Professora Melissa Premaor, Professor Rafael Noal, Professor Marcio Lauria) pela disponibilidade e análise da dissertação.

Aos professores Rafael Noal Moresco (LABCLIN UFSM) e Juliano Coelho Silveira (FZEA USP) pela análise e processamento das amostras.

Aos residentes do IPSEMG que participaram de forma direta ou indireta dessa pesquisa e contribuíram para sua conclusão, em especial Ana Clara e Flavia.

A todos os funcionários do IPSEMG e Hospital das Clínicas que permitiram que o projeto fosse executado, desde a coleta de materiais e dados ao processamento e armazenamento dos materiais.

Aos pacientes, por doarem seu tempo e permitirem o uso de suas informações na pesquisa.

## RESUMO

A Doença Renal do Diabetes (DRD) é uma causa importante de morbimortalidade na população adulta com *Diabetes Mellitus* Tipo 1 (DM1). O desenvolvimento da DRD é complexo e multifatorial, sendo associado a desarranjos metabólicos (controle de glicose e lipídios), aumento no estado inflamatório e estresse oxidativo, ativação da cascata renina-angiotensina-aldosterona e outras anormalidades hemodinâmicas (hipo ou hiperglomerular filtração). Mais recentemente, o papel dos microRNAs transportados por vesículas extracelulares (EVs) ou circulando livremente no sangue tem sido sugerido como um novo possível mecanismo de estabelecimento da DRD. Novos marcadores têm sido explorados porque uma parte dos pacientes com DRD evolui com perda de função renal apesar de não apresentar perda de albumina urinária. Nosso estudo explorou a associação de anormalidades em vesículas extracelulares (EVs) e marcadores de estresse oxidativo em três grupos distintos de pacientes ambulatoriais: controles normais, DM1 sem DRD e com DRD. Para este estudo, aprovado pelo comitê de ética, controles e DM1 foram recrutados nos ambulatórios de Diabetes do IPSEMG e/ou no Hospital das Clínicas da UFMG. No total, 124 participantes, 61 controles normais, 42 DM1 (sem DRD) e 21 DRD definidos de acordo com as diretrizes KDIGO foram incluídos. Os dados clínicos (antropometria, pressão arterial, presença ou não de complicações micro e macrovasculares no caso de diabetes, uso de medicamentos) e bioquímicos (glicemia, provas de função renal, aferição de medida albumina/creatinina, perfil lipídico) foram obtidos desses grupos. O isolamento e caracterização de EVs a partir do soro foram obtidos através de uma série de processos, incluindo a ultracentrifugação e a caracterização de EVs foi identificada por marcadores proteicos específicos por *western blot*, com a morfologia verificada por Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI Tecnai 20; emissão LAB6; 200 kV). O tamanho e a concentração de partículas de EVs foram determinados pelo instrumento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Reino Unido). O *Status* Oxidante Total (TOS), Capacidade Antioxidante Total (TAC), Produtos de Oxidação Avançada de Proteínas (AOPP), FRAP (Poder Antioxidante Redutor Férrico), Ácido Úrico, e os níveis de Aloxano foram determinados no soro. Como um todo, os três grupos (controle + DM1 + DM1 DRD) foram semelhantes quanto à idade (média  $\pm$  DP) de  $40.3 \pm 13.7$  anos, IMC de  $25.8 \pm 5.1$  Kg/m<sup>2</sup> e Circunferência Abdominal de  $89.6 \pm 12.3$

cm. A razão albumina/creatinina foi estatisticamente diferente entre os grupos, sendo sua mediana [IC 95%] de 4.0 [3,9-5,14] mg/g em Controles, 6.4 [5.5-10.0] mg/g em DM1 e 81.4 [48.5-1415] mg/g em DRD ( $p < 0.001$ ). Os indivíduos com DRD apresentaram maior pressão arterial sistólica (PAS) e uma proporção aumentada de retinopatia e neuropatia do que DM1, mas os níveis de HbA1c foram semelhantes entre os dois grupos de diabetes (DM1 e DM1+DRD). Pacientes com DRD apresentam uma Razão TOS/TAC aumentada (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/L / mmol Trolox Equiv/L) (ANOVA  $p < 0,001$ ) superior a DM1 e controles. A média  $\pm$  DP foi de 61,1  $\pm$  31,0 em Controles, 103,0  $\pm$  68 em DM1 e 145,0  $\pm$  62,8 em DRD. Curiosamente, DM1 apresentou uma Razão TOS/TAC aumentada em relação aos Controles. Nenhuma modificação em AOPP ou FRAP pôde ser observada entre os três grupos. Houve uma diminuição gradual no tamanho dos EVs (mas não na concentração) em pacientes com DRD em comparação com DM1 e controles, e DM1 com controles. A média do tamanho da moda dos EVs foi (média  $\pm$  SE) 144,5  $\pm$  3,04 nm em Controles versus 136,14  $\pm$  3,5 nm em DM1 e 135,4  $\pm$  3,6 nm em DRD (ANOVA  $p = 0,04$ ). A concentração foi (média  $\pm$  SE) 4,57  $\times 10^9 \pm 5,57 \times 10^8$  partículas/mL em Controles, 3,58  $\times 10^9 \pm 2,9 \times 10^8$  partículas/mL em DM1 e 3,94  $\times 10^9 \pm 3,7 \times 10^8$  partículas/mL em DRD (NS). Nossos resultados sugerem uma associação entre aumento do estresse oxidativo (razão TOS/TAC) e redução do tamanho de microvesículas na presença de DM1 e DRD.

**Palavras-chave: doença renal do diabetes; estresse oxidativo vesículas extracelulares.**



## ABSTRACT

Diabetic kidney disease (DKD) is an important cause of morbimortality in the adult population with Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM). The development of DKD is complex and multifactorial, being associated with metabolic disarrangements (glucose and lipid control), increase in inflammatory and oxidative stress status, activation of the renin-angiotensin-aldosterone cascade and other hemodynamics abnormalities (hypo or hyper glomerular filtration). More recently, the role of microRNAs carried by extracellular vehicles (EVs) or freely circulating in the blood has been suggested as a new possible mechanism of DKD establishment. In this context, new markers have been explored since some patients with DKD evolve with kidney failure despite not present albuminuria. Our study explored the association of abnormalities in extracellular vehicles (EVs) and oxidative stress markers in three distinct groups of clinical outpatients: normal controls, T1DM (without DKD), and DKD. For this study, approved by the Ethics committee, controls and T1DM were recruited at the Diabetes outpatient clinics at IPSEMG and/or at Hospital das Clinicas da UFMG. Overall, 124 participants, 61 normal controls, 42 T1DM (without DKD), and 21 DKD defined according the KDIGO guidelines were included. Clinical (anthropometry data, blood pressure, evaluation of the presence of diabetes micro-and-macrovascular complications) and biochemical data (glucose levels, kidney function evaluation, albumin/creatinine ratio, lipid profile and C reactive protein) were obtained from these groups. The isolation and characterization of EVs from serum were obtained through a series of processes, including the ultracentrifugation and characterization of EVs was identified by specific protein markers by western blot morphology checked by Scanning Electron Microscope (FEI Tecnai 20; LAB6 emission; 200 kV). EVs particle size and concentration were determined by NanoSight NS300 instrument (Malvern Panalytical, UK). Total Oxidant Status (TOS), Total Antioxidant Capacity (TAC), Advanced Oxidation of Protein Products (AOPP), (Ferric Reducing Antioxidant Power), C reactive Protein, Uric Acid, Aloxan levels were determined in the serum or the plasma. The three groups (control+ DM1+ DM1 DKD) were similar regarding age (mean  $\pm$  SD) of  $40.3 \pm 13.7$  years, BMI  $25.8 \pm 5.1$  Kg/m<sup>2</sup>, and Abdominal Circumference  $89.6 \pm 12.3$  cm. The albumin/creatinine ratio was statistically different among the groups,

being its (median [95%CI]) of 4.0 [3.9-5.14] mg/g in Controls, 6.4[5.5-10.0]mg/g in T1DM, and 81.4 [48.5 -1415] mg/g in DKD ( $p<0.001$ ). The DKD patients exhibited higher SBP and an increased proportion of retinopathy and neuropathy than T1DM, but HbA1c levels were similar between the two diabetes groups (DM1 and DM1+DKD). Patients with DKD show an increased TOS/TAC Ratio ( mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/L /mmol Trolox Equiv/L) (ANOVA  $p<0.001$ ) superior to T1DM and controls. The mean  $\pm$  SD was  $61.1 \pm 31.0$  in Controls,  $103.0 \pm 68$  in T1DM, and  $145.0 \pm 62.8$  in DKD. Interestingly, T1DM exhibited an increased TOS/TAC Ratio than Controls. No modifications in AOPP or FRAP could be observed among the three groups. There is a gradual decrease in EVs size (but not concentration) in patients with DKD in comparison to T1DM and controls, and T1DM with controls. The mean of the moda size of EVs was (mean  $\pm$  SE)  $144.5 \pm 3.04$  nm in Controls versus  $136.14 \pm 3.5$  nm in T1DM, and  $135.4 \pm 3.6$ nm in DKD (ANOVA  $p=0.04$ ). The concentration was (mean  $\pm$  SE)  $4.57 \times 10^9 \pm 5.57 \times 10^8$  particles/mL in Controls,  $3.58 \times 10^9 \pm 2.9 \times 10^8$  particles/mL in T1DM and  $3.94 \times 10^9 \pm 3.7 \times 10^8$  particles/mL in DKD (NS). Our results suggest an association of increased oxidative stress status (TOS/TAC ratio) and reduced microEVsicle size in the presence of T1DM and DKD.

**Keywords: diabetes kidney disease; oxidative stress, extracellular vesicles.**

## FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Participação das espécies reativas de oxigênio na fisiopatologia da aterosclerose.....	21
<b>Figura 2-</b> Fisiopatologia da Doença Renal do Diabetes .....	23
<b>Figura 3-</b> Fisiopatologia da Retinopatia Diabética .....	24
<b>Figura 4-</b> Fisiopatologia da Neuropatia Diabética.....	24
<b>Figura 5-</b> Esquema representativo da Doença Renal do Diabetes .....	28
<b>Figura 6-</b> O papel central das espécies reativas de oxigênio nas complicações do diabetes.....	75
<b>Figura 7-</b> Biogênese e liberação de vesículas extracelulares.....	38
<b>Figura 8-</b> TOS nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle.....	54
<b>Figura 9-</b> TAC nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle.....	54
<b>Figura 10-</b> Razão TOS/TAC nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle .....	55
<b>Figura 11-</b> AOPP nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle .....	55
<b>Figura 12-</b> FRAP nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle .....	56
<b>Figura 13-</b> Razão aloxano/ácido úrico nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle .....	56
<b>Figura 14-</b> Concentração das EVs nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle .....	57
<b>Figura 15-</b> Tamanho das EVs nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle .....	57

## TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Classificação do Diabetes <i>Mellitus</i> .....	16
<b>Tabela 2-</b> Estadiamento da doença renal crônica.....	29
<b>Tabela 3 -</b> Comparação entre os diferentes tipos de EVs.....	39
<b>Tabela 4 -</b> Critérios diagnósticos para DM em adultos não grávidos .....	41
<b>Tabela 5 -</b> Características dos participantes do estudo .....	52

## **ABREVIATURAS**

**ANTI-GAD:** anti descarboxilase do ácido glutâmico

**ANTI-IA2:** anti ilhota

**AOPP:** *advanced oxidation protein products*

**AVC:** acidente vascular cerebral

**CA:** circunferência abdominal

**CF:** citometria de fluxo

**CKD-EPI:** *chronic kidney disease epidemiology collaboration*

**DM:** diabetes *mellitus*

**DM1:** diabetes *mellitus* tipo 1

**DM2:** diabetes *mellitus* tipo 2

**DRC:** doença renal crônica

**DRT:** doença renal terminal

**DRD:** doença renal do diabetes

**EROS:** espécies reativas de oxigênio

**FRAp:** *ferric reducing antioxidante power*

**GSH:** glutationa

**HBA1C:** hemoglobina glicosilada

**HDL:** *high density lipoprotein*

**HLA:** *human leucocyte antigen*

**IAM:** infarto agudo do miocárdio

**IL:** interleucina

**IMC:** índice de massa corporal

**IPSEMG:** instituto de previdência dos servidores do estado de minas gerais

**KDIGO:** *kidney disease: improving global outcomes*

**LDL:** *low density lipoprotein*

**ND:** neuropatia diabética

**NOX:** *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*

**MBG:** membrana basal glomerular

**ON:** óxido nítrico

**PAD:** pressão arterial diastólica

**PAS:** pressão arterial sistólica

**PKC:** *protein kinase C*

**PVDM:** pessoas que vivem com diabetes *mellitus*

**PVDM1:** pessoas que vivem com diabetes *mellitus* tipo 1

**PVDM2:** pessoas que vivem com diabetes *mellitus* tipo 2

**RD:** retinopatia diabética

**SOD:** superóxido desmutase

**TFG:** taxa de filtração glomerular

**TAC:** *total antioxidant capacity*

**TOS:** *total oxidant status*

**UFMG:** universidade federal de minas gerais

**VEE:** vesículas extracelulares derivadas de endotélio

**VEM:** vesículas extracelulares derivadas de monócitos

**VEP:** vesículas extracelulares derivadas de plaquetas

**EVs:** vesículas extra-celulares

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Diabetes: Conceito, Classificação e Epidemiologia .....	16
1.1.1 Conceito.....	16
1.1.2 Classificação.....	16
1.1.3 Epidemiologia .....	17
1.2 Complicações do DM .....	18
1.2.1 Complicações Macrovasculares .....	19
1.2.2 Complicações Microvasculares .....	21
1.3 Inflamação e Estresse Oxidativo.....	29
1.3.1 Sistemas oxidantes.....	30
1.3.2 Sistema antioxidantes.....	31
1.3.3 Mensuração do estado oxidativo e antioxidativo .....	32
1.4 Estresse oxidativo e doença renal .....	34
1.5 Vesículas extracelulares (EVs) .....	37
2. OBJETIVOS .....	40
2.1 Objetivos primários .....	41
2.2 Objetivos secundários.....	41
3. METODOLOGIA.....	42
3.1 Desenho do estudo e considerações éticas.....	43
3.2 Participantes .....	43
3.2.1 Critérios de inclusão .....	43
3.2.2 Critérios de exclusão .....	45
3.2.3 Avaliação clínica .....	45
3.3 Cálculo amostral .....	48
3.3 Análise estatística .....	48
4. RESULTADOS .....	50
4.1 Características clínicas e metabólicas da população estudada.....	51
4.2 Parâmetros do Estresse Oxidativo e Inflamação (TOS, TAC, FRAP, AOP <sup>2</sup> , PCR) .....	51
4.3 Vesículas Extracelulares .....	51
5. DISCUSSÃO .....	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	66

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
8. ANEXOS .....	88

## **1. INTRODUÇÃO**



## 1.1 Diabetes: Conceito, Classificação e Epidemiologia

### 1.1.1 Conceito

O *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença crônica, caracterizada pelo metabolismo anormal de carboidratos e hiperglicemia, decorrente da deficiência de insulina ou resistência à sua ação. Trata-se uma condição multifatorial, complexa e com apresentação clínica heterogênea (TUOMILEHTO et al., 2001), (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014), (SELVIN et al., 2007).

### 1.1.2 Classificação

O DM pode ser categorizado em:

- 1) DM tipo1 (DM1), causado pela destruição autoimune das células beta, resultando na deficiência absoluta de insulina;
- 2) DM tipo 2 (DM2), causado pela resistência à insulina e perda progressiva da célula beta;
- 3) DM Gestacional, que se caracteriza pela hiperglicemia diagnosticada durante a gestação;
- 4) Tipos específicos de DM: DM monogênico, doenças do pâncreas exócrino, DM induzido por drogas (glicocorticoides, tratamento para HIV, entre outros) ;

Ver tabela 1

**Tabela 1**- Classificação do *Diabetes Mellitus*

---

*Diabetes Mellitus* tipo1

- Imunomediado
- Não imunomediado

## *Diabetes Mellitus Tipo 2*

### *Diabetes Gestacional*

Outros tipos: defeitos monogênicos das funções da célula beta, defeitos monogênicos na ação da insulina, deficiência do pâncreas exócrino entre outros

---

Fonte: Adaptado de – *Standars of Care in Diabetes – 2023*.

O DM1 e DM2 são doenças heterogêneas nas quais as apresentações clínicas e progressão podem variar consideravelmente, de forma que pode haver dificuldade para se definir o tipo de DM ao diagnóstico. Idade < 35 anos, perda de peso não intencional e ausência de obesidade, cetoacidose e hiperglicemia grave são mais sugestivas de DM1 (HOLT et al., 2021b).

O DM1 representa um transtorno autoimune que afeta indivíduos após o primeiro ano de vida até a idade adulta. Diversos genes influenciam seu desenvolvimento, incluindo genes encontrados no sistema HLA (antígeno leucocitário humano); O papel dos genes não-HLA no desenvolvimento do DM1 foi definido em estudos recentes (HOLT, 2021).

### 1.1.3 Epidemiologia

O DM afeta 537 milhões de pessoas entre 20-79 anos em todo o mundo. Dados do *International Diabetes Federation* (IDF) estimam que 2030 e 2045, 643 milhões e 783 milhões de adultos terão diabetes. Noventa e oito por cento dos casos de DM são classificados como DM2. (MAGLIANO; BOYKO; IDF DIABETES ATLAS 10TH EDITION SCIENTIFIC COMMITTEE, 2021).

A prevalência geral do diabetes (DM1 e DM2) aumenta com a idade, sendo 2,2% entre adultos de 20-24 anos e 24% entre 75-79 anos (MAGLIANO, 2021). Sua

prevalência pode variar entre as populações. Os países com maiores taxas de prevalência de DM2 são Paquistão (30,8%), Polinésia Francesa (25,2%) e Kuwait (24,9%) (MAGLIANO, 2021).

Dados do Vigitel Brasil 2021, mostram que das 27 cidades avaliadas, a frequência de diabetes (independentemente do tipo) foi de 9,1%, sendo 9,6% entre as mulheres, e 8,6% entre os homens. Em ambos os sexos, a prevalência aumentou consideravelmente com a idade e diminuiu com o nível de escolaridade (DA SILVA et al., 2021).

A incidência de DM1 varia com idade e sexo. Maiores taxas de incidência foram relatadas na Finlândia e na Sardenha. Nos Estados Unidos, a taxa anual de incidência de DM1 em crianças e adolescentes é de 22,3 por 100 mil pessoas, com diferença entre etnias. Em brancos a incidência é de 27,3 por 100 mil, em negros, 20,8 e hispânicos, 16,3 (DIVERS *et al.*, 2020). A idade de apresentação do DM1 na infância tem um pico bimodal, um entre 4 e 6 anos de idade e um segundo pico no início da puberdade (10-14 anos) (MAGLIANO; BOYKO; IDF DIABETES ATLAS 10TH EDITION SCIENTIFIC COMMITTEE, 2021).

A prevalência de DM1 vem aumentando nos últimos anos. Um estudo mostrou que entre pacientes com 19 anos ou menos, a prevalência dessa condição teve um incremento de 1,48 por 1.000 pessoas em 2001 para 1,93 em 2009 e 2,15 em 2017. Isso representa um aumento absoluto de 0,67 por 1.000 pessoas e um aumento relativo de 45,1% por 1000 pessoas ao longo de 16 anos. A maior elevação absoluta foi observada entre brancos não hispânicos e negros não hispânicos (DE BOER, 2011).

## 1.2 Complicações do DM

A hiperglicemia crônica causada pelo diabetes pode resultar em diversas complicações associadas a elevadas morbimortalidade e elevação dos custos de saúde.

As complicações do DM são classificadas em microvasculares e macrovasculares e serão discutidas a seguir.

### 1.2.1 Complicações macrovasculares

#### 1.2.1.1 Aspectos gerais das complicações macrovasculares

Doença cardiovascular é a principal causa de morte em pacientes com diabetes. Essas complicações são secundárias à doença aterosclerótica, que acomete principalmente as artérias que suprem o miocárdio, cérebro e extremidades inferiores (NESTO, 2001).

DM e intolerância à glicose aumentam o risco de doença cardiovascular em três a oito vezes, de forma que 40% dos pacientes hospitalizados por infarto agudo do miocárdio (IAM) tem DM e 35% têm intolerância à glicose (NESTO, 1988), (HAFFNER *et al.*, 1998).

Após 20 a 40 anos de doença, 33% das pessoas que vivem com DM (PVDM) apresentam doença miocárdica sintomática ou assintomática (NESTO, 1988). Dados do UKPDS mostram que, durante o seguimento de 10 anos, cerca de 8% das pessoas que vivem com DM2 (PVDM2) faleceram de IAM ou morte súbita (UKPDS, 1998). O estudo Framingham mostrou que, em pessoas sem diabetes a mortalidade em 10 anos para morte cardiovascular foi de 4% (NESTO, 2001).

PVDM sem história prévia IAM apresentam o mesmo risco de IAM que pessoas sem DM, mas com infarto prévio (20 e 19% respectivamente) (NCEP, 2001), (CAVENDER *et al.*, 2015).

DM também é um fator de risco importante para doença cerebrovascular. O estudo Framingham demonstrou um aumento da morbimortalidade por doença cerebrovascular em PVDM (NESTO, 2001). PVDM tem aproximadamente o dobro de risco de acidente vascular cerebral (AVC) em comparação com pessoas sem DM (ARVANITAKIS *et al.*, 2006), (JANGHORBANI *et al.*, 2007) (EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION *et al.*, 2010).

Em um estudo prospectivo Finlandês, com seguimento de 15 anos, DM foi o fator isolado que mais impactou o risco de AVC, com risco relativo para homens de 3,4 e para mulheres de 4,9. DM é um importante fator de risco para AVC isquêmico, mas não para AVC hemorrágico (TUOMILEHTO, 1996).

#### 1.2.1.1 Fisiopatogenia das complicações macrovasculares

Múltiplos fatores contribuem para a patogênese da aterosclerose, incluindo disfunção endotelial, dislipidemia, inflamação e fatores imunológicos, ruptura da placa e tabagismo.

O endotélio forma uma interface biológica ativa entre a fluxo de sangue e outros tecidos. Disfunção da vasodilatação endotelial é o passo inicial na aterosclerose e acredita-se que seja casuada pela redução do óxido nítrico (ON) endotelial (KITTA *et al.*, 2009).

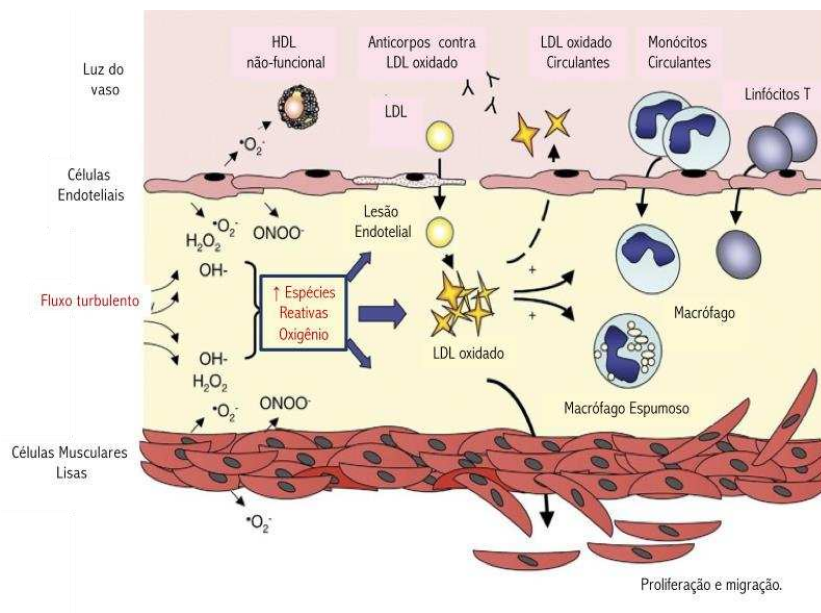
Disfunção endotelial está associada a muitos fatores de risco tradicionais para aterosclerose, incluindo dislipidemia, DM, hipertensão arterial e tabagismo. Ela é particularmente induzida por partículas de LDL oxidada.

A inflamação tem um papel chave na patogênese da aterosclerose (PAOLETTI; GOTTO; HAJJAR, 2004),(WEBER; NOELS, 2011). Macrófagos que fagocitam LDL oxidada liberam uma variedade de substâncias inflamatórias, citocinas e fatores de crescimento (BERLINER, J. A. *et al.*, 1995), (STEINBERG; WITZTUM, 2010a). Dentre as moléculas implicadas na inflamação , podemos citar: moléculas de adesão intracelular, ligante CD40, interleucinas (principalmente IL-1, IL-6, IL-8) e fator de necrose tumoral alfa.(WYKRETOWICZ *et al.*, 2004).

Anormalidades lipídicas são importantes no desenvolvimento da placa aterosclerótica (GORDON *et al.*, 1977). Os macrófagos fagocitam a LDL oxidada (formando as células espumosas) e se acumulam na placa aterosclerótica. A oxidação do LDL facilita a captação de macrófagos via receptores (entre eles, CD36, também chamado receptor B) e o acúmulo acelerado de colesterol (PODREZ *et al.*, 2000). A captação de LDL pelo macrófago pode ser uma resposta adaptativa inicial, que

impede a lesão endotelial induzida pelo LDL. Entretanto, o acúmulo de colesterol nas células espumosas leva a disfunção mitocondrial, apoptose e necrose com consequente liberação de proteases celulares, citocinas inflamatórias e moléculas pró-trombóticas (TABAS, 2002). Muitas evidências se acumularam nos últimos 50 anos demonstrando que a redução do LDL colesterol pode reduzir eventos cardiovasculares (SILVERMAN *et al.*, 2016), (SABATINE *et al.*, 2017).

**Figura 1-** Participação das espécies reativas de oxigênio na fisiopatologia da aterosclerose



Fonte: adaptado de Leopold, 2008.

## 1.2.2 Complicações Microvasculares

### 1.2.2.1 Aspectos gerais das complicações microvasculares

As complicações microvasculares causadas pelo DM são retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética.

O DM é a principal causa de cegueira e doença renal terminal no mundo. Mais de 60% das PVDM são afetadas pelas polineuropatia simétrica distal, mononeuropatias e neuropatia autonômica que resultam em disfunção erétil, incontinência urinária, gastroparesia e diarreia noturna. Doença arterial periférica, associada à neuropatia de membros inferiores são responsáveis por cerca de 50% das amputações não traumáticas de membros inferiores (DCCT RESEARCH GROUP *et al.*, 1993).

#### 1.2.2.2 Fisiopatogenia das complicações microvasculares

A hiperglicemia crônica resulta em estreitamento e eventual oclusão do lúmen vascular, causando perfusão tecidual prejudicada, isquemia e disfunção do tecido afetado. Vários processos contribuem para a oclusão microvascular, como detalhado a seguir.

Em pacientes com DM, as células de diferentes tecidos são expostas a hiperglicemia crônica, sendo as células endoteliais as mais afetadas. Essas células são incapazes de reduzir o influxo de glicose em resposta à sobrecarga, resultando em um alto fluxo celular de glicose e geração de mediadores patogênicos que contribuem para o desenvolvimento das complicações do diabetes (KAISER, 1993). Figuras 2,3 e 4 (RALPH DE FRONZO, 2015).

A alteração mais precoce na doença é o aumento da permeabilidade capilar, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas que se acumulam na parede dos vasos. Em adição, a matriz extracelular elaborada pelas células perivasculares, como os pericitos (retina) e células mesangiais (glomérulos), é aumentada devido a alterações na síntese e renovação de suas proteínas e glicosaminoglicanos (NAVANEETHAN *et al.*, 2023).

Como resultado, a membrana basal se torna espessada nos capilares da retina, na *vasa nervorum* e na matriz mesangial nos glomérulos renais.

Hiperplasia e hipertrofia do endotélio, mesângio e musculo liso das arteríolas também contribuem para espessamento da parede dos vasos. Por último, o aumento

da coagulabilidade sanguínea e adesão de plaquetas e leucócitos à superfície endotelial levam à formação de microtrombos e oclusão luminal (SUGAHARA *et al.*, 2021).

O estreitamento progressivo dos vasos da microvasculatura são acompanhadas por perda de células microvasculares. Na retina, o diabetes induz apoptose das células de Müller, pericitos e células endoteliais. No glomérulo, a oclusão vascular disseminada e declínio da função renal são associadas a perda de podócitos. Na *vasa nervorum* dos nervos ocorre degeneração de células endoteliais e pericitos. Aumento da apoptose de células da retina, glomérulos e neurônios periféricos é um achado proeminente de dano ao tecido vascular no diabetes (KROLEWSKI, 2015) (RALPH DE FRONZO, 2015). Ver figuras 2,3 e 4.

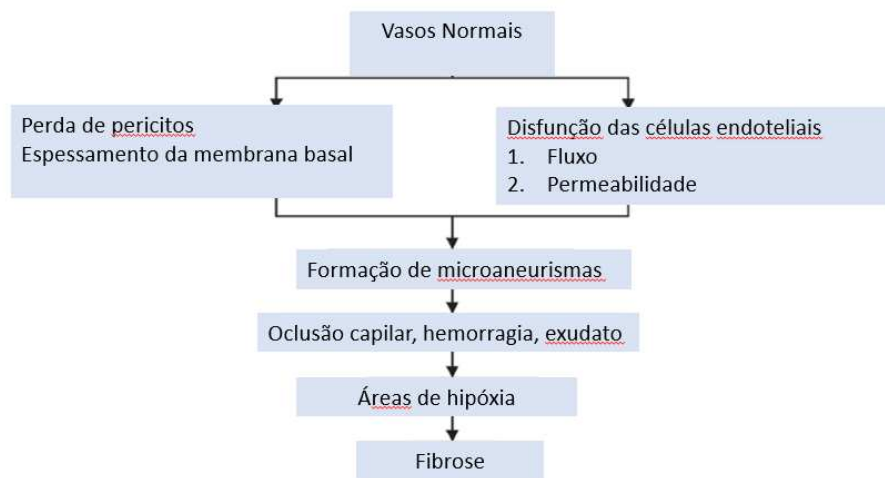
De todas as complicações microvasculares do diabetes, a doença renal é que mais impacta na qualidade de vida dos pacientes e nos custos com saúde. A maior parte do excesso de mortalidade associado ao DM1 e ao DM2 está associada à doença renal crônica (DRC) (GROOPM, 2009), (AFKARIAN, 2013).

**Figura 2-** Fisiopatologia da Doença Renal do Diabetes

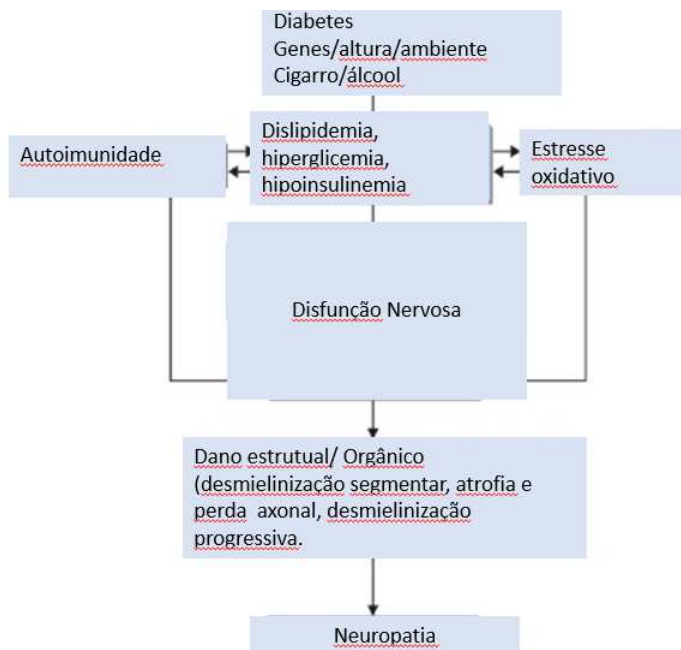


Fonte: adaptado de Joshi, 2020.



**Figura 3-** Fisiopatologia da Retinopatia Diabética

Fonte: modificado de Joshi, 2020.

**Figura 4-** Fisiopatologia da Neuropatia Diabética

Fonte: modificado de Joshi, 2020.

### 1.2.2.3 Doença renal do diabetes

O DM é a principal causa de doença renal crônica (DRC) e doença renal terminal (DRT) em todo o mundo (THOMAS; COOPER; ZIMMET, 2016a).

Cerca de metade das PVDM2 e um terço das pessoas que vivem com DM1 (PVDM1) irão desenvolver doença renal. Considera-se como doença renal do diabetes (DRD) uma redução da taxa de filtração glomerular (TFG), um aumento da relação albumina/creatinina ou ambos (THOMAS; COOPER; ZIMMET, 2016b). A prevalência de doença renal associada ao diabetes está em elevação devido ao aumento da incidência de *Diabetes Mellitus* Tipo 1 e Tipo 2 e ao aumento da expectativa de vida dos pacientes com doença renal (DE BOER; FOR THE DCCT/EDIC RESEARCH GROUP, 2014)

A DRD foi descrita inicialmente como uma patologia que progredia de albuminúria moderadamente aumentada (30-300 mg/g de creatinina) para albuminúria gravemente aumentada (>300 mg/g de creatinina) e então para a perda de função renal. Entretanto, esse paradigma não se mostra verdadeiro, já que nem todos os pacientes com proteinúria evoluem com perda da função renal e nem todo paciente com perda de função renal exibe albuminúria (THOMAS; COOPER; ZIMMET, 2016a).

No UKPDS, dos 28% dos pacientes que desenvolveram perda da função renal, cerca de metade não apresentava albuminúria prévia (TSAI *et al.*, 2016). Já no DCCT/EDIC, apenas 34% dos indivíduos que desenvolveram redução TFG tinham albuminúria gravemente aumentada e 27% apresentavam albuminúria moderadamente aumentada. O estudo NHANES III mostrou que 20% dos indivíduos com DM tinham doença renal avançada na ausência de albuminúria. (MOLITCH *et al.*, 2010).

Dessa forma, marcadores outros, que não a albuminúria, são necessários para o rastreamento e acompanhamento da DRD.

A diferença na prevalência da DRC entre DM1 e DM2 decorre do fato do DM1 ocorrer em pacientes mais jovens e com menos comorbidades (doença vascular, obesidade) em relação aos pacientes com DM2 (DE BOER, 2011).

A coexistência de outros fatores que possam predispor a DRC em pacientes com DM2, faz com que o DM1 reflita melhor a doença renal atribuída ao diabetes que o DM2 (THOMAS *et al.*, 2015a).

Muitos pacientes com DM e DRC não irão desenvolver doença renal terminal, pois irão falecer de outras causas, principalmente doenças cardiovasculares. Ainda assim, a DRC associada ao DM é a principal causa isolada de doença renal terminal e hemodiálise (THOMAS *et al.*, 2015a).

Ao diagnóstico de DM1, até metade dos pacientes vão apresentar um aumento transitório na TFG e no tamanho dos rins, que retorna ao normal, na maioria dos pacientes nos meses subsequentes. (CORTINOVIS *et al.*, 2022a), (BANK, 1991). A TFG pode permanecer elevada em um terço dos pacientes. Esse estado de hiperfiltração prolongada foi associado a progressão para nefropatia em alguns estudos (MOGENSEN; ANDERSEN, 1975).

Fatores que foram associados ao desenvolvimento de albuminúria incluem duração do diabetes, história familiar positiva para DRD, sexo masculino, etnia (afro-americanos e hispânicos), controle glicêmico inadequado, aumento da pressão arterial, presença de retinopatia e tabagismo. (PAVKOV *et al.*, 2006), (TUTTLE, Katherine R. *et al.*, 2022). Assim, tanto fatores metabólicos quanto fatores hemodinâmicos contribuem para o desenvolvimento da DRD. Nas fases mais precoces da DRD, a hiperglicemia é o principal determinante para o acometimento renal e, estágios mais tardios, a hipertensão arterial é o principal fator de declínio da função (KROLEWSKI *et al.*, 1985).

#### 1.2.2.3.1 Fisiopatologia da doença renal do diabetes

A patogênese da DRD é multifatorial. Quase todos os PVDM1 desenvolvem algum grau de retinopatia diabética, enquanto apenas um terço desenvolve doença renal. Fatores individuais, metabólicos, estresse oxidativo, fatores hemodinâmicos, hiperperfusão e hipoperfusão e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona podem, em associação à hiperglicemia, resultar no desenvolvimento da doença renal (MOGENSEN; ANDERSEN, 1975), (PICHLER *et al.*, 2017), (HOJS *et al.*, 2016).

## Alterações glomerulares

Apesar da importância do endotélio vascular nas complicações microvasculares, muitos investigadores propõem que as alterações precoces nos glomérulos renais são críticas para o subsequente desenvolvimento de glomeruloesclerose e perda de néfrons (Figura 5). Dentre essas mudanças, a mais importante é a disfunção dos podócitos. Juntamente com as células endoteliais glomerulares, os podócitos são responsáveis pela manutenção da membrana basal glomerular, sua barreira de carga e a forma e a integridade da alça capilar glomerular. Todas essas funções estão comprometidas no glomérulo do paciente com DRD. A hiperglicemia induz mudanças adaptativas nos podócitos, incluindo rearranjo do citoesqueleto, desdiferenciação celular, apoptose e autofagia, manifestados por retração e achatamento (apagamento podocitário), motilidade reduzida e hipertrofia glomerular. Esses dados colocam os podócitos, e mais particularmente a desregulação do seu crescimento e diferenciação, no centro da patogênese da DRD. Alguns estudos sugerem que a medida da densidade podocitária pode ser um preditor útil para DRD e sua progressão. (HARINDHANAVUDHI *et al.*, 2015)

Uma das mais características alterações glomerulares no diabetes é o espessamento da membrana basal glomerular (MBG). O espessamento do MBG está presente em quase todos os pacientes com diabetes após alguns anos de diagnóstico, embora alterações mais pronunciadas só sejam observadas em pacientes com DRD (KOLÁR, 1977). Mudanças na composição, carga e arquitetura da MBG estão associadas ao seu espessamento e podem contribuir para a albuminúria. (LEWKO; STEPINSKI, 2009). As células mesangiais também são substancialmente alteradas pelo diabetes, sofrendo proliferação, hipertrofia e aumento de produção de proteínas da matriz. Essas mudanças levam a algumas das características estruturais únicas da glomerulopatia diabética, incluindo expansão mensagial e mesangiólise e, finalmente glomeruloesclerose. (QIAN *et al.*, 2008).

A hiperfiltração, definida com TFG acima de 120 a 140 ml/min/1.73M<sup>2</sup>, decorre de uma resposta adaptativa aos distúrbios da hemodinâmica glomerular que ocorrem precocemente no curso da DRD, especialmente no DM1.

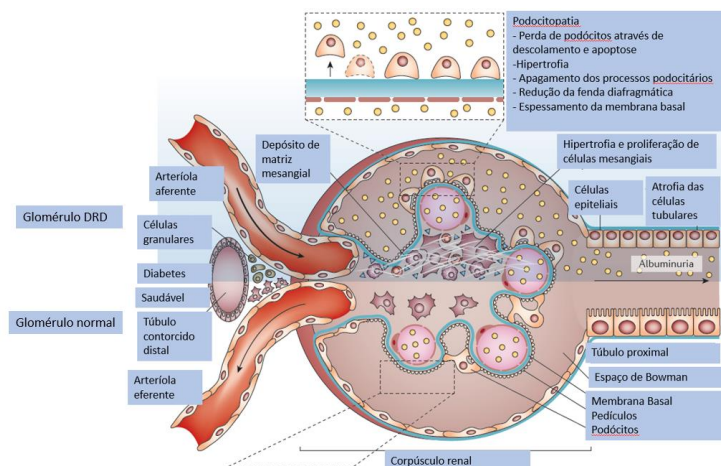
O aumento da carga de glicose no túbulo proximal resulta em maior reabsorção de glicose, juntamente com o sódio e outros solutos. Como consequência, a entrega de sódio para a mácula densa no túbulo contorcido distal é reduzida e o *feedback* túbulo-glomerular é ativado, levando a aumento da pressão intraglomerular e hiperfiltração (VALLON *et al.*, 2013).

É controverso se a hiperfiltração tem um papel causal ou preditor no desenvolvimento da albuminúria. Em um estudo com 426 indivíduos com DM1 e 15 anos de segmento, 24% dos participantes desenvolveram hiperfiltração glomerular. Entretanto, esta não se correlacionou com o desenvolvimento de albuminúria. (FICOCIELLO *et al.*, 2009)

### Alterações tubulares

Hiperglicemia crônica resulta em atrofia das células tubulares. Fibrose tubulointersticial é considerada a via comum final para a perda da função renal do diabetes. Acredita-se que o prognóstico da DRD possa se correlacionar melhor com a fibrose túbulo-intersticial do que com as mudanças glomerulares precoces (BOHLE *et al.*, 1990).

**Figura 5-** Esquema representativo da Doença Renal do Diabetes



Fonte: adaptado de Thomas, 2015.

### 1.2.2.3.2 Estadiamento da doença renal

O estadiamento mais aceito para a doença renal crônica é o proposto pela KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), que combina estágios de perda de função renal baseados na TFG e na excreção urinária de albumina, utilizando os dois parâmetros de forma complementar (Tabela 2).

**Tabela 2-** Estadiamento da doença renal crônica

				Descrição e faixa das categorias de albuminúria persistente		
				A1	A2	A3
Prognóstico da DRC conforme categorias de TFG e albuminúria: KDIGO 2012				Normal a levemente aumentada	Moderadamente aumentada	Gravemente aumentada
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	> 300 mg/g > 30 mg/mmol
Descrição e faixa das categorias de TFG (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	G1	Normal ou alta	≥ 90			
	G2	Levemente reduzida	60–89			
	G3a	Leve a moderadamente reduzida	45–59			
	G3b	Moderada a gravemente reduzida	30–44			
	G4	Gravemente reduzida	15–29			
	G5	DRC estágio 5	< 15			

Fonte: Adaptado de (ROSSING *et al.*, 2012).

### 1.3 Inflamação e Estresse Oxidativo

### 1.3.1 Sistemas oxidantes

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e atuação dos sistemas de defesa antioxidante (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997a).

Radicais livres são moléculas cujos átomos possuem um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (MANZO, 1989), (RIBEIRO, 1989). Este fato torna essas moléculas altamente reativas e capazes de captar elétrons de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que compõem a célula, para recuperar o número de par de elétrons. Isso resulta numa reação em cadeia. A molécula desfalcada de elétron se torna um novo radical e busca elétrons de uma molécula vizinha (FERREIRA, A. L); (MATSUBARA, 1997).

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico decorrente de funções biológicas importantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais funcionam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Sua produção em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons, entre outras funções. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997a).

De forma crônica, o estresse oxidativo tem implicação relevante na patogênese de diversas doenças não transmissíveis, como aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004). A oxidação (perda de elétrons) ou redução (ganho de elétrons) de uma molécula resulta em alterações de suas características. (BARBOSA et al., 2010a).

Os organismos aeróbicos metabolizam 85 a 90% do oxigênio ( $O_2$ ) consumido na mitocôndria, por meio da cascata transportadora de elétrons. A redução do  $O_2$  gera os radicais superóxido, hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, por ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da geração de OH tem ação deletéria potencial, uma vez que este último se constitui

o mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o  $H_2O_2$  tem meia vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxica para as células. Sua toxicidade pode ser aumentada na presença no íon ferro (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997b).

O Superóxido, além de participar da geração de OH pode, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico, gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO) (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

Os íons Ferro e Cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacita como potenciais catalisadores de reações de formação de radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010b).

Quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio resultam em oxidação em vários tecidos e moléculas como, DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. (KASHIHARA *et al.*, 2010).

A membrana celular é um dos componentes celulares mais atingido pelos radicais livres devido a peroxidação lipídica, com impacto na sua estrutura e permeabilidade, podendo acarretar sua apoptose. (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984).

Em mamíferos, fontes potenciais de espécies reativas de oxigênio incluem a cadeia respiratória, a xantina oxidase, os NADH/NADPH oxidases, o óxido nítrico sintase e outras hemoproteínas.

É possível medir no plasma e outros fluidos corporais moléculas oxidantes e *Status Oxidante Total* (TOS).

### 1.3.2 Sistema antioxidantes

Para limitar os níveis intracelulares de radicais livres e danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, existem mecanismos de defesa antioxidantes (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997b).



Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menor concentração que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Estes elementos têm a capacidade de doar um de seus elétrons aos radicais livres e ainda continuarem estáveis. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não radicais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade. É possível avaliar a capacidade antioxidante total (TAC) no plasma e outros fluidos corporais (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEHINI, 1984)

O sistema de defesa antioxidante é dividido em sistemas enzimático e não enzimático.

Os antioxidantes enzimáticos encontram-se espalhados por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997b), (HE *et al.*, 2017).

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se a glutathione , beta-caroteno, alfa-tocoferol e tocotrienol, o ácido ascórbico, o ácido lipóico, os carotenoides, os flavonoides, os curcuminóides entre outros (WOŁONCIEJ; MILEWSKA; ROSZKOWSKA-JAKIMIEC, 2016).

### 1.3.3 Mensuração do estado oxidativo e antioxidativo

Diferentes métodos permitem estimar a capacidade oxidante e antioxidante em diferentes fluidos e tecidos corporais.

A peroxidação de lipídios pode ser mensurada por marcadores como o malonaldeído, MDA, e o 4-hidroxinonenal, HNE, entre outras; a de proteínas pode ser mensurada pelas carbonilas de proteínas; a de ácidos nucleicos pela quantificação de

bases oxidadas do DNA; e de carboidratos pode ser medida pelos produtos de glicosilação.

Destacamos abaixo, os utilizados em nosso estudo: TOS, TAC, AOPP e FRAP.

#### 1.3.3.1 *Status Oxidante Total (TOS)*

O TOS avalia o estado oxidante global de uma amostra. A grande vantagem da aferição do TOS é a de estimar ao mesmo tempo o estado oxidativo de uma amostra biológica, independente do mecanismo de base, incluindo marcadores de difícil mensuração isolados.

#### 1.3.3.2 *Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPPs)*

Os AOPPs são oriundos de oxidantes que levam a formação de moléculas contendo ditirosina (COLOMBO et al., 2012). Tanto as ações do ácido hipocloroso (HOCl) (WITKO-SARSAT et al., 1996) ou a reação de Fenton, envolvendo o ferro e peróxido de hidrogênio (BOCHI et al., 2014) vão levar ao aumento de AOPP. Os AOPPs são decorrentes da oxidação da albumina, lipoproteínas e fibrinogênio (PIWOWAR,2010). A maioria dos AOPPs são formados pelo aumento da mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos ativados que vão promover a inflamação e mais geração espécies reativas de oxigênio (EROS) (WITKO-SARSAT et al., 2003; LI et al., 2007). Este mecanismo parece ser importante no desenvolvimento da DRD pois, em modelos experimentais com roedores, a administração de AOPPs levou a ativação de citocinas, como MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*) e fator de crescimento transformador  $\beta$  (TFG- $\beta$ ), e maior inflamação, culminando na presença de albuminúria (SHI et al., 2008). A aferição da AOPP ocorre através da incubação do plasma com iodeto de potássio, ácido cítrico em uma placa calibrada com cloramina sendo os produtos mensurados por absorbância a 340 nm determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD et al, 1976; HANASAND et al., 2012).

### 1.3.3.3 Capacidade Antioxidante total (TAC)

A TAC é considerada um dos melhores testes para avaliação da capacidade de produção ou correção de espécies reativas, pois envolve vias enzimáticas e não enzimáticas (SILEVSTRINI et al.,2023). Via de regra, o método baseia-se na capacidade do soro ou fluido em impedir a oxidação. A TAC é definida na formação do radical cátion ABTS•+ [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato)], indicando a remoção das espécies reativas de oxigênio pela amostra de soro (BARTOSZ, 2003).

### 1.3.3.4 Capacidade de Redução do Ferro no Plasma (FRAP)

O FRAP estima, junto com o TAC, a capacidade antioxidante, independente de origem enzimática ou não-enzimática, endógena ou exógena (RICEEVANS,2000; KUSANO; FERRARI, 2008). O FRAP é baseado na transformação da tripiridiltriazina ( $Fe^{3+}$  TPTZ) na forma ferrosa ( $Fe^{2+}$  TPTZ) na presença de antioxidantes em pH reduzido (PRIOR & CAO, 1999). Em termos práticos, o FRAP é identificado através da redução dos íons férricos em ferrosos após a inserção de material biológico (plasma, urina ou outros fluidos) que tenha capacidade oxirredutora, detectado por método colorimétrico em espectrofotômetro (RICEEVANS,2000; STALIKAS et al., 2007).

## 1.4 Estresse oxidativo e doença renal

As contribuições do estresse oxidativo para a progressão da doença renal e subsequente perda da função renal vem sendo extensivamente estudadas. As espécies reativas de oxigênio têm um papel importante na regulação fisiológica dos rins, o que torna estes órgãos especialmente vulneráveis ao desequilíbrio redox e estresse oxidativo (HIMMELFARB, 2005). Formação de espécies reativas de oxigênio podem acontecer no córtex ou na medula renal e levam a diversas consequências, que vão desde alteração do fluxo renal, a inflamação e mudanças fibróticas (POPOLO

*et al.*, 2013). Existem muitas evidências de aumento dos marcadores de estresse oxidativo com deterioração da função renal. Essas alterações já podem ser observadas em estágios iniciais da doença renal (TBAHRITI *et al.*, 2013a). Dados mostram aumento de marcadores do estresse oxidativo como superóxido mitocondrial e LDL oxidado (NISTALA; WHALEY-CONNELL; SOWERS, 2008) e homocisteína (CHIEN *et al.*, 2015), assim como deficiência de superóxido desmutase (SOD) (GARCIA-BELLO *et al.*, 2014) e GSH (glutationa) (KOTUR-STEVLJEVIĆ *et al.*, 2013) associados com a progressão da doença renal.

Esses achados não implicam necessariamente num papel causal do estresse oxidativo na perda da função renal (TBAHRITI *et al.*, 2013b). Entretanto, existem alguns estudos pré-clínicos mostrando evidência mecanística para um papel causal do aumento do estresse oxidativo na progressão da doença renal. O mais estudado é o papel do estresse oxidativo na DRD (KASHIHARA *et al.*, 2010).

Nesse contexto específico, o aumento do estresse decorre de múltiplos mecanismos, incluindo disfunção mitocondrial, aumento da atividade NOX (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*), desacoplamento da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e deficiência de mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como não enzimáticos (POPOLO *et al.*, 2013), (FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008), (GALVAN; GREEN; DANESH, 2017).

A disfunção mitocondrial é um denominador comum a várias vias patológicas que decorrem do estresse oxidativo.

Existem quatro complexos proteicos na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, chamadas complexo I, II, III e IV. Quando a glicose é metabolizada através do ciclo do ácido tricarboxílico, ela gera moléculas doadoras de elétrons, o NADH e o FADH<sub>2</sub>. Na cascata de fosforilação oxidativa, o NADH doa elétrons para o complexo I e o FADH<sub>2</sub> doa elétrons para o complexo II. Esses elétrons são transferidos para a coenzima Q e, daí para o complexo III, citocromo-c, complexo IV e finalmente para o oxigênio com a formação de água. A cadeia transportadora de elétrons é organizada de forma a controlar precisamente a síntese de ATP. À medida que ocorre o transporte de elétrons, alguma energia desses elétrons é utilizada para impulsionar os prótons através das membranas nos complexos I, III e IV. Isso gera um potencial através da membrana mitocondrial. A energia desse potencial leva à síntese

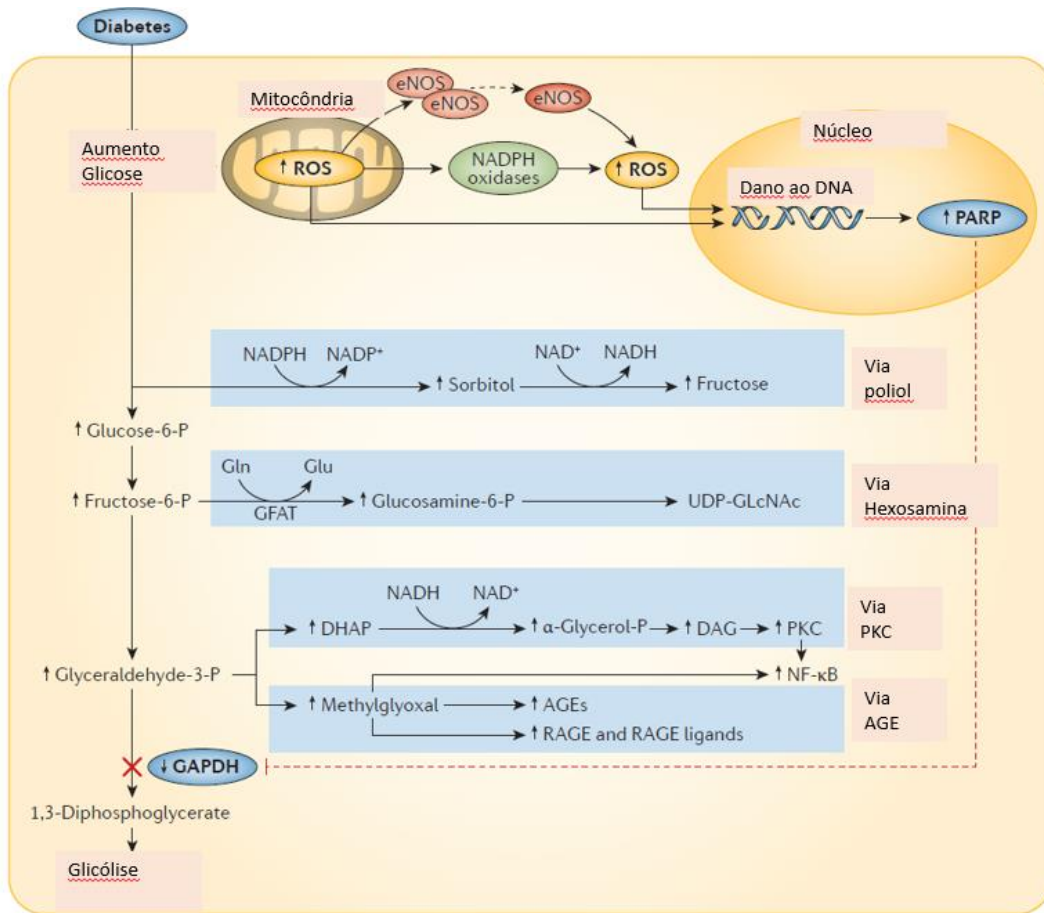
de ATP. Isso é o que acontece em uma célula normal (LESTIENNE; BATAILLÉ, 1994). Nas células de PVDM, o alto influxo de glicose, resulta em mais glicose sendo oxidada no ciclo tricarboxílico, o que gera mais moléculas doadoras de elétrons (NADH e FADH<sub>2</sub>), na cadeia transportadora de elétrons. Como resultado, o potencial de membrana gerado na mitocôndria aumenta até um limiar crítico ser atingido. Nesse momento, a transferência de elétrons dentro do complexo III é bloqueado, causando um retorno para a coenzima Q que passa a doar mais elétrons para o oxigênio, gerando o superóxido. Um estudo em camundongos que inibiu a produção de superóxido usando abordagem transgênica (superóxido desmutase) impediu o desenvolvimento e nefropatia diabética em camundongos com diabetes db/db (DERUBERTIS *et al.*, 2004).

A produção do superóxido resulta em dano na cadeia do DNA. Isso acarreta a ativação de mecanismos de reparo do DNA incluindo a enzima A poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1). Essa enzima de reparo, por sua vez, inibe a GAPDH (*glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase*), enzima chave no processo final na glicólise. Como resultado, há inibição da via glicolítica. (THOMAS *et al.*, 2015b).

Ao bloquear a via glicolítica, há acúmulo de metabólitos intermediários da glicólise. O acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato ativa as vias PKC e produtos de glicosilação avançada. O acúmulo de frutose-6-fosfato ativa a via da hexosamina e o de glicose ativa a via polioli (BROWNLEE, 2005).

Vide Figura 6.

**Figura 6-** O papel central das espécies reativas de oxigênio nas complicações do diabetes



Fonte: adaptado de (THOMAS *et al.*, 2015c)

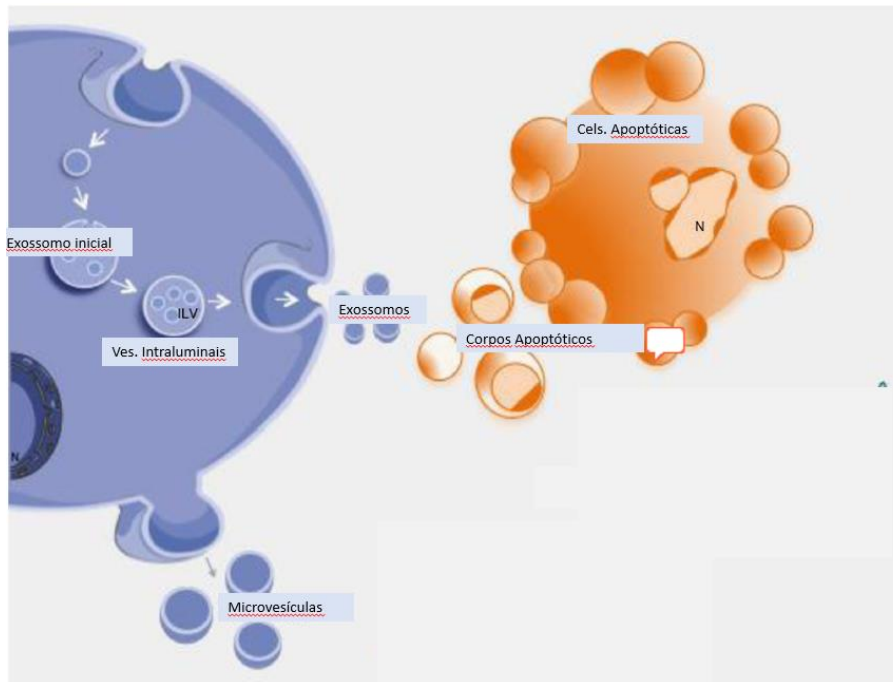
### 1.5 Vesículas extracelulares (EVs)

As vesículas extracelulares são pequenas partículas secretadas por praticamente todas as células. Inicialmente, acreditava-se que essas partículas tinham como função desprezar material indesejado pela célula. Entretanto, ficou claro nas últimas décadas, que as VEs apresentam papel primordial na comunicação entre as células. Elas são capazes de transportar proteínas, lipídio e material genético (especialmente microRNAs) de uma célula para outra. (WATERS; BASSLER, 2005).

As vesículas extracelulares podem ser classificadas em:

- a) Microvesículas, que são produzidas pelo brotamento e fissura da membrana plasmática;
- b) Exossomos, que são formados dentro da rede endossomal e são liberados pela fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática;
- c) Corpos apoptóticos liberados como bolhas de células em apoptose

**Figura 7-** Biogênese e liberação de Vesículas Extracelulares



Fonte: adaptada de Yáñez-Mó, 2015.

A caracterização dos exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos é feita a partir das diferenças em seus tamanhos, biogêneses, composições e funções (Tabela 3).

**Tabela 3** - Comparação entre os diferentes tipos de vesículas extracelulares

Tipo	EXOSSOMOS	MV	CORPOS APOPTÓTICOS
Tamanho (nm)	50-100	100-1000	1000-5000
Biogênese	Via endocítica (exocitose de endossomos multivesiculares)	Brotamento a partir da membrana plasmática	Brotamento a partir da membrana plasmática
Composição	Proteínas e ácidos nucleicos	Proteínas e ácidos nucleicos	Fragmentos nucleares e organelas citoplasmáticas
Função	Comunicação celular	Comunicação celular	Facilitar a fagocitose

Fonte: Adaptado de Cavalcanti, 2021. MV: micro vesículas;

As EVs são liberadas por quase todos os tipos de células em condições fisiológicas e patológicas e podem ser encontradas em praticamente todos os líquidos corporais (plasma, urina, líquido seminal, lágrima, saliva, líquor, leite, líquido sinovial, entre outros) e todos os órgãos sólidos (YÁÑEZ - MÓ *et al.*, 2015).

A heterogeneidade é uma característica importante das EVs. Um mesmo tipo de célula exposta a diferentes estímulos pode liberar vesículas com diferentes componentes. Da mesma forma, células diferentes submetidas a um mesmo estímulo, irão liberar EVs diferentes. Antígenos altamente específicos da superfície das EVs podem ser usados para identificar a origem celular. Fontes de EVs diferem entre indivíduos saudáveis e em diferentes estados patológicos (CAVALCANTI; SILVA FILHO; QUEIROZ, 2021).



## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivos primários

- Comparar marcadores de estresse oxidativo (TOS, TAC, FRAP, AAOP) entre pessoas que vivem sem DM, PVDM1 sem DRD e com DRD.
- Comparar a concentração e o tamanho de EVs séricas entre pessoas que vivem sem DM, PVDM1 sem DRD e com DRD.

## 2.2 Objetivos secundários

- Avaliar possíveis associações entre estresse oxidativo ou EVs com o perfil laboratorial (colesterol, creatinina, triglicérides e glicemia) entre pessoas que vivem sem DM, PVDM1 sem DRD e com DRD.
- Avaliar possíveis associações entre estresse oxidativo ou EVs com variáveis clínicas (PAS, PAD, CA, IMC) entre pessoas que vivem sem DM, PVDM1 sem DRD e com DRD.
- Avaliar o uso do Aloxano sérico como possível marcador para DRD.
- Avaliar a coexistência de outras complicações (RD, ND) entre PVDM1 com e sem DRD e sua associação com marcadores de estresse oxidativo e EVs.

### **3.0 METODOLOGIA**

### 3.1 Desenho do estudo e considerações éticas

Trata-se de um estudo observacional, transversal analítico, com inclusão consecutiva de pacientes, realizado no serviço de endocrinologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em parceria com Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética das duas instituições. Pareceres: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética das duas instituições. Pareceres: CAAE 35168720.0.0000.5136 (IPSEMG) / CAAE 55001621.3.0000.5149 (UFMG). Todos os participantes do estudo assinaram o TCLE (anexos 1 e 2).

### 3.2 Participantes

#### 3.2.1 Critérios de inclusão

##### 3.2.1.1 Pessoas que vivem com DM1

Foram selecionados as pessoas em acompanhamento no serviço de endocrinologia da UMG e do IPSEMG, sendo incluídos indivíduos de ambos os sexos, idade acima de 18 anos, com qualquer tempo ou estágio da doença renal do diabetes (mesmo pacientes em terapia de substituição renal). O diagnóstico de DM foi estabelecido conforme os critérios da ADA (*American Diabetes Association, 2024*), disposto na Tabela 4.

**Tabela 4** - Critérios diagnósticos para DM em adultos não grávidos

---

<b>HbA1C <math>\geq</math> 6.5%</b> ; usar método certificado pelo NGSP
OU
<b>Glicemia de jejum <math>\geq</math>126 mg%</b> ; considera-se jejum ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas
OU
<b>Glicemia pós 75g de dextrosol <math>\geq</math> 200 mg%</b>
OU
<b>Sintomas clássicos de hiperglicemia com glicemia aleatória <math>\geq</math> 200 mg%</b>

---

NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*; Fonte: ADA, 2024

Foi considerado diagnóstico de DM1 pessoas com DM e pelo menos um autoanticorpo (Anti-GAD, Anti-Ia2) positivo em tratamento com esquema intensivo basal-bolus.

### 3.2.1.2 Pessoas que vivem com DM1 e doença renal

O diagnóstico de doença renal do diabetes foi estabelecido conforme os critérios do KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*). (ROSSING *et al.*, 2022):

- Presença de albuminúria (razão albumina/creatinina  $\geq$  30 mg/g), e/ou
- Redução da taxa de filtração glomerular ( $<$  60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>).

A taxa de filtração glomerular foi estimada pela fórmula CKD-EPI (*chronic kidney disease epidemiology collaboration*), conforme preconizado pelo KDIGO (ROSSING *et al.*, 2022).

### 3.2.1.2 Controles

Foram incluídos:

- 1) Pacientes da instituição (IPSEMG) sem DM que compareceram ao laboratório para coleta de exames de rotina ambulatorial.
- 2) Funcionários do IPSEMG sem DM, que compareceram ao laboratório para coleta de sorologia para COVID 19, em levantamento epidemiológico realizado pela instituição entre janeiro e fevereiro de 2021.

### 3.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da seleção PVDM e controles com comorbidades que influenciassem a avaliação de doença renal e/ ou nos marcadores renais, tais como lúpus eritematoso sistêmico, mieloma múltiplo, tuberculose, hepatite B/C, doenças consumptivas, além de doenças específicas do trato urinário (rins policísticos, glomerulonefrites, infecção trato urinário recorrente, urolitíase obstrutiva, neoplasias, rim único). Também foram excluídos pacientes em uso de medicações crônicas como imunossupressores ou que tivessem sido submetidos a transplantes.

### 3.2.3 Avaliação clínica

Todos os participantes que não possuíam critérios de exclusão e que aceitaram entrar no estudo assinando o TCLE foram avaliados através da coleta de dados clínicos (prontuário e presencial) e coleta de amostras (sangue e urina). Foram obtidas as seguintes informações dos participantes :

#### 3.2.3.1 Dados de identificação (para ambos os grupos)

a) nome; b) data de nascimento; c) gênero; d) etnia (autodeclarada); e) dados de contato;

### 3.2.3.2 Anamnese dirigida

**Grupo PVDM:** a) data do diagnóstico de DM1; b) história de comorbidades - presença de outras doenças (HAS, dislipidemia) incluindo as autoimunes (hipotireoidismo primário, insuficiência gonadal, vitiligo); c) história de tabagismo; d) existência de outras complicações do DM (retinopatia, neuropatia, doença macrovascular); e) medicações em uso .

**Grupo Controle:** a) história de comorbidades -presença de outras doenças (HAS, dislipidemia) incluindo as autoimunes (hipotireoidismo primário, insuficiência gonadal, vitiligo); b) história de tabagismo; c) medicações em uso;

### 3.2.3.3 Dados de prontuário

Foram avaliados os registros de prontuário *on line* para avaliação de doenças macro e microvasculares definidas pelas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) 2019. Da mesma forma, foram utilizadas informações do prontuário do paciente sobre exames realizados entre 6 e 12 meses pelos pacientes.

### 3.2.3.4 Exame Físico Dirigido

a) peso (aferido em gramas por balança digital ou mecânica calibrada e aprovada pelo Inmetro); b) altura (aferido em centímetros por estadiômetro); c) circunferência abdominal (em centímetros, obtida com ajuda de fita métrica); d) pressão arterial (aferida por esfigmomanômetro digital aprovado pelo Inmetro).

### 3.2.3.5 Exames realizados

Na ocasião da avaliação foi feita a coleta de amostra de sangue venoso periférico e urina, para estudo dos seguintes marcadores:

- a) glicemia de jejum;
- b) creatinina sérica;
- c) colesterol total e frações;
- d) relação albumina/creatinina urinária;
- e) marcadores de estresse oxidativo e metabólicos no plasma/soro: TOS, TAC, FRAP, AAOP.
- f) avaliação da concentração e do tamanho de EVs no plasma;

### 3.2.3.6 Processamento de amostras de pacientes e controles

#### Logística

Duas amostras de 10 mL de sangue periférico foram obtidas de cada paciente sendo divididas em tubo com EDTA (plasma) e outro sem aditivo(soro). Após centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, estas amostras foram aliquotadas e estocadas a -70 °C. As amostras foram utilizadas para mensuração dos parâmetros de estresse oxidativo (TOS e TAC), glicemia e creatinina. O estado oxidante total (TOS) e o estado antioxidante total (TAC) foram aferidos através de método colorimétrico, conforme descrito previamente na literatura (EREL, 2005). As demais mensurações (creatinina, glicemia, colesterol, triglicerídios) foram executadas por método enzimático, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os níveis plasmáticos de AOPP foram estabelecidos pelo método colorimétrico conforme descrito por Hanasand et al (2012) (HANASAND *et al.*, 2012). A avaliação do FRAP foi baseada no método descrito por Benzie e Strain (BENZIE; STRAIN, 1996).

#### Isolamento das Vesículas Extracelulares



As amostras de soro sanguíneo (1000ul) e urina (2000ul) foram submetidas a centrifugações sequenciais de 300xg por 10 minutos, 2000xg por 10 minutos e 16500xg por 30 minutos, para retirada de células, debris celulares e microvesículas, respectivamente no momento da coleta e anteriormente ao congelamento a -80°C. Para o isolamento das VE pequenas o sobrenadante foi descongelado em gelo, filtrado em membrana 0,20µm e centrifugado duas vezes a 120000xg por 70min. O pellet enriquecido de Ves pequenas foi diluído em 1XPBS livre de Ca e Mg para posteriores análises.

### Caracterização do isolamento das EVsículas extracelulares pequenas

Para caracterização, as EVs pequenas foram analisadas quanto ao tamanho e concentração por *Nanotracking analysis* pelo equipamento Nanosight (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern) da FZEA, Universidade de São Paulo, em Pirassununga, SP. Quanto ao tamanho e morfologia por *Microscopia Eletrônica de transmissão* pelo equipamento FEI 200kV; modelo Tecnai 20; emissor LAB6, para tanto o pellet foi diluído em solução fixadora (0,1M de Cacodilato; 2,5% Glutaraldeído; 4% de paraformaldeído; pH 7,2 - 7,4) durante duas horas para ser novamente ultracentrifugado e ressuspenso em 20 µL de água ultrapura mili-Q. Por fim, as EVs pequenas foram analisadas quanto a presença de proteína específica ALIX, CD63 e proteína CD9 como pelo controle negativo a proteína Citocromo C por *Western Blot*.

### 3.3 Cálculo amostral

O presente estudo se baseia em uma amostra de conveniência e previu o número de 77 indivíduos com DM1 e 77 controles para o estudo transversal, estabelecido através de cálculo de amostra (erro amostral 5%, nível de confiança 95%, percentual máximo 30% prevalência para 100 pacientes com DM1 atendidos).

### 3.3 Análise estatística

Os dados foram coletados e digitados no programa Excel (Microsoft, EUA). A análise estatística foi realizada utilizando o software PRISM (Graphpad Software Inc, San Diego, EUA). Todas as variáveis discretas e contínuas foram descritas em média (desvio padrão) ou taxa de prevalência (por cento); já as variáveis categóricas foram descritas por taxa de prevalência (por cento). Diferenças entre variáveis discretas e contínuas em dois grupos foram avaliadas quanto a sua distribuição de normalidade; para variáveis com distribuição normal, as diferenças foram avaliadas através do teste T de Student; no caso de variáveis com distribuição assimétrica foi executado o teste de Mann-Whitney. Para dois ou mais grupos foi feito o teste de ANOVA (se distribuição normal) ou Kruskal-Wallis (se distribuição assimétrica). Foi utilizado o teste de Qui-quadrado para avaliação de diferenças entre variáveis categóricas. A significância estatística foi identificada quando a probabilidade (valor de  $P$ ) for inferior a 0.05. O estudo visou avaliar a acurácia dos marcadores moleculares para o estabelecimento de nefropatia diabética. Para tal, foi utilizado o valor de albuminúria como padrão-ouro do diagnóstico de nefropatia diabética, empregados isolados e associados a outros marcadores bioquímicos.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Características clínicas e metabólicas da população estudada

Foram incluídos no total 124 participantes , 61 no grupo controle, 42 no grupo DM1 sem DRD e 21 no grupo DM1 com DRD.

Os dados clínicos estratificados estão descritos na Tabela 5. Os três grupos foram semelhantes quanto à idade, IMC e CA. A média de idade da amostra ( $\pm$  DP) foi de  $40.3 \pm 13.7$  anos. O IMC médio foi  $25.8 \pm 5.1$  Kg/m<sup>2</sup>, e a circunferência abdominal média foi  $89.6 \pm 12.3$  cm.

O grupo DM1 com DRD apresentou níveis mais elevados de pressão arterial sistólica (PAS) em relação aos pacientes com DM1 sem DRD e controles. Em relação à pressão arterial diastólica (PAD), o grupo DM1 com DRD apresentou níveis mais elevados em relação ao controle, mas semelhante em relação ao grupo DM1 sem DRD (Tabela 5).

A proporção sexo feminino e masculino foi semelhante nos grupos DM1 com e sem DRD, mas, no grupo controle, houve uma desproporção entre homens e mulheres.

Não houve diferença na taxa de tabagismo entre os três grupos. Das 63 PVDM, trinta e três por cento (21 pacientes) apresentam DRD.

Como esperado, o grupo DM1 com DRD teve mais complicações relacionadas ao diabetes (retinopatia e neuropatia) que o grupo DM1 sem DRD. Metade das pessoas que vivem com DRD apresentaram também retinopatia diabética.

**Tabela 5** - Características clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo

	<b>Controle *</b> (n=61)	<b>DM1*</b> (n=42)	<b>DM1+DRD **</b> (n=21)	<b>p</b>
<b>Idade</b> (anos )	38.0 [36.0-44.0]	44.0[36.7-47.6]	36.0 [36.1-48.4]	0.78
<b>IMC</b> (kg/m <sup>2</sup> )	26 [25.4-27.9]	24.4[24.0-26.7]	23.6 [20.4-26.9]	0.12
<b>CA</b> (cm)	91.3 ± 13.1	86.2 ± 11.3	91.1 ± 10.9	0.13
<b>PAS</b> (mmHg)	110 [108-114] <sup>a</sup>	110 [113-120] <sup>a</sup>	130 [122-136] <sup>b</sup>	<0.001
<b>PAD</b> (mmHg)	70 [68.9-73.6] <sup>a</sup>	70 [72.0-77.2] <sup>ab</sup>	80 [73.4 - 84.1] <sup>b</sup>	0.014
<b>H/M</b>	(7/54) <sup>a</sup>	(13/29) <sup>b</sup>	(7/14) <sup>b</sup>	0.02 <sup>#</sup>
<b>Tabagismo</b> (%)	8.1	7.0	0	1.0 <sup>#</sup>
<b>Tempo de diabetes</b> (anos)	NA	16.2 ± 13.8	22.4 ± 7.6	0.06 <sup>δ</sup>
<b>Complicações microvasculares do DM</b>				
Retinopatia (%)	NA	30.0 <sup>a</sup>	52.3 <sup>b</sup>	0.02
Neuropatia (%)	NA	22.5 <sup>a</sup>	47.6 <sup>b</sup>	0.02
<b>CKD-EPI</b> (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	95.0[85.2-95.2] <sup>ac</sup>	101 [96.2-108.0] <sup>b</sup>	65.0 [45.2 - 82.3] <sup>c</sup>	0.001
<b>Razão albumina-creatinina</b> (mg/g)	4.0 [3.9-5.14] <sup>a</sup>	6.4[5.5-10.0] <sup>b</sup>	81.4 [48.5 - 1415] <sup>c</sup>	<0.001
<b>Creatinina</b> (mg/dl)	0.80[0.78-0.87] <sup>a</sup>	0.75[0.70-0.80] <sup>a</sup>	0.98 [1.2-3.9] <sup>b</sup>	<0.001
<b>Glicose</b> (mg/dl)	91 [92.5-106] <sup>a</sup>	171[145-189] <sup>b</sup>	181 [162 - 219] <sup>b</sup>	<0.001
<b>HbA1c</b> (%)	ND	8.17 ± 1.72	8.43 ± 1.67	0.26
<b>Colesterol total</b> (mg/dl)	218 ± 46.1 <sup>a</sup>	181 ± 48.2 <sup>b</sup>	199 ± 62.8 <sup>a</sup>	0.02
<b>HDL colesterol</b> (mg/dl)	64.8 ± 17.7	62.4 ± 17.1	63.2 ± 23.9	0.88
<b>LDL colesterol</b> (mg/dl)	127 ± 34.1 <sup>a</sup>	91.8 ± 35.2 <sup>b</sup>	119 ± 32.7 <sup>ab</sup>	0.01
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dl)	107 [110-156]	83[72.8-197]	68 [30.3 - 133]	0.35

Resultados são mostrados como medida ± DP, ou mediana (IC 95% inferior-superior).

(\*) Refere-se a KDIGO G1A1 ou G2A1 e razão albumina/creatinina < 30 mg/g. (\*\*\*)

Refere-se a todas outras categorias de TFG do KADIGO (exceto G1A1 ou G2A1) e/ou razão albumina/creatinina ≥ 30 mg/g. (CA)= circunferência abdominal; (H)= homem;

(M)= mulher; (CKD-EPI) = Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

Equation; (TGF)= taxa de filtração glomerular; (NA) =não aplicável; (ND)=não disponível.

Teste Kruskal-Wallis usado para análise de dados assimétricos e ANOVA

One-Way para variáveis de distribuição normal. O Teste Exato de Fisher (<sup>#</sup>) foi usado

para variáveis categóricas. dTeste T de Student. *P* foi significativa se  $<0.05$ ; letras diferentes significam diferenças entre dois ou mais grupos. Pós teste usado para ANOVA: Tukey; Pós teste usado para Kruskal-Wallis: Dwass-Steel-Christchlow-Fligner.

A TFG foi semelhante entre os grupos controle e DM1 com DRD. Porém, o grupo com DM1 sem DRD apresentou TFG glomerular mais elevada em relação aos outros dois grupos. Os níveis de creatinina foram mais elevados no grupo DM1 com DRD, mas semelhantes entre o grupo controle e DM1 sem DRD.

O grupo DM1 com DRD apresentou níveis mais elevados de albuminúria em relação aos outros grupos.

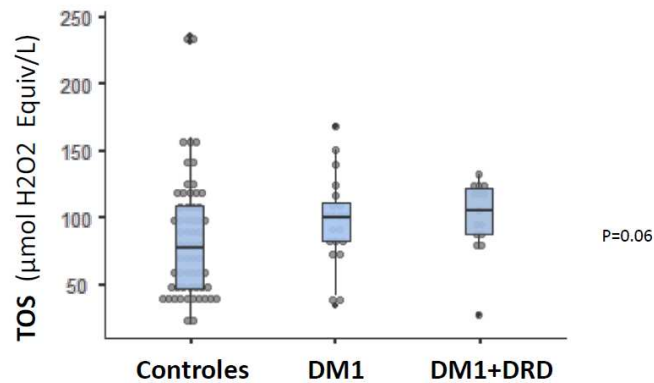
Os valores de glicemia foram semelhantes entre os grupos DM1 com e sem DRD, que foram maiores que o grupo controle. Não houve diferença nos níveis de HbA1C entre os grupos com DM1.

Os níveis de colesterol total foram semelhantes entre os grupos controle e DM1 com DRD e mais reduzido entre pacientes com DM1 sem DRD. O HDL colesterol foi semelhante entre os grupos. O LDL colesterol foi maior no grupo controle em relação ao grupo DM1 sem DRD e semelhante ao grupo DRD com DRD. Os níveis de triglicérides foram semelhantes entre os três grupos.

#### 4.2 Parâmetros do Estresse Oxidativo e Inflamação (TOS, TAC, FRAP, AOPP, PCR)

O TOS apresentou uma tendência de elevação no grupo DM1 com DRD e apresentou queda progressiva entre os grupos DM1 sem DRD e controles ( $p=0.06$ ) (Figura 8).

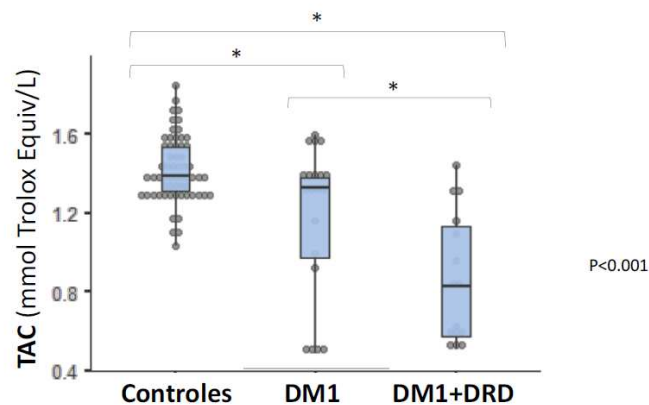
**Figura 8-** TOS nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle



Fonte: confecção própria

Em relação à TAC, esta mostrou-se diferente entre os três grupos analisados. O grupo com menor TAC foi o DM1 com DRD, seguido pelo grupo DM1 sem RDR. O grupo controle apresentou maior TAC em relação aos grupos com DM1. (Figura 9)

**Figura 9-** TAC nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle

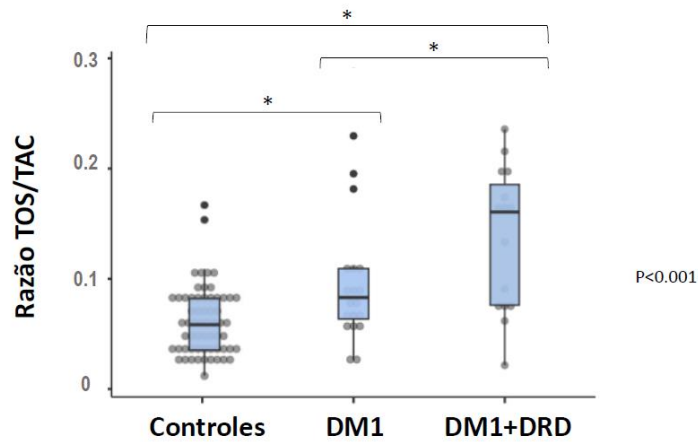


Fonte: confecção própria

A Razão TOS/TAC (índice de estresse oxidativo), um importante marcador do estado geral oxidativo, também identificou diferenças entre os três grupos: a maior

razão foi observada entre os pacientes DM1+DRD, seguido dos pacientes DM1 sem DRD em relação a controles (Figura 10).

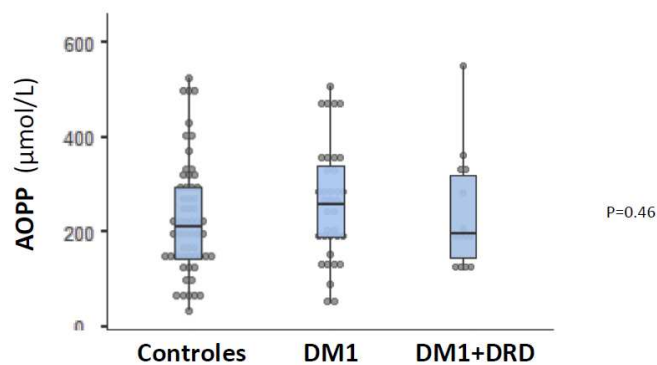
**Figura 10-** Razão TOS/TAC nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle



Fonte: confecção própria

Não foram observadas diferenças nos níveis de AOPP, FRAP e da razão aloxano/ácido úrico entre os três grupos (Figuras 11, 12, 13).

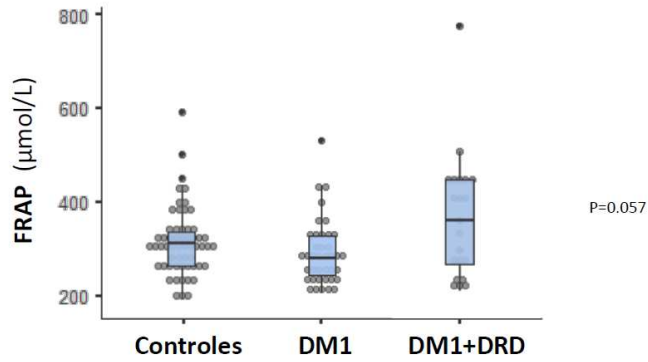
**Figura 11-** AOPP nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle





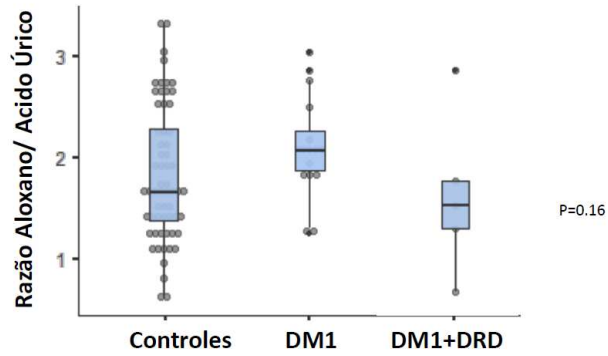
Fonte: confecção própria

**Figura 12-** FRAP nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle



Fonte: confecção própria

**Figura 13-** Razão aloxano/ácido úrico nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle

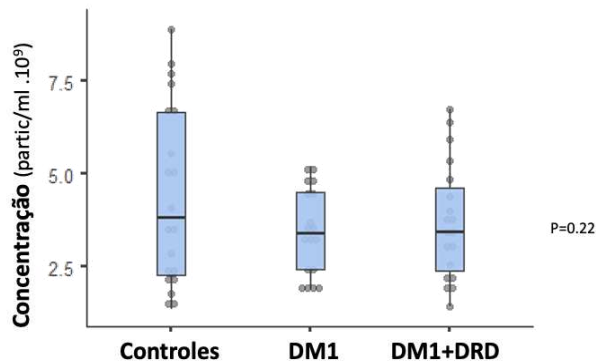


Fonte: confecção própria

### 4.3 Vesículas Extracelulares

As mensurações das EVs mostraram não haver diferenças em suas concentrações entre os grupos DM1 sem DRD, DM1 com DRD e controles. (Figura 14).

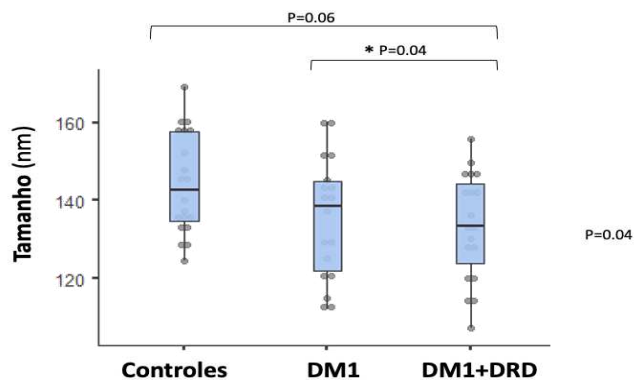
**Figura 14-** Concentração das EVs nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle



Fonte: confecção própria

Foi observado que o grupo DM1 com DRD apresentam tamanho reduzido de EVs em relação ao grupo DM1 sem DRD. (Figura 15);

**Figura 15-** Tamanho das EVs nos pacientes com DM1 com e sem DRD e controle



Fonte: confecção própria

## **5. DISCUSSÃO**

O presente estudo teve como objetivos principais avaliar os parâmetros de estresse oxidativo (TOS, TAC, AAOP, FRAP) e mensuração da concentração e tamanho das EVs entre três grupos de participantes DM1 com DRD, DM1 sem DRD e controles.

Um terço dos participantes com DM1 apresentaram critérios para DRD, que foi definida por TFG  $< 60$  ml/min/1.73<sup>2</sup> e/ou presença razão albumina/creatinina  $\geq 30$  mg/g (THOMAS; COOPER; ZIMMET, 2016b). Da mesma forma, metade dos participantes com DRD apresentaram também retinopatia diabética. Esses dados estão de acordo com a literatura que demonstra coexistência de retinopatia diabética e nefropatia diabética albuminúrica variando de 22% a 62% dos pacientes (BASH et al., 2008), (THORN et al., 2015a). No grupo DM1 sem DRD, foi notado um aumento da TFG em comparação aos grupos controle de DM1 com DRD. Tal fato pode representar a fase de hiperfiltração de uma nefropatia incipiente nesse grupo, ainda não manifestada por presença de albuminúria. Uma elevação de 25 a 50% na TFG é visto precocemente no curso do DM, especialmente no DM1. Hipertrofia glomerular e aumento do tamanho dos rins tipicamente acompanha o aumento da TFG (CORTINOVIS et al., 2022b).

No geral, os três grupos foram homogêneos em relação às suas características clínicas (incluindo tabagismo), exceto por níveis pressóricos mais elevados no grupo DM1 com DRD.

O grupo com DRD apresentou níveis mais elevados de pressão arterial sistólica em relação ao grupo controle e sem DRD. A pressão arterial é um importante fator na patogênese e progressão da DRD. Similar aos efeitos da hiperglicemia, existe uma correlação linear entre pressão arterial e desfechos renais (KU et al., 2016).

Os valores de glicemia e hemoglobina glicada não diferiram entre os grupos de pacientes com e sem DRD. Sabe-se que o controle glicêmico gera impacto no risco de aparecimento e progressão da DRD (STRATTON et al., 2000), e que a redução dos níveis de HbA1C a valores  $< 7\%$  foram associados à reversão da hiperfiltração, regressão da albuminúria e menor risco de desenvolvimento de DRC estágio 3 (TUTTLE, K. R. et al., 1991). Por se tratar de um estudo transversal, o controle glicêmico foi documentado em apenas um momento, não sendo possível inferir o controle glicêmico dos pacientes ao longo da evolução da doença. Ausência de

diferença no controle glicêmico entre os grupo com e sem DRD demonstra que a hiperglicemia não foi um fator de confusão na dosagem dos marcadores de estresse oxidativo e das EVs.

O tempo de diabetes aumenta a chance de evolução para DRD (PERKINS *et al.*, 2003), (DE BOER *et al.*, 2014); em nosso estudo, houve uma tendência do aumento de tempo de diabetes entre os PVDM com DRD quando comparados a PVDM sem DRD ( $p=0.06$ ).

Um dos fatores que vem sendo associado ao desenvolvimento da doença renal do diabetes é o desequilíbrio do estado redox. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, foi observado em nosso estudo: a) tendência, embora não significativa, de aumento do TOS, no grupo de pacientes com DM1 e DRD; b) redução significativa da TAC nos grupos de pacientes com DM1, especialmente no grupo DM1+DRD; c) maior razão TOS/TAC (índice de estresse oxidativo) nos pacientes DM1+DRD, seguido dos pacientes DM1 sem DRD em relação a controles.

Em relação a estes marcadores, os resultados na literatura são heterogêneos, tanto no DM2 quanto no DM1 com e sem complicações.

Sabe-se que pacientes DM2 recém-diagnosticados podem apresentar aumento do TOS, associado a adiposidade e controle glicêmico, mas sem, contudo, exibir diferenças no TAC (LEWKO; STEPINSKI, 2009).

Aslan avaliou o TOS, TAC e o TOS/TAC em controles e pessoas com DM2 com e sem DRD. O grupo DM2 com DRD apresentou maior TOS e maior relação TOS/TAC em comparação aos grupos DM2 sem DRD e controle. Não houve diferença na TAC. (ASLAN, 2007). Diferente de nosso estudo, não houve diferença nesses parâmetros entre os grupos DM sem DRD e controles.

O estudo realizado por Khalili, avaliou 400 participantes (controles, DM2 sem complicações, DM2 com retinopatia diabética e DM2 com neuropatia diabética) quanto ao TOS, TAC e relação TOS/TAC. Foi observado elevação do TOS e redução da TAC na neuropatia, mas não na retinopatia diabética. (KHALILI *et al.*, 2022).

Saygili avaliou parâmetros de estresse oxidativos em pacientes com catarata senil com e sem DM. Foi observado maior TOS e maior relação TOS/TAC no grupo de participantes com DM. (SAYGILI *et al.*, 2010).

Já em pessoas vivendo com DM1, as evidências de desbalanço da relação TOS/TAC parece variar de acordo com o tipo de estudo.

Dados de indivíduos da Coorte *Golden Years* (PVDM1 por mais de 50 anos com baixa prevalência de complicações), não mostrou diferença na TAC entre PVDM1 normoalbuminúricos, com microalbuminúria ou macroalbuminúria. (PRIOR *et al.*, 2011).

No estudo de Darenskaya, que envolveu 89 PVDM1 com DRD e 39 controles, foi observado que a redução da TAC foi mais associada ao desenvolvimento inicial da DRD, perdendo associação a medida que a DRD se tornava estabelecida. (DARENSKAYA *et al.*, 2022)

Ambos resultados em PVDM1 contrastam com a nossa casuística, onde a TAC foi significativamente reduzida nos pacientes com DM1 com e sem DRD.

Embora o grande marcador de doença glomerular seja a presença e o aumento dos níveis de albuminúria urinaria, cerca de 7 a 24% dos pacientes com DM1 e TFG < 60 ml/min/1.73<sup>2</sup>, são normoalbuminúricos (THORN *et al.*, 2015). A progressão da DRD parece ser mais lenta em PVDM normalbuminúricas (MOLITCH, Mark E. *et al.*, 2010). Observamos em nosso estudo 6 PVDM1 com DRD sem microalbuminúria, e que também mantiveram uma relação TOS/TAC elevada, sugerindo uma utilidade potencial para este marcador.

As EVs participam da etiologia de diversas doenças autoimunes, incluindo DM1. Foi demonstrado que células das ilhotas pancreáticas podem liberar exossomos com autoantígenos da célula beta em exossomos (glutamato descarboxilase- GAD; antígeno ilhota- Ia2 e pró-insulina. Aumento dos níveis de citocinas induz estresse do retículo endoplasmático das células beta, resultando em aumento da secreção de exossomos, estabelecendo o ciclo vicioso (CIANCIARUSO *et al.*, 2017).

A contagem de EVs na circulação difere de forma significativa entre pessoas que vivem com e sem diabetes (JANSEN *et al.*, 2013).

No estudo de SABATIER *e cols.* (2002), 47 pessoas vivendo sem diabetes foram comparados a 24 pessoas vivendo com DM1 e 52 pessoas vivendo com DM2 (e baixa prevalência de doença renal) ; observou-se através do estudo por citometria de fluxo, que os valores de EVs endoteliais isoladas por cromatografia de exclusão e (caracterizadas pela marcação ao anticorpo com marcação do epítipo  $\alpha\beta 3$  da molécula de integrina) encontrava-se elevados, assim como as EVs plaquetárias, marcadas por GPIIb/IIIa e a contagem total de EVs (CTM) identificadas pelo anticorpo anexina V. A CTM foi maior em DM1 versus DM2. Neste estudo não foi avaliado o tamanho das EVs, e a quantidade destas no plasma foi bem abaixo do habitualmente descrito.

Um estudo em indivíduos com DM2, foi observado um aumento de EVs derivadas de plaquetas em paciente com doença aterosclerótica estabelecida. (TAN *et al.*, 2005).

Jung avaliou EVs em PVDM2 sem complicações e complicações micro e macrovasculares. Nesse estudo, houve um aumento na concentração de EVs indivíduos com complicações macrovasculares. (JUNG *et al.*, 2011).

Já na metanálise de Li (LI, 2016) que envolveu somente pessoas vivendo com DM2, foi evidenciado um aumento do número de EVs em relação aos controles. Neste estudo foram identificados viés de publicação; Uma das explicações possíveis para o aumento da concentração de EVs seria a elevação de glicemia ou o aumento da taxa de apoptose celular. Altas concentrações de glicose podem induzir um aumento de três vezes na liberação de exossomos pelas células endoteliais (BURGER *et al.*, 2017).

Em PVDM1, normotensos e normoalbuminêmicos, não foram encontradas diferenças entre a concentração ou tamanho de EVs urinárias analisados por *Nanotracking*; todavia, foi possível estimar um aumento da concentração de EVs de origem podocitária através da citometria de fluxo (LYTVYN *et al.*, 2017).

Ogata demonstrou um aumento da concentração das EVs derivadas de monócitos em PVDM2 e retinopatia diabética (OGATA *et al.*, 2006).

Omoto avaliou EVs em indivíduos com DM2 e complicações microvasculares. Foi observado um aumento de EVs de origem de monócitos em pacientes com retinopatia diabética, neuropatia diabética e, principalmente em nefropatia diabética (OMOTO *et al.*, 2002).

Nomura também demonstrou aumento de EVs endoteliais em PVDM2 e DRD.(NOMURA *et al.*, 2004)

Os dados acima mostram que as EVs podem mediar processos patológicos que contribuem para as complicações do diabetes e podem servir como potenciais biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de complicações vasculares e avaliação de resposta aos tratamentos.

Ainda não há estudos sobre o padrão de tamanho e concentração de Evs séricas em pacientes com DM1 sem ND e em diferentes estágios da doença.

Em nosso estudo, não observamos diferença na concentração de EVs entre os grupos estudados. Tal fato pode ser decorrente de diferentes metodologias para a extração das EVs. A maioria dos estudos utilizaram a técnica de citometria de fluxo, enquanto o nosso estudo usou a técnica de *Nanotracking*.

Observamos uma maior dispersão dos dados de concentração de EVs no grupo controle. Esse achado pode ser justificado pela heterogeneidade de participantes desse grupo, que foi composto por indivíduos saudáveis (que participavam com inquérito epidemiológico) e indivíduos com outras comorbidades que não o diabetes e doença renal que compareceram ao laboratório para coleta de material biológico.

Nosso estudo mostrou uma redução no tamanho das EVs nos pacientes com DM1 e DRD em relação a pacientes com DM1 sem doença renal. Não encontramos na literatura estudos sobre tamanho de EVs séricas em pacientes com DM1 e DRD. As alterações das EVs, por sua vez, precisam ser melhor entendidas através do seu papel na expressão de microRNAs.

Estudos apontam o aumento do ácido úrico como um dos fatores associados ao desenvolvimento de microalbuminúria e progressão para DRD (HOVIND *et al.*, 2009), (JALAL *et al.*, 2010), (PILEMANN-LYBERG *et al.*, 2018). Mais recentemente, um estudo com pacientes chineses mostrou que as ações do excesso de ureia



circulantes poderia aumentar a pressão arterial e a dislipidemia que são fatores de risco para DRD (JIANG *et al.*, 2023). A redução da hiperuricemia em pacientes com DM1 sem proteinúria mas TFG ainda preservada (DRD estágio 3) foi observado com o uso de febuxostat, que reduziu a perda de TFG em cerca de 1.79 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> por ano (95% IC, 0.55-3.03)(p = 0.005) (KIMURA *et al.*, 2018). Estes resultados satisfatórios em pacientes com DRD inicial foram complementados pelo estudo PERL em que o tratamento da hiperuricemia com alopurinol na DRD com microlbuminúria moderada não foi capaz de modificar os desfechos de perda de função renal (DORIA *et al.*, 2020). Sabe-se que a oxidação do ácido úrico pode levar a um aumento dos precursores de aloxano endógeno. A molécula do aloxano é habitualmente empregada dentro dos modelos experimentais de diabetes e de doença renal do diabetes, baseado em ações dependentes da formação de espécies reativas de oxigênio (LENZEN, 2008) Em um estudos com crianças com DM1, os níveis de aloxano encontravam-se mais elevados que em controles saudáveis (MROZIKIEWICZ *et al.*, 1994). Não foram aventadas hipóteses para a explicação desse achado. Talvez pela sua instabilidade fisiológica, poucos estudos clínicos com aloxano tenham sido realizados, mas a possibilidade de seu papel no estabelecimento da DRD é bastante plausível.

Nosso estudo apresentou algumas limitações. Como principal, citamos o desenho transversal, que permite a associação, mas impede a avaliação de riscos.

As amostras para análise das EVs foram coletadas em jejum em alguns participantes e no período pós-prandial em outros, o que pode ter contribuído para maior dispersão de resultados pois o estado pós-prandial pode influenciar na concentração de VEs(MØRK *et al.*, 2016), (MØRK *et al.*, 2018).

Como pontos fortes do estudo destacamos, a caracterização da população estudada de pacientes com DM1, do ponto de vista etiológico (presença de ou não de auto-anticorpos), clínico (tempo de doença e HBA1c), e de indivíduos em diferentes estágios da DRD, incluindo aqueles em fase inicial pré-clínica e na fase final de terapia de substituição renal.

Apesar da avaliação dos controles ter sido realizada em um único momento, dados dos participantes foram adjudicados (coleta de glicemia, função renal, perfil

lipídico e avaliação de peso, altura, CA e PA) baseados em informações de prontuário

Por fim, o isolamento e detalhamento das EVs seguiu as mais rigorosas técnicas de validação. Todos os experimentos foram realizados de maneira cega sem identificação de pacientes ou de grupos.

O uso da relação TOS/TAC para avaliação do estresse oxidativo, por incluir todos os mecanismos pró- e anti-oxidantes circulantes, sumarizou eficazmente o status redox dos participantes demonstrando sua alteração durante o estágio de desenvolvimento da DRD.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estresse oxidativo é um fator importante no desenvolvimento da DRD, podendo ser identificado pelo valor do TOS, do TAC e da relação TOS/TAC. Nosso estudo demonstrou, em pacientes com DM1, que a relação TOS/TAC encontra-se aumentada em pacientes com doença renal, sugerindo um papel do estresse oxidativo no desenvolvimento dessa complicação.

O interesse pelo estudo das EVs tem crescido muito nas últimas décadas e cada vez mais tem se constatado a sua importância como marcador de diversas patologias. A formação de EVs parece responder de forma específica a estímulos gerados por diversas doenças, de forma a alterar a sua concentração e tamanho. Nosso estudo demonstrou uma redução do tamanho das EVs em PVDM1 e doença renal, achado ainda não descrito na literatura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERS, Johnny C.; GONDA, David; KIM, Ryan; CARTER, Bob S.; CHEN, Clark C. Biogenesis of extracellular EVsicles (EV): exosomes, microEVsicles, retrovirus-like EVsicles, and apoptotic bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 113, n. 1, p. 1–11, maio 2013. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement\_1, p. S81–S90, 1 jan. 2014. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>.

ARVANITAKIS, Z.; SCHNEIDER, J. A.; WILSON, R. S.; LI, Y.; ARNOLD, S. E.; WANG, Z.; BENNETT, D. A. Diabetes is related to cerebral infarction but not to AD pathology in older persons. **Neurology**, v. 67, n. 11, p. 1960–1965, 12 dez. 2006. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247053.45483.4e>.

ASLAN, Mehmet; SABUNCU, Tefvik; KOCYIGIT, Abdurrahim; CELIK, Hakim; SELEK, Sahbettin. Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 10, p. 734–740, dez. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.08.005>.

BANK, N. Mechanisms of diabetic hyperfiltration. **Kidney International**, v. 40, n. 4, p. 792–807, out. 1991. <https://doi.org/10.1038/ki.1991.277>.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira; COSTA, Neuza Maria Brunoro; ALFENAS, Rita de Cássia Gonçalves; DE PAULA, Sérgio Oliveira; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; BRESSAN, Josefina. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, ago. 2010a. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira; COSTA, Neuza Maria Brunoro; ALFENAS, Rita De Cássia Gonçalves; DE PAULA, Sérgio Oliveira; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; BRESSAN, Josefina. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010b. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BARTOSZ, Grzegorz. Total antioxidant capacity. **Advances in Clinical Chemistry**. [S. l.]: Elsevier, 2003. v. 37, p. 219–292. DOI 10.1016/S0065-2423(03)37010-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242303370106>. Acesso em: 7 abr. 2024.

BENZIE, Iris F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**, v. 91, n. 9, p. 2488–2496, 1 maio 1995. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.9.2488>.

BERLINER, Judith A.; LEITINGER, Norbert; TSIMIKAS, Sotirios. The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50 Suppl, n. Suppl, p. S207-212, abr. 2009. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800074-JLR200>.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; VON GISE, H.; GRUND, K.-E.; WEHRMANN, M.; BATZ, Ch.; BOGENSCHÜTZ, O.; SCHMITT, H.; NAGY, J.; MÜLLER, C.; MÜLLER, G. The Consequences of Tubulo-Interstitial Changes for Renal Function in Glomerulopathies. **Pathology - Research and Practice**, v. 186, n. 1, p. 135–144, fev. 1990. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)81021-6](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)81021-6).

BROWNLEE, Michael. The Pathobiology of Diabetic Complications. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 1 jun. 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>.

BURGER, Dylan; TURNER, Maddison; XIAO, Fengxia; MUNKONDA, Mercedes N.; AKBARI, Shareef; BURNS, Kevin D. High glucose increases the formation and pro-oxidative activity of endothelial microparticles. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1791–1800, set. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4331-2>.

CAVALCANTI, Heloísa Nelson; SILVA FILHO, Tiago João Da; QUEIROZ, Lélia Maria Guedes. EVsículas extracelulares: o que sabemos até agora. **Clinical and Laboratorial Research in Dentistry**, 16 ago. 2021. DOI 10.11606/issn.2357-8041.clrd.2021.180055. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/clrd/article/view/180055>. Acesso em: 13 abr. 2024.

CAVENDER, Matthew A.; STEG, Ph Gabriel; SMITH, Sidney C.; EAGLE, Kim; OHMAN, E. Magnus; GOTO, Shinya; KUDER, Julia; IM, Kyungah; WILSON, Peter W. F.; BHATT, Deepak L.; REACH REGISTRY INVESTIGATORS. Impact of Diabetes Mellitus on Hospitalization for Heart Failure, Cardiovascular Events, and Death: Outcomes at 4 Years From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. **Circulation**, v. 132, n. 10, p. 923–931, 8 set. 2015. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014796>.

CHIEN, Shao-Ju; LIN, I-Chun; HSU, Chien-Ning; LO, Mao-Hung; TAIN, You-Lin. Homocysteine and Arginine-to-Asymmetric Dimethylarginine Ratio Associated With Blood Pressure Abnormalities in Children With Early Chronic Kidney Disease. **Circulation Journal**, v. 79, n. 9, p. 2031–2037, 2015. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0412>.

CIANCIARUSO, Chiara; PHELPS, Edward A.; PASQUIER, Miriella; HAMELIN, Romain; DEMURTAS, Davide; ALIBASHE AHMED, Mohamed; PIEMONTE, Lorenzo; HIROSUE, Sachiko; SWARTZ, Melody A.; DE PALMA, Michele; HUBBELL, Jeffrey A.; BAEKKESKOV, Steinunn. Primary Human and Rat  $\beta$ -Cells Release the Intracellular Autoantigens GAD65, IA-2, and Proinsulin in Exosomes Together With Cytokine-Induced Enhancers of Immunity. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 460–473, 1 fev. 2017. <https://doi.org/10.2337/db16-0671>.

CORTINOVIS, Monica; PERICO, Norberto; RUGGENENTI, Piero; REMUZZI, Andrea; REMUZZI, Giuseppe. Glomerular hyperfiltration. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 18, n. 7, p. 435–451, jul. 2022a. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00559-y>.

CORTINOVIS, Monica; PERICO, Norberto; RUGGENENTI, Piero; REMUZZI, Andrea; REMUZZI, Giuseppe. Glomerular hyperfiltration. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 18, n. 7, p. 435–451, jul. 2022b. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00559-y>.

DA SILVA, Luiza Eunice Sá; GOUVÊA, Ellen de Cássia Dutra Pozzetti; STOPA, Sheila Rizzato; TIERLING, Vera Lúcia; SARDINHA, Luciana Monteiro Vasconcelos; MACARIO, Eduardo Marques; CLARO, Rafael Moreira. Data Resource Profile: Surveillance System of Risk and Protective Factors for Chronic Diseases by Telephone Survey for adults in Brazil (Vigitel). **International Journal of**

**Epidemiology**, v. 50, n. 4, p. 1058–1063, 30 ago. 2021.  
<https://doi.org/10.1093/ije/dyab104>.

DABELEA, Dana; PIHOKER, Catherine; TALTON, Jennifer W.; D'AGOSTINO, Ralph B.; FUJIMOTO, Wilfred; KLINGENSMITH, Georgeanna J.; LAWRENCE, Jean M.; LINDER, Barbara; MARCOVINA, Santica M.; MAYER-DAVIS, Elizabeth J.; IMPERATORE, Giuseppina; DOLAN, Lawrence M.; FOR THE SEARCH FOR DIABETES IN YOUTH STUDY. Etiological Approach to Characterization of Diabetes Type. **Diabetes Care**, v. 34, n. 7, p. 1628–1633, 1 jul. 2011.  
<https://doi.org/10.2337/dc10-2324>.

DARENKAYA, Marina; CHUGUNOVA, Elena; KOLESNIKOV, Sergey; SEMENOVA, Natalya; MICHALEVICH, Isay; NIKITINA, Olga; LESNAYA, Anastasya; KOLESNIKOVA, Lyubov. Receiver Operator Characteristic (ROC) Analysis of Lipids, Proteins, DNA Oxidative Damage, and Antioxidant Defense in Plasma and Erythrocytes of Young Reproductive-Age Men with Early Stages of Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) Nephropathy in the Irkutsk Region, Russia. **Metabolites**, v. 12, n. 12, p. 1282, 16 dez. 2022. <https://doi.org/10.3390/metabo12121282>.

DE BOER, Ian H. Temporal Trends in the Prevalence of Diabetic Kidney Disease in the United States. **JAMA**, v. 305, n. 24, p. 2532, 22 jun. 2011.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2011.861>.

DE BOER, Ian H.; AFKARIAN, Maryam; RUE, Tessa C.; CLEARY, Patricia A.; LACHIN, John M.; MOLITCH, Mark E.; STEFFES, Michael W.; SUN, Wanjie; ZINMAN, Bernard; DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS (DCCT/EDIC) RESEARCH GROUP. Renal outcomes in patients with type 1 diabetes and macroalbuminuria. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 25, n. 10, p. 2342–2350, out. 2014. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013091004>.

DE BOER, Ian H.; FOR THE DCCT/EDIC RESEARCH GROUP. Kidney Disease and Related Findings in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 24–30, 1 jan. 2014. <https://doi.org/10.2337/dc13-2113>.



DERUBERTIS, Frederick R.; CRAVEN, Patricia A.; MELHEM, Mona F.; SALAH, Eman M. Attenuation of Renal Injury in *db / db* Mice Overexpressing Superoxide Dismutase. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 762–768, 1 mar. 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.762>.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP; NATHAN, D. M.; GENUTH, S.; LACHIN, J.; CLEARY, P.; CROFFORD, O.; DAVIS, M.; RAND, L.; SIEBERT, C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 14, p. 977–986, 30 set. 1993. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>.

DIVERS, Jasmin; MAYER-DAVIS, Elizabeth J.; LAWRENCE, Jean M.; ISOM, Scott; DABELEA, Dana; DOLAN, Lawrence; IMPERATORE, Giuseppina; MARCOVINA, Santica; PETTITT, David J; PIHOKER, Catherine; HAMMAN, Richard F.; SAYDAH, Sharon; WAGENKNECHT, Lynne E. Trends in Incidence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Youths — Selected Counties and Indian Reservations, United States, 2002–2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 6, p. 161–165, 14 fev. 2020. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6906a3>.

DORIA, Alessandro; GALECKI, Andrzej T.; SPINO, Cathie; POP-BUSUI, Rodica; CHERNEY, David Z.; LINGVAY, Ildiko; PARSA, Afshin; ROSSING, Peter; SIGAL, Ronald J.; AFKARIAN, Maryam; ARONSON, Ronnie; CARAMORI, M. Luiza; CRANDALL, Jill P.; DE BOER, Ian H.; ELLIOTT, Thomas G.; GOLDFINE, Allison B.; HAW, J. Sonya; HIRSCH, Irl B.; KARGER, Amy B.; ... PERL STUDY GROUP. Serum Urate Lowering with Allopurinol and Kidney Function in Type 1 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 26, p. 2493–2503, 25 jun. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916624>.

EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION; SARWAR, N.; GAO, P.; SESHASAI, S. R. Kondapally; GOBIN, R.; KAPTOGE, S.; DI ANGELANTONIO, E.; INGELSSON, E.; LAWLOR, D. A.; SELVIN, E.; STAMPFER, M.; STEHOUWER, C. D. A.; LEWINGTON, S.; PENNELLS, L.; THOMPSON, A.; SATTAR, N.; WHITE, I. R.; RAY, K. K.; DANESH, J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies.

**Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9733, p. 2215–2222, 26 jun. 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9).

EREL, Ozcan. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. **Revista Da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997. <https://doi.org/10.1590/s0104-42301997000100014>.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997a. DOI 10.1590/S0104-42301997000100014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt). Acesso em: 2 nov. 2023.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997b. DOI 10.1590/S0104-42301997000100014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt). Acesso em: 27 fev. 2023.

FICOCIELLO, Linda H.; PERKINS, Bruce A.; ROSHAN, Bijan; WEINBERG, Janice M.; ASCHENGRAU, Ann; WARRAM, James H.; KROLEWSKI, Andrzej S. Renal Hyperfiltration and the Development of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 5, p. 889–893, 1 maio 2009. <https://doi.org/10.2337/dc08-1560>.

FORBES, Josephine M.; COUGHLAN, Melinda T.; COOPER, Mark E. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1446–1454, 1 jun. 2008. <https://doi.org/10.2337/db08-0057>.

GALVAN, Daniel L.; GREEN, Nathanael H.; DANESH, Farhad R. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 92, n. 5, p. 1051–1057, nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.05.034>.

GARCIA-BELLO, Juan Antonio; GÓMEZ-DÍAZ, Rita A.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, Alicia; TALAVERA, Juan O.; MONDRAGÓN-GONZÁLEZ, Rafael; SANCHEZ-BARBOSA, Lorena; DIAZ-FLORES, Margarita; VALLADARES-SALGADO, Adan; GALLARDO, Juan Manuel; AGUILAR-KITSU, Alejandra; LAGUNAS-MUNOZ, Jesus; WACHER, Niels H. Carotid intima media thickness, oxidative stress, and inflammation in children with chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 29, n. 2, p. 273–281, fev. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2626-1>.

GORDON, T.; CASTELLI, W. P.; HJORTLAND, M. C.; KANNEL, W. B.; DAWBER, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. **The American Journal of Medicine**, v. 62, n. 5, p. 707–714, maio 1977. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(77\)90874-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(77)90874-9).

GREEN, Katherine; BRAND, Martin D.; MURPHY, Michael P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl\_1, p. S110–S118, 1 fev. 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S110>.

HAFFNER, S. M.; LEHTO, S.; RÖNNEMAA, T.; PYÖRÄLÄ, K.; LAAKSO, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 4, p. 229–234, 23 jul. 1998. <https://doi.org/10.1056/NEJM1998072333390404>.

HANASAND, Marita; OMDAL, Roald; NORHEIM, Katrine B.; GØRANSSON, Lasse G.; BREDE, Cato; JONSSON, Grete. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 18 maio 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.038>.

HARINDHANAVUDHI, Tasma; PARKS, Alicia; MAUER, Michael; CARAMORI, M. Luiza. Podocyte Structural Parameters Do Not Predict Progression to Diabetic Nephropathy in Normoalbuminuric Type 1 Diabetic Patients. **American Journal of Nephrology**, v. 41, n. 4–5, p. 277–283, 2015. <https://doi.org/10.1159/000381992>.

HE, Long; HE, Ting; FARRAR, Shabnam; JI, Linbao; LIU, Tianyi; MA, Xi. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species.

**Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017. <https://doi.org/10.1159/000485089>.

HIMMELFARB, Jonathan. Relevance of Oxidative Pathways in the Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. **Cardiology Clinics**, v. 23, n. 3, p. 319–330, ago. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2005.03.005>.

HOJS, Radovan; EKART, Robert; BEVC, Sebastjan; HOJS, Nina. Markers of Inflammation and Oxidative Stress in the Development and Progression of Renal Disease in Diabetic Patients. **Nephron**, v. 133, n. 3, p. 159–162, 2016. <https://doi.org/10.1159/000447434>.

HOLT, Richard I.G.; DEVRIES, J. Hans; HESS-FISCHL, Amy; HIRSCH, Irl B.; KIRKMAN, M. Sue; KLUPA, Tomasz; LUDWIG, Barbara; NØRGAARD, Kirsten; PETTUS, Jeremy; RENARD, Eric; SKYLER, Jay S.; SNOEK, Frank J.; WEINSTOCK, Ruth S.; PETERS, Anne L. The Management of Type 1 Diabetes in Adults. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetes Care**, v. 44, n. 11, p. 2589–2625, 1 nov. 2021a. <https://doi.org/10.2337/dci21-0043>.

HOLT, Richard I.G.; DEVRIES, J. Hans; HESS-FISCHL, Amy; HIRSCH, Irl B.; KIRKMAN, M. Sue; KLUPA, Tomasz; LUDWIG, Barbara; NØRGAARD, Kirsten; PETTUS, Jeremy; RENARD, Eric; SKYLER, Jay S.; SNOEK, Frank J.; WEINSTOCK, Ruth S.; PETERS, Anne L. The Management of Type 1 Diabetes in Adults. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetes Care**, v. 44, n. 11, p. 2589–2625, 1 nov. 2021b. <https://doi.org/10.2337/dci21-0043>.

HOVIND, Peter; ROSSING, Peter; TARNOW, Lise; JOHNSON, Richard J.; PARVING, Hans-Henrik. Serum Uric Acid as a Predictor for Development of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1668–1671, 1 jul. 2009. <https://doi.org/10.2337/db09-0014>.

JALAL, D. I.; RIVARD, C. J.; JOHNSON, R. J.; MAAHS, D. M.; MCFANN, K.; REWERS, M.; SNELL-BERGEON, J. K. Serum uric acid levels predict the development of albuminuria over 6 years in patients with type 1 diabetes: Findings

from the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 6, p. 1865–1869, 1 jun. 2010. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp740>.

JANGHORBANI, Mohsen; HU, Frank B.; WILLETT, Walter C.; LI, Tricia Y.; MANSON, Joann E.; LOGROSCINO, Giancarlo; REXRODE, Kathryn M. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1730–1735, jul. 2007. <https://doi.org/10.2337/dc06-2363>.

JANSEN, Felix; YANG, Xiaoyan; FRANKLIN, Bernardo S.; HOELSCHER, Marion; SCHMITZ, Theresa; BEDORF, Jörg; NICKENIG, Georg; WERNER, Nikos. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. **Cardiovascular Research**, v. 98, n. 1, p. 94–106, 1 abr. 2013. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt013>.

JENSEN, Elizabeth T.; STAFFORD, Jeanette M.; SAYDAH, Sharon; D'AGOSTINO, Ralph B.; DOLAN, Lawrence M.; LAWRENCE, Jean M.; MARCOVINA, Santica; MAYER-DAVIS, Elizabeth J.; PIHOKER, Catherine; REWERS, Arleta; DABELEA, Dana. Increase in Prevalence of Diabetic Ketoacidosis at Diagnosis Among Youth With Type 1 Diabetes: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes Care**, v. 44, n. 7, p. 1573–1578, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.2337/dc20-0389>.

JIANG, Jun; ZHOU, Xiaowan; LAN, Lei; REN, Wei. The correlation between serum uric acid and diabetic kidney disease in type 1 diabetes patients in Anhui, China. **BMC Nephrology**, v. 24, n. 1, p. 252, 24 ago. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12882-023-03302-2>.

KASHIHARA, N.; HARUNA, Y.; K. KONDETI, V.; S. KANWAR, Y. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4256–4269, 1 dez. 2010. <https://doi.org/10.2174/092986710793348581>.

KHALILI, Farnaz; VAISI - RAYGANI, Asad; SHAKIBA, Ebrahim; KOHSARI, Maryam; DEHBANI, Maryam; NASERI, Rozita; ASADI, Soheila; RAHIMI, Ziba; RAHIMI, Mehrali; RAHIMI, Zohreh. Oxidative stress parameters and keap 1 variants in T2DM: Association with T2DM, diabetic neuropathy, diabetic retinopathy, and obesity.

**Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 1, p. e24163, jan. 2022. <https://doi.org/10.1002/jcla.24163>.

KHINE, Htet W.; TEIBER, John F.; HALEY, Robert W.; KHERA, Amit; AYERS, Colby R.; ROHATGI, Anand. Association of the serum myeloperoxidase/high-density lipoprotein particle ratio and incident cardiovascular events in a multi-ethnic population: Observations from the Dallas Heart Study. **Atherosclerosis**, v. 263, p. 156–162, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.007>.

KIMURA, Kenjiro; HOSOYA, Tatsuo; UCHIDA, Shunya; INABA, Masaaki; MAKINO, Hirofumi; MARUYAMA, Shoichi; ITO, Sadayoshi; YAMAMOTO, Tetsuya; TOMINO, Yasuhiko; OHNO, Iwao; SHIBAGAKI, Yugo; IIMURO, Satoshi; IMAI, Naohiko; KUWABARA, Masanari; HAYAKAWA, Hiroshi; OHTSU, Hiroshi; OHASHI, Yasuo; FEATHER STUDY INVESTIGATORS. Febuxostat Therapy for Patients With Stage 3 CKD and Asymptomatic Hyperuricemia: A Randomized Trial. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 72, n. 6, p. 798–810, dez. 2018. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.06.028>.

KITTA, Yoshinobu; OBATA, Jyun-ei; NAKAMURA, Takamitsu; HIRANO, Mitsumasa; KODAMA, Yasushi; FUJIOKA, Daisuke; SAITO, Yukio; KAWABATA, Ken-Ichi; SANO, Keita; KOBAYASHI, Tsuyoshi; YANO, Toshiaki; NAKAMURA, Kazuto; KUGIYAMA, Kiyotaka. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 4, p. 323–330, 27 jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.08.074>.

KOLÁR, J. [Annual report of the Officers of the Czech Radiologic Society for the functional period 1973-1977]. **Ceskoslovenska Radiologie**, v. 31, n. 5, p. 351–354, set. 1977. .

KOTUR-STEVLJEVIĆ, Jelena; PECO-ANTIĆ, Amira; SPASIĆ, Slavica; STEFANOVIĆ, Aleksandra; PARIPOVIĆ, Dušan; KOSTIĆ, Mirjana; VASIĆ, Dragan; VUJOVIĆ, Ana; JELIĆ-IVANOVIĆ, Zorana; SPASOJEVIĆ-KALIMANOVSKA, EVsna; KORNIC-RISTOVSKI, Danijela. Hyperlipidemia, oxidative stress, and intima media thickness in children with chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 28, n. 2, p. 295–303, fev. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2323-5>.

KROLEWSKI, Andrzej S. Progressive Renal Decline: The New Paradigm of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 6, p. 954–962, 1 jun. 2015. <https://doi.org/10.2337/dc15-0184>.

KROLEWSKI, Andrzej S.; WARRAM, James H.; CHRISTLIEB, A.Richard; BUSICK, Edward J.; KAHN, C.Ronald. The changing natural history of nephropathy in type I Diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 78, n. 5, p. 785–794, maio 1985. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90284-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90284-0).

KU, Elaine; MCCULLOCH, Charles E.; MAUER, Michael; GITELMAN, Stephen E.; GRIMES, Barbara A.; HSU, Chi-Yuan. Association Between Blood Pressure and Adverse Renal Events in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 39, n. 12, p. 2218–2224, dez. 2016. <https://doi.org/10.2337/dc16-0857>.

LAKHTER, Alexander J.; SIMS, Emily K. Minireview: Emerging Roles for Extracellular EVsicles in Diabetes and Related Metabolic Disorders. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 29, n. 11, p. 1535–1548, nov. 2015. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1206>.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, fev. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>.

LESTIENNE, P.; BATAILLÉ, N. Mitochondrial DNA alterations and genetic diseases: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 48, n. 5–6, p. 199–214, jan. 1994. [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0753-3322(94)90134-1).

LEWKO, Barbara; STEPINSKI, Jan. Hyperglycemia and mechanical stress: Targeting the renal podocyte. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 2, p. 288–295, nov. 2009. <https://doi.org/10.1002/jcp.21856>.

LI, Sheyu; WEI, Jia; ZHANG, Chenghui; LI, Xiaodan; MENG, Wentong; MO, Xianming; ZHANG, Qianying; LIU, Qilin; REN, Kaiyun; DU, Rong; TIAN, Haoming; LI, Jianwei. Cell-Derived Microparticles in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 2439–2450, 2016. <https://doi.org/10.1159/000452512>.

LYTVYN, Yuliya; XIAO, Fengxia; KENNEDY, Christopher R. J.; PERKINS, Bruce A.; REICH, Heather N.; SCHOLEY, James W.; CHERNEY, David Z.; BURGER, Dylan. Assessment of urinary microparticles in normotensive patients with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 3, p. 581–584, mar. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4190-2>.

MAGLIANO, Dianna J.; BOYKO, Edward J.; IDF DIABETES ATLAS 10TH EDITION SCIENTIFIC COMMITTEE. **IDF DIABETES ATLAS**. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021 (IDF Diabetes Atlas). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581934/>. Acesso em: 12 mar. 2023.

MANSO, C. [Oxygen free radicals]. **Acta Medica Portuguesa**, v. 2, n. 2, p. 59–60, 1989. .

MELLO FILHO, A C; HOFFMANN, M E; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 273–275, 15 fev. 1984. <https://doi.org/10.1042/bj2180273>.

MOGENSEN, C. E.; ANDERSEN, M. J. F. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: Normalization by insulin-treatment. **Diabetologia**, v. 11, n. 3, p. 221–224, jun. 1975. <https://doi.org/10.1007/BF00422325>.

MOLITCH, M. E.; STEFFES, M. W.; CLEARY, P. A.; NATHAN, D. M. Baseline analysis of renal function in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group [corrected]. **Kidney International**, v. 43, n. 3, p. 668–674, mar. 1993. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.96>.

MOLITCH, Mark E.; STEFFES, Michael; SUN, Wanjie; RUTLEDGE, Brandy; CLEARY, Patricia; DE BOER, Ian H.; ZINMAN, Bernard; LACHIN, John; EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS STUDY GROUP. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1536–1543, jul. 2010. <https://doi.org/10.2337/dc09-1098>.

MØRK, Morten; NIELSEN, Morten H.; BÆK, Rikke; JØRGENSEN, Malene M.; PEDERSEN, Shona; KRISTENSEN, Søren R. Postprandial Increase in Blood Plasma



Levels of Tissue Factor-Bearing (and Other) MicroEVsicles Measured by Flow Cytometry: Fact or Artifact? **TH open: companion journal to thrombosis and haemostasis**, v. 2, n. 2, p. e147–e157, abr. 2018. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1642021>.

MØRK, Morten; PEDERSEN, Shona; BOTHA, Jaco; LUND, Sigrid Marie; KRISTENSEN, Søren Risom. Preanalytical, analytical, and biological variation of blood plasma submicron particle levels measured with nanoparticle tracking analysis and tunable resistive pulse sensing. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory InEVstigation**, v. 76, n. 5, p. 349–360, set. 2016. <https://doi.org/10.1080/00365513.2016.1178801>.

MROZIKIEWICZ, A.; KIEŁCZEWSKA-MROZIKIEWICZ, D.; ŁOWICKI, Z.; CHMARA, E.; KORZENIOWSKA, K.; MROZIKIEWICZ, P. M. Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 31, n. 4, p. 236–237, dez. 1994. <https://doi.org/10.1007/BF00571958>.

NAKAJIMA, Katsuyuki; NAKANO, Takamitsu; TANAKA, Akira. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 367, n. 1–2, p. 36–47, maio 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.013>.

NAVANEETHAN, Sankar D.; ZOUNGAS, Sophia; CARAMORI, M. Luiza; CHAN, Juliana C.N.; HEERSPINK, Hidde J.L.; HURST, Clint; LIEW, Adrian; MICHOS, Erin D.; OLOWU, Wasiu A.; SADUSKY, Tami; TANDON, Nikhil; TUTTLE, Katherine R.; WANNER, Christoph; WILKENS, Katy G.; CRAIG, Jonathan C.; TUNNICLIFFE, David J.; TONELLI, Marcello; CHEUNG, Michael; EARLEY, Amy; ... KHUNTI, Kamlesh. Diabetes Management in Chronic Kidney Disease: Synopsis of the KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline Update. **Annals of Internal Medicine**, v. 176, n. 3, p. 381–387, mar. 2023. <https://doi.org/10.7326/M22-2904>.

NESTO, R. CHD: a major burden in type 2 diabetes. **Acta Diabetologica**, v. 38, n. 5, p. S3–S8, 1 set. 2001. <https://doi.org/10.1007/s005920170002>.

NISTALA, Ravi; WHALEY-CONNELL, Adam; SOWERS, James R. Redox Control of Renal Function and Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 12, p. 2047–2089, dez. 2008. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2034>.

PAOLETTI, Rodolfo; GOTTO, Antonio M.; HAJJAR, David P. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III20-26, 15 jun. 2004. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131514.71167.2e>.

PAVKOV, M. E.; KNOWLER, W. C.; BENNETT, P. H.; LOOKER, H. C.; KRAKOFF, J.; NELSON, R. G. Increasing incidence of proteinuria and declining incidence of end-stage renal disease in diabetic Pima Indians. **Kidney International**, v. 70, n. 10, p. 1840–1846, nov. 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001882>.

PERKINS, Bruce A.; FICOCIELLO, Linda H.; SILVA, Kristen H.; FINKELSTEIN, Dianne M.; WARRAM, James H.; KROLEWSKI, Andrzej S. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 23, p. 2285–2293, 5 jun. 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021835>.

PICHLER, Raimund; AFKARIAN, Maryam; DIETER, Brad P.; TUTTLE, Katherine R. Immunity and inflammation in diabetic kidney disease: translating mechanisms to biomarkers and treatment targets. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 312, n. 4, p. F716–F731, 1 abr. 2017. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00314.2016>.

PILEMANN-LYBERG, S.; LINDHARDT, M.; PERSSON, Frederik; ANDERSEN, S.; ROSSING, P. Serum uric acid and progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 32, n. 5, p. 470–473, maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.02.002>.

PODREZ, E. A.; FEBBRAIO, M.; SHEIBANI, N.; SCHMITT, D.; SILVERSTEIN, R. L.; HAJJAR, D. P.; COHEN, P. A.; FRAZIER, W. A.; HOFF, H. F.; HAZEN, S. L. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 8, p. 1095–1108, abr. 2000. <https://doi.org/10.1172/JCI8574>.

POPOLO, A.; AUTORE, G.; PINTO, A.; MARZOCCO, S. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. **Free Radical Research**, v. 47, n. 5, p. 346–356, maio 2013. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.779373>.

PRIOR, Sarah Lyn; TANG, Ting Seng; GILL, Geoff V.; BAIN, Steve C.; STEPHENS, Jeffrey W. Adiponectin, total antioxidant status, and urine albumin excretion in the low-risk “Golden Years” type 1 diabetes mellitus cohort. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 60, n. 2, p. 173–179, fev. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.12.008>.

QIAN, Ying; FELDMAN, Eva; PENNATHUR, Subramanian; KRETZLER, Matthias; BROSIUS, Frank C. From Fibrosis to Sclerosis. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1439–1445, 1 jun. 2008. <https://doi.org/10.2337/db08-0061>.

RALPH DE FRONZO. **International Textbook of Diabetes Mellitus**. [S. l.: s. n.], 2015.

RIBEIRO, L. M. [Oxygen free-radicals in medicine (2)]. **Acta Medica Portuguesa**, v. 2, n. 3, p. 173–177, 1989. .

ROSSING, Peter; CARAMORI, M. Luiza; CHAN, Juliana C.N.; HEERSPINK, Hidde J.L.; HURST, Clint; KHUNTI, Kamlesh; LIEW, Adrian; MICHOS, Erin D.; NAVANEETHAN, Sankar D.; OLOWU, Wasiu A.; SADUSKY, Tami; TANDON, Nikhil; TUTTLE, Katherine R.; WANNER, Christoph; WILKENS, Katy G.; ZOUNGAS, Sophia; DE BOER, Ian H. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. **Kidney International**, v. 102, n. 5, p. S1–S127, nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.06.008>.

SABATIER, Florence; DARMON, Patrice; HUGEL, Benedicte; COMBES, Valery; SANMARCO, Marielle; VELUT, Jean-Gabriel; ARNOUX, Dominique; CHARPIOT, Phillipe; FREYSSINET, Jean-Marie; OLIVER, Charles; SAMPOL, Jose; DIGNAT-GEORGE, Françoise. Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles. **Diabetes**, v. 51, n. 9, p. 2840–2845, 1 set. 2002. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2840>.

SABATINE, Marc S.; GIUGLIANO, Robert P.; KEECH, Anthony C.; HONARPOUR, Narimon; WIVIOTT, Stephen D.; MURPHY, Sabina A.; KUDER, Julia F.; WANG, Huei;

LIU, Thomas; WASSERMAN, Scott M.; SEVER, Peter S.; PEDERSEN, Terje R.; FOURIER STEERING COMMITTEE AND INVESTIGATORS. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 18, p. 1713–1722, 4 maio 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615664>.

SALEM, Mona Abd El Kader; ADLY, Amira Abdel Moneam; ISMAIL, Eman Abdel Rahman; DARWISH, Yasser Wagih; KAMEL, Hosam Adly. Platelets microparticles as a link between micro- and macro-angiopathy in young patients with type 1 diabetes. **Platelets**, v. 26, n. 7, p. 682–688, 3 out. 2015. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1018880>.

SAYGILI, E.I.; AKSOY, S.N.; GURLER, B.; AKSOY, A.; EREL, O.; OZASLAN, M. Oxidant/Antioxidant Status of Patients with Diabetic and Senile Cataract. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 1, p. 1648–1652, jan. 2010. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0020-8>.

SELVIN, Elizabeth; CRAINICEANU, Ciprian M.; BRANCATI, Frederick L.; CORESH, Josef. Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 14, p. 1545–1551, 23 jul. 2007. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.14.1545>.

SILVERMAN, Michael G.; FERENC, Brian A.; IM, Kyungah; WIVIOTT, Stephen D.; GIUGLIANO, Robert P.; GRUNDY, Scott M.; BRAUNWALD, Eugene; SABATINE, Marc S. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 316, n. 12, p. 1289–1297, 27 set. 2016. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.13985>.

STEINBERG, Daniel; WITZTUM, Joseph L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 12, p. 2311–2316, dez. 2010a. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179697>.

STEINBERG, Daniel; WITZTUM, Joseph L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 12, p. 2311–2316, dez. 2010b. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179697>.

STRATTON, I. M.; ADLER, A. I.; NEIL, H. A.; MATTHEWS, D. R.; MANLEY, S. E.; CULL, C. A.; HADDEN, D.; TURNER, R. C.; HOLMAN, R. R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 321, n. 7258, p. 405–412, 12 ago. 2000. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.405>.

SUGAHARA, Mai; PAK, Wai Lun Will; TANAKA, Tetsuhiro; TANG, Sydney C. W.; NANGAKU, Masaomi. Update on diagnosis, pathophysiology, and management of diabetic kidney disease. **Nephrology**, v. 26, n. 6, p. 491–500, jun. 2021. <https://doi.org/10.1111/nep.13860>.

TABAS, Ira. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 905–911, out. 2002. <https://doi.org/10.1172/JCI16452>.

TBAHRITI, Hadja Fatima; KADDOUS, Abbou; BOUCHENAK, Malika; MEKKI, Khedidja. Effect of Different Stages of Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapies on Oxidant-Antioxidant Balance in Uremic Patients. **Biochemistry Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013a. <https://doi.org/10.1155/2013/358985>.

TBAHRITI, Hadja Fatima; KADDOUS, Abbou; BOUCHENAK, Malika; MEKKI, Khedidja. Effect of Different Stages of Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapies on Oxidant-Antioxidant Balance in Uremic Patients. **Biochemistry Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013b. <https://doi.org/10.1155/2013/358985>.

THE RELATIONSHIP OF GLYCEMIC EXPOSURE (HBA1C) TO THE RISK OF DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF RETINOPATHY IN THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL. **Diabetes**, v. 44, n. 8, p. 968–983, ago. 1995. .

THOMAS, Merlin C.; BROWNLEE, Michael; SUSZTAK, Katalin; SHARMA, Kumar; JANDELEIT-DAHME, Karin A. M.; ZOUNGAS, Sophia; ROSSING, Peter; GROOP, Per-Henrik; COOPER, Mark E. Diabetic kidney disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15018, 30 jul. 2015a. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.18>.

THOMAS, Merlin C.; BROWNLEE, Michael; SUSZTAK, Katalin; SHARMA, Kumar; JANDELEIT-DAHME, Karin A. M.; ZOUNGAS, Sophia; ROSSING, Peter; GROOP, Per-Henrik; COOPER, Mark E. Diabetic kidney disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15018, 30 jul. 2015b. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.18>.

THOMAS, Merlin C.; BROWNLEE, Michael; SUSZTAK, Katalin; SHARMA, Kumar; JANDELEIT-DAHME, Karin A. M.; ZOUNGAS, Sophia; ROSSING, Peter; GROOP, Per-Henrik; COOPER, Mark E. Diabetic kidney disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15018, 30 jul. 2015c. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.18>.

THOMAS, Merlin C.; COOPER, Mark E.; ZIMMET, Paul. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 12, n. 2, p. 73–81, fev. 2016a. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.173>.

THOMAS, Merlin C.; COOPER, Mark E.; ZIMMET, Paul. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 12, n. 2, p. 73–81, fev. 2016b. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.173>.

THORN, Lena M.; GORDIN, Daniel; HARJUTSALO, Valma; HÄGG, Stefanie; MASAR, Robert; SARAHEIMO, Markku; TOLONEN, Nina; WADÉN, Johan; GROOP, Per-Henrik; FORSBLOM, Carol M.; FINNDIANE STUDY GROUP. The Presence and Consequence of Nonalbuminuric Chronic Kidney Disease in Patients With Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 11, p. 2128–2133, nov. 2015. <https://doi.org/10.2337/dc15-0641>.

TUOMILEHTO, Jaakko; LINDSTRÖM, Jaana; ERIKSSON, Johan G.; VALLE, Timo T.; HÄMÄLÄINEN, Helena; ILANNE-PARIKKA, Pirjo; KEINÄNEN-KIUKAANNIEMI, Sirkka; LAAKSO, Mauri; LOUHERANTA, Anne; RASTAS, Merja; SALMINEN, Virpi; AUNOLA, Sirkka; CEPAITIS, Zygimantas; MOLTCHANOV, Vladislav; HAKUMÄKI, Martti; MANNELIN, Marjo; MARTIKKALA, EVsa; SUNDVALL, Jouko; UUSITUPA, Matti. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 18, p. 1343–1350, 3 maio 2001. <https://doi.org/10.1056/NEJM200105033441801>.

TUTTLE, K. R.; BRUTON, J. L.; PERUSEK, M. C.; LANCASTER, J. L.; KOPP, D. T.; DEFRONZO, R. A. Effect of strict glyceamic control on renal hemodynamic response to amino acids and renal enlargement in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 23, p. 1626–1632, 6 jun. 1991. <https://doi.org/10.1056/NEJM199106063242304>.

TUTTLE, Katherine R.; JONES, Cami R.; DARATHA, Kenn B.; KOYAMA, Alain K.; NICHOLAS, Susanne B.; ALICIC, Radica Z.; DURU, O. Kenrik; NEUMILLER, Joshua J.; NORRIS, Keith C.; RÍOS BURROWS, Nilka; PAVKOV, Meda E. Incidence of Chronic Kidney Disease among Adults with Diabetes, 2015-2020. **The New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 15, p. 1430–1431, 13 out. 2022. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2207018>.

VALLON, Volker; ROSE, Michael; GERASIMOVA, Maria; SATRIANO, Joseph; PLATT, Kenneth A.; KOEPESELL, Hermann; CUNARD, Robyn; SHARMA, Kumar; THOMSON, Scott C.; RIEG, Timo. Knockout of Na-glucose transporter SGLT2 attenuates hyperglycemia and glomerular hyperfiltration but not kidney growth or injury in diabetes mellitus. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 304, n. 2, p. F156–F167, 15 jan. 2013. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00409.2012>.

WATERS, Christopher M.; BASSLER, Bonnie L. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 319–346, 1 nov. 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>.

WEBER, Christian; NOELS, Heidi. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1410–1422, 7 nov. 2011. <https://doi.org/10.1038/nm.2538>.

WOŁONCIEJ, Marta; MILEWSKA, Elżbieta; ROSZKOWSKA-JAKIMIEC, Wiesława. Trace elements as an activator of antioxidant enzymes. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 70, p. 1483–1498, 31 dez. 2016. <https://doi.org/10.5604/17322693.1229074>.

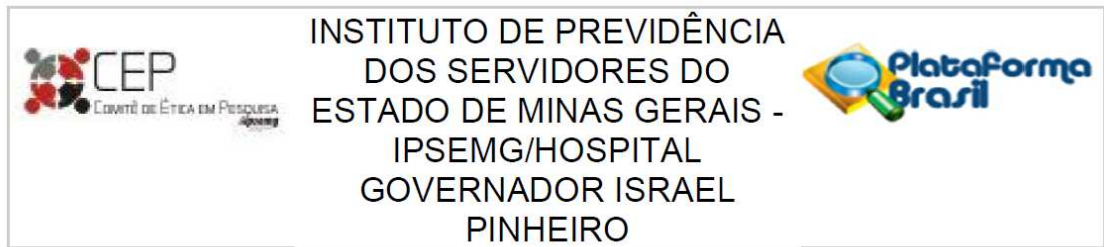
YÁÑEZ - MÓ, María; SILJANDER, Pia R. - M.; ANDREU, Zoraida; BEDINA ZAVEC, Apolonija; BORRÀS, Francesc E.; BUZAS, Edit I.; BUZAS, Krisztina; CASAL,

Enriqueta; CAPPELLO, Francesco; CARVALHO, Joana; COLÁS, Eva; CORDEIRO - DA SILVA, Anabela; FAIS, Stefano; FALCON - PEREZ, Juan M.; GHOBRIAL, Irene M.; GIEBEL, Bernd; GIMONA, Mario; GRANER, Michael; GURSEL, Ihsan; ... DE WEVER, Olivier. Biological properties of extracellular EVsicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular EVsicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, jan. 2015. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.



## **8. ANEXOS**

## Anexo 1



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** MicroRNAs na Doença Renal do Diabetes**Pesquisador:** SARA DE CASTRO OLIVEIRA**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 35168720.0.0000.5136**Instituição Proponente:** Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais -**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 4.233.345**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo transversal do tipo casos e controles que se propõe a avaliar a eficácia do uso de marcadores no sangue e na urina de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1, buscando associá-los ao diagnóstico mais precoce da doença renal do diabetes. Um dos problemas da doença renal do diabetes é a ausência de sintomas nos períodos iniciais. O curso da doença renal do diabetes pode ser abrandado através de prevenção primária ou secundária. Portanto, existe uma grande necessidade de que o rastreamento seja o mais precoce possível. Atualmente, o diagnóstico de doença renal do diabetes é baseado na excreção urinária de albumina. Embora amplamente validada, ela possui algumas limitações. Sendo assim, vem sendo realizado um esforço na busca de marcadores alternativos e mais precoces de doença renal do diabetes. A proposta desse estudo é explorar o uso destes marcadores no sangue e na urina de pacientes com diabetes mellitus tipo 1, buscando associá-los ao diagnóstico da doença renal do diabetes.

Estes marcadores serão avaliados em pacientes diabéticos e em pacientes não diabéticos. Serão dosados os seguintes marcadores: microRNA 126, micro-RNA 217, KIM-1, NGAL, cistatina-C, beta2-microglobulina, ácido úrico, marcadores de estresse oxidativo e metabólico no sangue e na urina dos participantes

**Endereço:** Alameda Ezequiel Dias, 225, 11º andar**Bairro:** Santa Efigênia**CEP:** 30.130-110**UF:** MG**Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3237-2813**Fax:** (31)3237-2273**E-mail:** cep.hgip@ipsemg.mg.gov.br

Serão convidados a participar do estudo pacientes adultos portadores de diabetes mellitus tipo 1 atendidos no ambulatório de endocrinologia do IPSEMG e pacientes que estiverem coletando amostras de sangue/urina no IPSEMG e que não tenham história de diabetes (grupo controle)

O estudo prevê o número de 77 pacientes diabéticos e 77 controles. O grupo de pacientes diabéticos será composto por indivíduos acima de 18 anos, com diagnóstico de diabetes tipo 1 estabelecido segundo a Associação Americana de Diabetes atendidos no ambulatório de endocrinologia do Ipsemg e por indivíduos sem diagnósticos de diabetes que estejam colhendo sangue e/ou urina no Ipsemg. Entrarão em ambos os grupos pacientes que aceitem participar do estudo e assinem o TCLE e que não possuam os critérios de exclusão definidos no trabalho.

Os participantes serão avaliados através da coleta de dados clínicos (presencial e prontuário) e colherão amostras de sangue e urina. Após a coleta, as amostras serão preparadas, aliquotadas e congeladas. Para análise estatística, os dados coletados serão digitados no programa Excel. A análise estatística será realizada utilizando o software PRISM. As variáveis discretas e contínuas serão descritas em média (desvio padrão) ou taxa de prevalência (porcentagem); as variáveis categóricas serão descritas por taxa de prevalência. Diferenças entre variáveis discretas e contínuas serão avaliadas quanto a sua distribuição de normalidade; para variáveis com distribuição normal, as diferenças serão avaliadas através do teste T de Student; no caso de variáveis com distribuição assimétrica será executado o teste de Mann-Whitney. Para dois ou mais grupos será feito o teste de ANOVA (se distribuição normal) ou Kruskal-Wallis (se distribuição assimétrica). De acordo com o número de pacientes, será utilizado o teste do Qui-quadrado para avaliação de diferenças entre variáveis categóricas. A significância estatística será identificada quando a probabilidade (valor de P) for inferior a 0.05. O estudo visa avaliar a utilidade de marcadores moleculares para o estabelecimento de nefropatia diabética. Para tal, será utilizado o valor da albuminúria (pelo menos 2 amostras) como padrão-ouro do diagnóstico de nefropatia diabética e serão comparados a sensibilidade, especificidade e acurácia dos seguintes teste empregados: microRNA126, microRNA217 plasmáticos e urinários, cistatina C urinária, beta2 microglobulina urinária, KIM-1 urinário, NGAL urinário. Para a avaliação de capacidade diagnóstica serão utilizadas a tabelas 2x2 e através destas, serão construídas as curvas ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) onde será avaliado o melhor ponto de corte para diagnóstico para os marcadores (sozinhos ou combinados).

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo do trabalho é avaliar a acurácia do uso do microRNA-126 e microRNA-217 e do tamanho e concentração de vesículas extra-celulares como elementos de diagnóstico ou associação à doença renal do diabetes. Se propõe também a comparar e relacionar os resultados obtidos com marcadores clássicos de função e de doença renal, como albumina, creatinina e proteínas urinárias e creatinina, potássio e uréia séricas, com marcadores alternativos de função glomerular e tubular, como KIM-1, NGAL, cistatina C e beta2-microglobulinas, e com marcadores metabólicos e de estresse oxidativo, como hemoglobina glicada, perfil lipídico, TAC e TOS no soro e plasma e ácido úrico urinário.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos envolvidos são pequenos. O preenchimento do questionário poderá ser cansativo ou trazer algum desconforto psicológico. A realização da coleta de sangue poderá levar a complicações como desconforto da picada ou até formação de hematoma no local da punção.

São colocados como benefícios do trabalho o maior conhecimento sobre o tema abordado e a obtenção de informações clínicas advindas dos exames propostos (marcadores de estresse oxidativo e marcadores alternativos para doença renal do diabetes), ainda que não mudem as condutas terapêuticas guiadas pelas diretrizes nacionais e internacionais. Pelo seu caráter exploratório, não há a proposta de utilização de nenhum dos dados moleculares para qualquer tipo de orientação de conduta.

Considero que os benefícios descritos superam os riscos envolvidos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto tem uma proposta interessante, uma vez que aborda o diagnóstico da doença renal do diabetes. O diabetes mellitus é uma causa importante de morbidade e mortalidade na população mundial. E a doença renal do diabetes está entre as principais complicações da doença. Através de intervenções precoces como controle da glicemia, dos lipídeos e da pressão arterial e o uso de medicamentos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) ou bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA), é possível evitar, prevenir ou retardar a progressão da nefropatia diabética. Atualmente, o rastreamento do comprometimento renal no diabetes se faz através da

dosagem de microalbuminúria. Entretanto existem alguns fatores de interferência nesse diagnóstico.

O projeto propõe uma avaliação de outros métodos no diagnóstico mais precoce da doença renal do diabetes, o que pode gerar benefícios para os pacientes diabéticos.

O TCLE está bem escrito, claro, com linguagem simples e acessível aos participantes do estudo e preenche os critérios estabelecidos pela resolução CNS 466/2012.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto contém os nomes e documentos dos pesquisadores, resumo e descrição detalhada do trabalho, objetivos e metodologia, riscos e benefícios, metodologia de análise estatística, cronograma e orçamento da pesquisa.

O TCLE está bem escrito, claro, com linguagem simples e acessível aos participantes do estudo e preenche os critérios estabelecidos pela resolução CNS 466/2012.

**Recomendações:**

Sem recomendações adicionais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado do ponto de vista do Comitê de Ética em Pesquisa do Ipsemg.

**Considerações Finais a critério do CEP:****Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1589309.pdf	09/07/2020 16:15:48		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	09/07/2020 16:15:08	SARA DE CASTRO OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	09/07/2020 16:13:13	SARA DE CASTRO OLIVEIRA	Aceito

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	briorepositorio.pdf	09/07/2020 16:12:31	SARA DE CASTRO OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	09/07/2020 16:11:50	SARA DE CASTRO OLIVEIRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 24 de Agosto de 2020

---

Assinado por:  
**ADIRSON MONTEIRO DE CASTRO**  
(Coordenador(a))

## Anexo 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Marcadores Moleculares e de Estresse Oxidativo na Doença Renal do Diabetes

**Pesquisador:** FABIO VASCONCELLOS COMIM

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 55001621.3.0000.5149

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da UFMG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Apresentação do Projeto:**

Segue a apresentação do projeto:

"A doença renal do diabetes (DRD) é uma das causas mais importantes de morbimortalidade precoce na população adulta. Acomete cerca de 20% dos pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) até 33% dos pacientes com diabetes do tipo 1 (DM1). Por ser um distúrbio prevalente e assintomático até suas fases mais avançadas, e que pode ser evitada ou ter o seu curso abrandado através de prevenção primária e secundária, existe uma grande necessidade de que o rastreamento seja o mais precoce possível. Atualmente, o diagnóstico de DRD é baseado na excreção aumentada de albumina na urina. Embora amplamente validada, ela possui algumas limitações pois detecta a alteração em um momento que o néfron já possui algum tipo de lesão iniciada. Além disto, o uso de microalbuminúria é prejudicado pela presença de fatores confundidores (hematúria/leucocitúria). Outra limitação é a existência de casos que evoluem para doença renal crônica no diabetes a despeito de não apresentarem alteração urinária inicial. Neste sentido, vem sendo realizado um esforço na busca de marcadores alternativos e mais precoces de DRD. A proposta do presente estudo é a de explorar o uso de marcadores no sangue e urina de pacientes com DM, buscando associá-los ao diagnóstico da DRD. Para reduzir a heterogeneidade neste estudo serão convidados a participar da avaliação pacientes com diagnóstico de DM1 comparados a indivíduos sem DM e controles sem diabetes que estejam em acompanhamento ambulatorial. Após assinatura do TCLE, deverão realizar a coleta de dados clínicos e de amostras

de sangue e urina. Serão avaliados na urina e sangue a presença de Micro-RNAs específicos em exossomas (especialmente miRNA-126 e miRNA-217), além de marcadores de estresse oxidativo, marcadores de doença renal do diabetes tubulares (NGAL, KIM-1) e glomerulares (cistatina C e b-2 microglobulina), que serão executados em laboratório parceiro na UFMG. A possibilidade de obtenção de um método mais acurado e de boa reprodutibilidade e que possa servir como um marcador antes do desenvolvimento de albuminúria certamente servirá como um novo auxílio para a prática clínica e para a pesquisa."

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos elencados no estudo são os seguintes:

"Objetivo Primário:

GERAL - avaliar a acurácia do uso de micro-RNAs e de marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo como elemento de diagnóstico ou de associação a doença renal do diabetes (DRD).

Objetivo Secundário:

ESPECÍFICOS – comparar e relacionar os resultados obtidos com outras variáveis de interesse:

1) Marcadores padrão de função glomerular e tubular

- Aferição de albumina, creatinina sérica e da razão albumina/creatinina urinárias

2) Marcadores alternativos de função glomerular e tubular

- 1) NGAL, KIM-1, Cistatina C e Beta-2 Microglobulina

3) Marcadores metabólicos e de estresse oxidativo

- Hemoglobina glicada, glicemia de jejum, perfil lipídico sérico
- ácido úrico sérico e urinário
- Capacidade anti-oxidante total (TAC), Capacidade oxidante total (TOS) no soro e plasma."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Abaixo os riscos e benefícios listados pelos pesquisadores:

"Riscos:

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem: "1) no preenchimento deste questionário e coleta de dados, que pode consumir tempo, mas não costuma ser considerado como um risco de ordem física ou psicológica; 2) na realização de coleta de sangue considerado um exame mais invasivo e que costuma produzir desconforto pela picada produzida pela agulha havendo uma chance de complicações como hematoma; 3) coleta de urina que pode ser incomoda por ser feita dentro do hospital em recipiente pequeno.

Benefícios:

Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, com potencial benefício para o

grupo de pacientes com diabetes mellitus e indivíduos controles que porventura não saibam do diagnóstico (acredita-se que 50% dos pacientes com DM não são diagnosticados precocemente, evoluindo com complicações) . Todos os resultados dos exames e avaliação serão comentados com os participantes (pessoalmente ou por meio digital como email/ Whatsapp). Se houver alguma alteração clínica, ofereceremos a oportunidade de encaminhamento pela rede publica."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo que pretende explorar o uso de marcadores no sangue e urina de pacientes com DM, buscando associá-los ao diagnóstico da DRD. Para reduzir a heterogeneidade neste estudo serão convidados a participar da avaliação pacientes com diagnóstico de DM1 (n=77) e também de pacientes com DM2 (n=77) com e sem DRD que serão comparados conforme a presença e a progressão da DRD e também a pareados a indivíduos controles sem diabetes mellitus (n=120) e indivíduos controle em terapia de substituição renal, também sem diabetes mellitus (n=22) e que estejam em acompanhamento ambulatorial. Após assinatura do TCLE, deverão realizar a coleta de dados clínicos e de amostras de sangue e urina. Serão avaliados na urina e sangue a presença de Micro-RNAs específicos (especialmente miRNA-126, miRNA-217, miRNA -192, miRNA -29a), além de marcadores tubulares (NGAL, KIM-1) e glomerulares (cistatina C e b-2 microglobulina) de doença renal do diabetes, e marcadores de estresse oxidativo, que serão executados em laboratório parceiro na UFMG.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A análise e parecer do projeto foi elaborada a partir dos seguintes documentos apresentados pelos pesquisadores:

- Folha de rosto;
- TCUD;
- Carta de anuência do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HCUFMG;
- Parecer e aprovação do Dpto de Clínica Médica da FMUFMG;
- Termo de biorrepositório;
- TCLE - ajustado, conforme solicitação em diligência;
- TCLE para biorrepositório;
- Projeto brochura completo;
- Projeto na PB;
- Carta ao CEP, informando o atendimento aos pedidos na diligência;
- Carta de anuência do GEP do HCUFMG.



**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pelo atendimento integral das diligências, somos S.M.J., favoráveis à aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1735091.pdf	16/05/2022 00:08:37		Aceito
Outros	rtaCOEP1505.pdf	16/05/2022 00:08:13	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Outros	TCLEmirDMUFMGmV3.pdf	15/05/2022 23:47:04	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBIORV.pdf	15/05/2022 23:43:17	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Outros	GEP.pdf	15/05/2022 22:43:12	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Outros	TCUDDM.pdf	05/01/2022 11:53:20	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Outros	aprovdeptounidadefuncionalegep.pdf	16/12/2021 23:07:57	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Folha de Rosto	dmfolharosto.pdf	29/10/2021 20:11:44	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Declaração de concordância	anuenciaendomirDM.pdf	23/05/2021 13:28:25	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Declaração de	tbiorepmirDM.pdf	23/05/2021	FABIO	Aceito

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	tbiorepmirDM.pdf	12:52:52	VASCONCELLOS COMIM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomirDMUFMG.pdf	23/05/2021 12:45:43	FABIO VASCONCELLOS COMIM	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 31 de Agosto de 2022

---

**Assinado por:**  
**Crissia Carem Paiva Fontainha**  
**(Coordenador(a))**