

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

**INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E LESÃO ENDOTELIAL: RELAÇÃO
COM O GRAU DE NEFROPATIA DIABÉTICA**

BELO HORIZONTE - MG

2016

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

**INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E LESÃO ENDOTELIAL: RELAÇÃO
COM O GRAU DE NEFROPATIA DIABÉTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Análises Clínicas e Toxicológicas, da
Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito para obtenção do título
de mestre em Análises Clínicas e
Toxicológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Braga
Gomes Borges

BELO HORIZONTE - MG

2016



FOLHA DE APROVAÇÃO

INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E LESÃO ENDOTELIAL: RELAÇÃO COM O GRAU DE NEFROPATIA DIABÉTICA

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 23 de março de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Kárina Braga Gomes Borges - Orientador
UFMG

Prof(a). TANIA MARA PINTO DABES GUIMARÃES
FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG

Prof(a). Lara Carvalho Godoi
UFMG

Belo Horizonte, 23 de março de 2016.

À mais bela pessoa deste mundo, Luiz Carlos Cardoso (*in memoriam*), o carinho em
forma de homem.

“Nunca deixe que lhe digam
Que não vale a pena acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém”

*“E non lasciare andare un giorno per ritrovar te stesso
Figlio di un cielo così bello perché la vita è adesso”*

Renato Russo

Ainda que eu falasse a língua dos homens.

E falasse a língua dos anjos.

Sem amor, eu nada seria.”

1 Coríntios, 13:1

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus Pai, Filho e Espírito Santo.

Aos meus familiares, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus amigos, pelos ombros, pelos risos, pelos choros, especialmente Mariana F. Meireles.

À minha orientadora, Karina Braga, pelo acolhimento, carinho e apoio.

À Caroline P. Domingueti, pela oportunidade de dar continuidade a este belo trabalho.

Às todas que contribuíram e ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial à Cláudia Ferreira, Rita Duarte, Ana Maria Rodrigues e Laís B. Martins.

Aos participantes deste estudo. Que doaram um pouco de seu tempo e se dispuseram a contribuir.

À todos da Faculdade de Farmácia, pela acolhida. Principalmente aos colegas do Laboratório de Bioquímica.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade e pelas tantas portas abertas.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro em várias oportunidades.

RESUMO

A inflamação crônica e subclínica desempenha um papel chave na patogênese e progressão da nefropatia diabética. Desta forma, objetivamos neste trabalho investigar a possível relação entre a presença e o grau de albuminúria com marcadores de inflamação, lesão endotelial e estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1). O estudo incluiu 35 indivíduos saudáveis, 93 com normo e microalbuminúria (<300 mg de albumina / g de creatinina) e 32 com macroalbuminúria (≥ 300 mg de albumina / g de creatinina). A excreção urinária de albumina (EUA) foi calculada em amostras da primeira urina da manhã. Os níveis plasmáticos e urinários das citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) e trombosmodulina foram determinados por ELISA. O estado oxidativo foi avaliado utilizando os ensaios de TBARS e MTT. Os pacientes diabéticos com normo e microalbuminúria apresentaram níveis urinários significativamente mais elevados de TNF- α e IL-10 quando comparado aos outros grupos. Níveis urinários e plasmáticos de TNF- α foram positivamente correlacionados com os níveis plasmáticos de cistatina-C, creatinina, uréia e albuminúria, enquanto foram negativamente correlacionados com a taxa de filtração glomerular estimada (TFG). Níveis urinários de IL-10 mostraram correlação positiva com glicemia de jejum, Hb1Ac, trombosmodulina e TBARS, enquanto os níveis de IL-6 no plasma foram positivamente correlacionados com a HbA1c e albuminúria. Os pacientes diabéticos foram caracterizados por níveis elevados de citocinas urinárias (TNF- α , IL-6 e IL-10). No entanto, o TNF- α urinário, foi o único marcador associado independentemente com a presença da macroalbuminúria, após uma análise de regressão logística. Em conclusão, este achado sugere que a medição dos níveis de TNF- α urinário pode ser útil para avaliação da progressão da nefropatia em pacientes com DM1.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 1; albuminúria; marcadores de inflamação; citocinas plasmáticas e urinárias; estresse oxidativo; dano endotelial

ABSTRACT

The chronic and subclinical inflammation plays a key role in the pathogenesis and progression of diabetic nephropathy. The aim of the present study was to investigate possible relation between the presence and degree of albuminuria and markers of inflammation, endothelial damage and oxidative stress in patients with type 1 diabetes mellitus (DM1). The sample was composed by 35 healthy individuals, 93 with normo and microalbuminuria (< 300 mg of albumin/g of creatinine) and 32 with macroalbuminuria (\geq 300 mg of albumin/g of creatinine). Urinary albumin excretion (UAE) was calculated in first-morning urine samples. Plasma and urinary cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) and thrombomodulin levels were determined by ELISA. Oxidative status was evaluated using the TBARS and MTT assays. Diabetic patients with macroalbuminuria presented significantly higher TNF- α and IL-10 urinary levels when compared to other groups. Urinary and plasmatic levels of TNF- α was positively correlated to plasma levels of cystatin C, creatinine, urea and albuminuria, whilst was negatively correlated with estimated glomerular filtration rate (eGFR). Urinary IL-10 levels proved positive correlation with fasting glucose, Hb1Ac, thrombomodulin and TBARS, while IL-6 plasma levels were positively correlated with HbA1c and albuminuria. Diabetic patients were characterized by elevated levels of urinary cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10). However, only urinary TNF- α levels were independently associated with the presence of macroalbuminuria, after logistic regression analysis. In conclusion, this finding suggests that measurement of urinary TNF- α levels may be helpful to evaluate progression to nephropaty in DM1 patients.

Keywords: Diabetes Mellitus, type 1; albuminuria; inflammation markers; urinary and plasma cytokines; stress oxidative; endothelial damage.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGE's: Produtos Finais de Glicação Avançada (*Advanced Glycation End-Products*)

Cys-C: cistatina C

DM: diabetes mellitus

DM1: diabetes mellitus tipo 1

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DMG: diabetes mellitus gestacional

DRC: doença renal crônica

EGF: fator de crescimento epidérmico

ELISA: Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EMT: transição epitélio-mesangial

EUA: excreção urinária de albumina

GAD-65: antidescarboxilase do ácido glutâmico

GADPH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDF-15: fator de crescimento e diferenciação-15

GSH: glutationa, forma reduzida

Hb1Ac: hemoglobina glicada

HLA: antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*)

IA2; IA2B: anti-tirosina fosfatase

ICAM-1: molécula de Adesão Intercelular-1

IFN- γ : interferon-gama

IL-1: interleucina 1

IL-10: interleucina 10

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1 β

IL-6/mRNA: RNA-mensageiro de IL-6

IL-6: interleucina 6

IL-6R: receptor de IL-6

IL-8: interleucina 8

IP-10: proteína induzida por IFN- γ

I κ B(β): inibidor de do fator de transcrição NF- κ B

KDIGO: *Kidney disease; improving global outcomes*

MCP-1/CCL2: proteína quimioatrativa de monócitos

MIC-1: citocina inibitória de macrófagos

MIP-1d: delta-proteína inflamatória de macrófagos

mRNA: RNA (ácido ribonucléico) mensageiro

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NaCl: Cloreto de Sódio

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida, reduzido

ND: nefropatia diabética

NF- κ B: Fator de Transcrição Nuclear kappa B

nOS: sintase do Óxido Nítrico

PARP: poli ADP-ribose polimerase

PCR: proteína C reativa

PCR-us: proteína C reativa ultra-sensível

PKC: proteína quinase-C

RAC: relação albumina/creatinina urinária

RFG: ritmo de filtração glomerular

RNS: espécies reativas de nitrogênio

ROS: espécies reativas de oxigênio

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes

SOD: superóxido dismutase

T1DGC: *International Type 1 Diabetes Genetics Consortium* (consórcio internacional para temas genético relacionados ao diabetes tipo 1)

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TFG: taxa de filtração glomerular

TGF- β : fator de crescimento transformante- β 1

Th17: células T com fenótipo pró-inflamatório

TM: trombosmodulina

TNFR: receptores de TNF- α

TNF- α : fator (α) de necrose tumoral

Treg: células T reguladoras

VCAM-1: molécula de adesão celular-vascular-1

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

vWF: Fator de *Von Willebrand*

WHO/OMS: *World health organization* (Organização Mundial de Saúde)

Znt: antitransportador de zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução do Diabetes no Mundo (2000 – 2030).	18
Figura 2: Vias inflamatórias envolvidas na patogênese da ND	23
Figura 3: IL-10: Fluxograma da progressão da falência renal	29
Figura 4: Dano celular induzido pela hiperglicemia.....	33

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Diabetes mellitus tipo 1	16
2.2	Nefropatia diabética	18
2.3	Inflamação associada à nefropatia diabética	21
2.3.1	Citocinas inflamatórias	24
2.3.1.1	TNF- α	25
2.3.1.2	IL-6.....	27
2.3.1.3	IL-10.....	28
2.4	Lesão endotelial no diabetes e trombomodulina	30
2.5	Estresse oxidativo	31
2.5.1	MTT	33
2.5.2	TBARS.....	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	CAPÍTULO 1: Artigo submetido	36
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
6	PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A – Comprovante de submissão de artigo em periódico.....	74
	APÊNDICE B – Parecer comitê de ética da UFMG	75
	APÊNDICE C – Parecer comitê de ética da Santa Casa de Belo Horizonte	76
	APÊNDICE D – Comprovações de participação em evento científico	77
	APÊNDICE E – Termo de consentimento livre e esclarecido	80
	APÊNDICE F – Ficha clínica	83

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é causado por uma destruição imuno-associada, senão diretamente imuno-mediada, de células β pancreáticas produtoras de insulina. Historicamente, o DM1 foi amplamente considerado um distúrbio em crianças e adolescentes, mas esta opinião mudou ao longo da última década, sendo que a idade de início sintomático não é mais um fator restritivo [1].

Uma significativa parcela dos pacientes com DM1 desenvolve complicações graves a longo prazo, tais como doenças renais e cardiovasculares, que não são apenas responsáveis pela morbidade e mortalidade precoce, mas são também fatores de elevado custo na saúde pública e privada relacionado com o DM1. Após 20 anos de desenvolvimento do DM1, a retinopatia e a neuropatia diabéticas estão presentes na maioria dos pacientes, já a nefropatia aparece em cerca de 30 a 40% dos casos após esse período de tempo [2; 3].

A Doença Renal do Diabetes¹, ou nefropatia diabética (ND) (termo tradicionalmente adotado) é uma doença progressiva e irreversível, caracterizada pelo aumento da pressão sanguínea, microalbuminúria, proteinúria e declínio contínuo do Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) [4]. É responsável por mais de 40% dos casos novos, por ano, de Doença Renal em estágio terminal, e é considerada a principal causa de Doença Renal Crônica (DRC) nos Estados Unidos, Europa e Japão [5]. Estudos demonstraram que a prevalência de DRC em pacientes portadores de DM pode variar de 5% a 40% dependendo do tempo de acometimento pelo diabetes [6].

A ND é ainda a principal causa de insuficiência renal em pacientes que ingressam em programas de diálise. Além disso, a mortalidade dos pacientes diabéticos em programas de hemodiálise é maior do que a dos não diabéticos [7]. Essa complicação tradicionalmente é resultante da interação entre fatores hemodinâmicos e inflamatórios, o que sugere que a extensão de lesão renal em diabéticos não é totalmente explicada pelo aumento da pressão sistêmica e glomerular, ou pela modificação de moléculas em condições hiperglicêmicas [8; 9].

¹*Doença renal do diabetes* é o termo atualmente dado à complicação crônica do DM, tradicionalmente referida como *Nefropatia Diabética*. Dessa forma, no decorrer da

dissertação, adotaremos o termo tradicional, adotado na maioria das referências utilizadas.

As evidências indicam que a patogênese da ND é multifatorial, ou seja, tanto fatores genéticos quanto ambientais são responsáveis por desencadear uma complexa série de eventos fisiopatológicos [10]. Dentre estes fatores, está a produção aumentada de substâncias oxidantes, uma vez que a hiperglicemia é a condição mínima para o desenvolvimento da ND e está associada à produção de radicais livres resultantes do estresse oxidativo [11]. Crescentes evidências indicam ainda que o estresse oxidativo desempenha um papel central no desenvolvimento de outras complicações micro e macrovasculares [12]. Além disso, sabe-se hoje que a inflamação desempenha um papel central na gênese das complicações do diabetes, em especial da ND, e como esta inflamação interage com o estresse oxidativo, levando à lesão endotelial, permanece sob investigação [13].

Tendo em vista a prevalência significativa, o alto custo do tratamento e manejo do DM1 e de suas complicações, é de interesse a pesquisa dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa morbidade.

Desta forma, o presente trabalho objetiva avaliar a interação entre os níveis de citocinas envolvidas no processo inflamatório, o estresse oxidativo e a lesão endotelial em pacientes com DM1 em diferentes graus de nefropatia a fim de melhor conhecer os mecanismos fisiopatológicos da doença e possibilitar ações futuras que visem o melhor controle e manejo da DM1 e de suas complicações.

2 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus tipo 1

O Diabetes pode ser classificado, de acordo com a *American Diabetes Association* (2015) [14], como:

1 – Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): resultante da destruição das células beta pancreáticas, com consequente deficiência de insulina;

2 – Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): resultado de uma deficiência progressiva na secreção e/ou ação da insulina;

3 – Diabetes mellitus gestacional (DMG): diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação, não sendo diagnosticado DM1 ou DM2 anterior à gestação;

4 – Tipos específicos de diabetes, por causas diversas: síndromes diabéticas monogênicas, doenças do pâncreas exócrino (exemplo: fibrose cística), diabetes induzida por drogas ou outros agentes químicos, entre outros.

Atualmente, a presença de um dos seguinte critérios propostos pela *American Diabetes Association* [14] e aceitos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) [15] para o diagnóstico do diabetes são:

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual acima ou igual 200 mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições;
- Glicemia em jejum igual ou superior a 126 mg/dL;
- Glicemia de duas horas após sobrecarga de 75g de glicose acima ou igual a 200 mg/dL;
- Hemoglobina glicada (Hb1Ac) \geq 6,5%.

O DM1, forma presente em 5% a 10% dos casos de diabetes, está associado à destruição de células beta por autoimunidade, porém existem casos em que não

há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM1. Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD-65), antitirosina-fosfatase (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Znt). O DM1 normalmente inicia-se na infância e, após cinco a quinze anos do diagnóstico, as complicações podem estar presentes, sobretudo a ND. Um grande número de fatores está implicado no desenvolvimento das alterações renais, tais como o controle glicêmico, inúmeros mediadores humorais, o perfil genético e a liberação de fatores de crescimento [15; 16].

O DM1 surge através de uma interação entre a predisposição genética e fatores ambientais. A região do HLA (antígeno leucocitário humano) no cromossomo 6p21.3 é o mais forte determinante genético, representando cerca de 50% do risco genético. Além desta, o estudo *SDP-funded international Type 1 Diabetes Genetics Consortium (T1DGC)* também identificou mais de 50 regiões cromossômicas adicionais que conferem risco de baixo a moderado no desenvolvimento do DM1 [17].

A incidência de DM1 apresenta um aumento anual global estimado em cerca de 3%, e apesar deste aumento atingir a maioria dos países, existe uma diferença geográfica importante nesta ocorrência [1]. Além disso, diversos estudos recentes apontam para uma tendência mundial ao aumento da incidência do DM1 em menores de 5 anos de idade, com maior destaque nos países nórdicos [18]. Em 2030, a estimativa global (**Figura 1**) deverá aumentar para mais de 552 milhões (9,9% da população adulta). De acordo com a SBD [15], a DM1 possui incidência aproximada de 0,5 casos novos para cada 100.000 habitantes ao ano no nosso país e acomete principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens, sendo mais prevalente entre adolescentes.

A polidipsia, polifagia, e poliúria (o trio clássico dos sintomas associados com o início da doença), juntamente com hiperglicemia evidente, são sinais clínicos de diagnóstico em crianças e adolescentes, e em menor grau em adultos. Uma necessidade imediata de reposição de insulina exógena também é uma característica da doença [1].

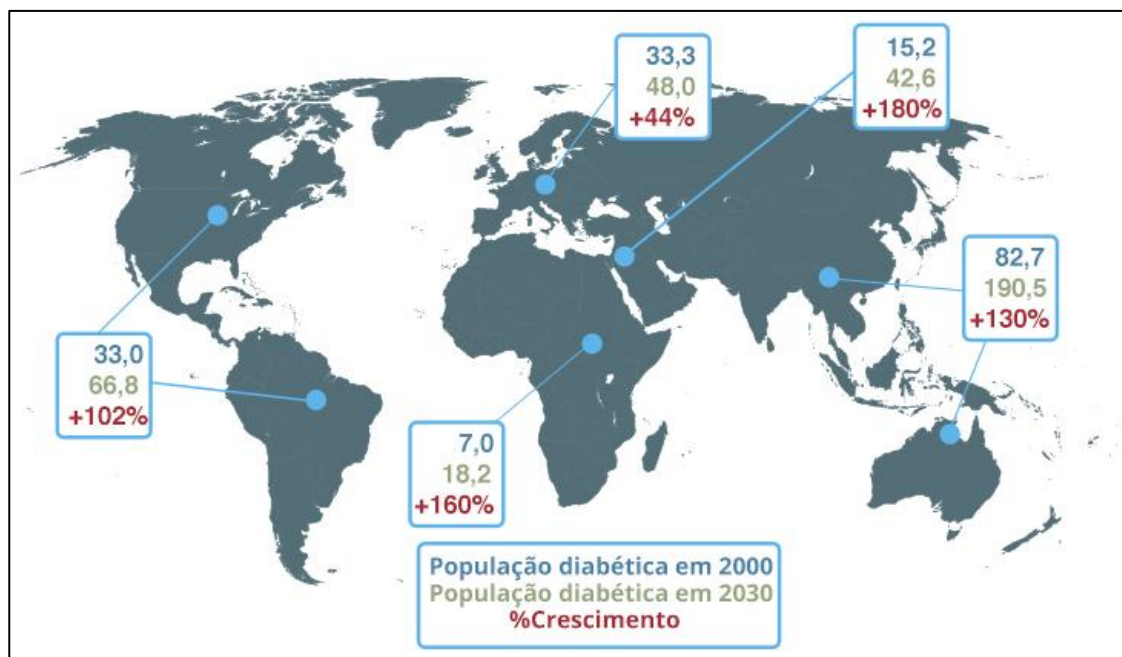


Figura 1. Evolução do Diabetes no Mundo (2000 - 2030). Adaptado de WHO, 2010 [15; 19].

2.2 Nefropatia diabética

O padrão ouro para o diagnóstico da ND é uma biópsia que mostra as características típicas de espessamento da membrana basal glomerular, a expansão mesangial e lesões *Kimmelstiel-Wilson*. No entanto, a maioria das pessoas com ND não realizam a biópsia renal, sendo que o diagnóstico baseia-se nos achados clínico-laboratoriais [20].

Numa revisão sistemática, realizada por Siviero *et al.*, aponta que no Brasil, o DM é a segunda doença de base que leva à DRC e que esse resultado difere de estudos realizados em outros países da América, nos quais a doença foi apontada como o principal diagnóstico de base. Apontam ainda para o fato de que a menor proporção de ND observada no Brasil pode ser resultado das dificuldades de se estabelecer o diagnóstico preciso do diabetes no país. Ademais, embora a prevalência de diabéticos em diálise venha aumentando nos últimos anos no Brasil, muitos dos pacientes diabéticos morrem por outras causas, antes de atingir a DRC [21].

As alterações na estrutura renal causadas pelo DM são específicas (espessamento da membrana basal, expansão mesangial e lesões de *Kimmelstiel-*

Wilson), criando um padrão que não é visto em outras doenças renais. A gravidade das lesões parece estar relacionada à duração do DM, ao grau de controle metabólico e a fatores genéticos. Essas alterações estruturais progressivas levam aos distúrbios funcionais da ND [22].

Em indivíduos com DM1, a doença renal se desenvolve mesmo quando o nível de creatinina sérica ainda está dentro dos valores de referência. No entanto, clinicamente, a doença só se torna evidente pela presença de proteinúria significativa. Nas últimas décadas, a forma mais comum de se avaliar a proteína urinária foi por meio da utilização de tiras reagentes de urina. Entretanto, tais métodos convencionais não são sensíveis, uma vez que mostram-se positivos apenas quando a concentração de albumina na urina for superior a 200 mg/L (equivalente a cerca de 300 mg/dia) [23].

A caracterização clássica da ND é o aumento lento e progressivo da EUA (excreção urinária de albumina), que somente pode ser detectada precocemente com ensaios de alta sensibilidade. A microalbuminúria, ou albuminúria A₂ (designação atual pelas Diretrizes da *National Kidney Foundation* – 2013), é o termo utilizado para descrever o aumento da excreção urinária de albumina acima da faixa de referência, porém, não detectada por métodos convencionais (tiras reagentes e método de vermelho de pirogalol). A albuminúria A₂ aparece 5 a 10 anos após o diagnóstico do DM e sua progressão para a albuminúria A₃ (ou proteinúria ou macroalbuminúria), ocorre de 10 a 15 anos, caso não haja correto manejo e tratamento [24; 25].

Clinicamente, a ND é caracterizada por hipertensão, albuminúria progressiva, diminuição do RFG, e um alto risco de morbidade e mortalidade cardiovascular [26]. Pacientes com DM e proteinúria apresentam risco relativo de morte prematura até 100 vezes superior à população não diabética. No entanto, pacientes diabéticos sem nefropatia apresentam taxa de mortalidade apenas duas vezes superior àquela observada em indivíduos não diabéticos [27]. As fases de progressão da ND encontram-se resumidas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Progressão da nefropatia diabética

Fase	Albumina urinária		RFG (mL/min/1,73m ²)	Pressão sanguínea
	EUA (mg/24h)	RAC (mg/g)		
Normoalbuminúria Albuminúria A ₁	< 30	< 30	Normal ou elevado	Aumento
Microalbuminúria Albuminúria A ₂	30 – 299	30 – 299	Normal ou elevado	Aumento crescente
Macroalbuminúria Proteinúria clínica Albuminúria A ₃	≥ 300	≥ 300	Decréscimo	Elevada
Falência renal	≥ 300	≥ 300	Reduzido	Elevada

EUA: excreção urinária de albumina; RAC: relação albumina/creatinina urinária; RFG: ritmo de filtração glomerular. KDIGO, 2013.[24]; Marshall, S. M, 2014 [25].

O risco de desenvolvimento dessa complicação em um paciente normoalbuminúrico com duração de DM1 superior a 30 anos é baixo, o que indica que a exposição ao DM não é suficiente para explicar o desenvolvimento da nefropatia e sugere que as complicações renais ocorrem em indivíduos susceptíveis, muito provavelmente por influência de fatores genéticos [28].

A hipertrofia renal e elevação do RFG são achados característicos iniciais no diabetes precoce e mal controlado, e podem constituir fatores de risco parciais para o desenvolvimento da ND. Uma elevação na reabsorção tubular parece causar a hiperfiltração glomerular inicial, o que em parte é resultado do aporte de NaCl à mácula densa do túbulo distal pela atividade de retroalimentação. A ativação do sistema renina-angiotensina, proteína quinase-C (PKC), TGF- β (fator de crescimento transformante- β 1), ornitina-descarboxilase e a interação entre a reabsorção proximal com o RFG desempenham papéis importantes nas alterações renais precoces presentes na ND [29].

2.3 Inflamação associada à nefropatia diabética

Dados recentes demonstram que há um aumento na infiltração de macrófagos e excesso de produção de moléculas de adesão de leucócitos em rins de indivíduos diabéticos e em modelos animais experimentais de diabetes. Como resultado, sugere-se que a inflamação desempenha um papel chave na patogênese da ND. Além disso, citocinas pró-inflamatórias estão fortemente associadas com o risco de desenvolvimento desta complicação diabética [30; 31]. Um apoio adicional para a contribuição da inflamação no diabetes vem de estudos onde estratégias de uso de imunossupressores reduzem o acúmulo de macrófagos e atenuam o desenvolvimento da ND. No entanto, os fatores que promovem a inflamação renal e a perda das vias de proteção na fase pré-clínica da ND são poucos compreendidos, mas pode-se justificar por meio das forças de cisalhamento e estresse endotelial relacionados com a hiperfiltração glomerular [32; 33].

O fato do desenvolvimento da ND ser reversível após transplantes pancreáticos bem sucedidos (com conseqüente normoglicemia) em pacientes com DM1 implica que a hiperglicemia seja um fator crucial para o desenvolvimento da ND [36]. A hiperglicemia está associada com um aumento na proliferação celular mesangial e a hipertrofia, bem como o aumento da produção de matriz e espessamento da membrana basal. A hiperglicemia pode também regular positivamente a expressão de VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) em podócitos, resultando em um aumento da permeabilidade vascular. Em modelos experimentais, a inflamação na ND é em parte um resultado da ativação neuro-hormonal induzida pela hiperglicemia, que resulta em um aumento da pressão intraglomerular, que conduz à inflamação renal. Em estudos *in vitro* de células mesangiais humanas, a hiperglicemia aumenta a expressão do mRNA (ácido ribonucleico, tipo mensageiro) da proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1, também conhecido como CCL2) e VEGF, os quais têm sido associados à apoptose celular, hipertrofia compensatória e hiperfiltração em modelos animais de diabetes mellitus [34; 35; 36].

Em um estudo de coorte conduzido por Roy *et al* (2015) [38], que acompanhou um total de 725 indivíduos afro-americanos com DM1 (*New Jersey study*, 1993 – 1998), após modelos de regressão logística, foi observado que os

marcadores inflamatórios TNF- α , IL-8 e MCP-1 participam de uma via comum que evolui à falência renal dos indivíduos estudados (RFG < 60 mL/min/1,73 m²), e que as moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) podem estar relacionadas à uma segunda via para o mesmo desfecho.

A contribuição do processo inflamatório na progressão da lesão renal em pacientes com DM1 foi investigada em outro estudo conduzido na *Joslin Diabetes Center*. Foram analisados cinco marcadores inflamatórios: IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 (proteína induzida por IFN- γ) e MIP-1d (delta-proteína inflamatória de macrófagos), em amostras de urina coletadas de pacientes com DM1. As concentrações urinárias de linha de base de tais marcadores foram consideradas significativamente elevadas naqueles indivíduos com perda gradual da função renal (0,3 mL/min/1,73 m² por ano), quando comparados com aqueles que tinham função renal mais estável, sugerindo que aqueles indivíduos diabéticos com no mínimo dois marcadores em níveis elevados possuem uma probabilidade cinco vezes superior de um declínio da função renal mais precoce e gradual, após análise multivariada [39].

A progressão da ND pode também ser promovida pela perda dos fatores de proteção em relação aos mediadores inflamatórios. Ou seja, há um desequilíbrio entre os fatores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios na progressão da ND [40].

As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos diabéticos expressam maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias e aumentam a transcrição de genes pró-inflamatórios regulados pelo fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), mediado pelo seu principal componente protéico, a p65 intracelular. É ainda observado que essas células expressam quantidades diminuídas do inibidor κ B (I κ B) β , que é o principal inibidor de NF- κ B. A supressão da ativação de NF- κ B por vários agentes, tais como tiazolidinodionas, 1,25-di-hidroxitamina D, o cilostazol e curcumina, pode conduzir à melhoria da ND, sugerindo a importância do NF- κ B como um alvo terapêutico da ND [41].

O número de imuno-mediadores anti-inflamatórios que foram investigados no DM é consideravelmente menor do que o número de fatores pró-inflamatórios. Alguns dos imuno-mediadores anti-inflamatórios têm sua importância destacadas, como a adiponectina (hormônio derivado do tecido adiposo), o antagonista do

receptor de IL-1 β (IL-1ra) e moléculas da super-família TGF- β , como o TGF- β 1 e o fator de crescimento e diferenciação-15 (GDF-15) também conhecido como citocina inibitória de macrófagos (MIC-1). Um dos principais imuno-mediadores com ação anti-inflamatória envolvida no DM é a IL-10. Em conjunto, o TGF- β 1 e a IL-10 participam no estabelecimento de tolerância imunológica, limitando e eventualmente finalizando as respostas inflamatórias. A IL-10 possui ainda ação protetora contra respostas imuno-mediadas por linfócitos T [42].

As vias inflamatórias envolvidas na patogênese da ND podem ser vistas na **Figura 2**

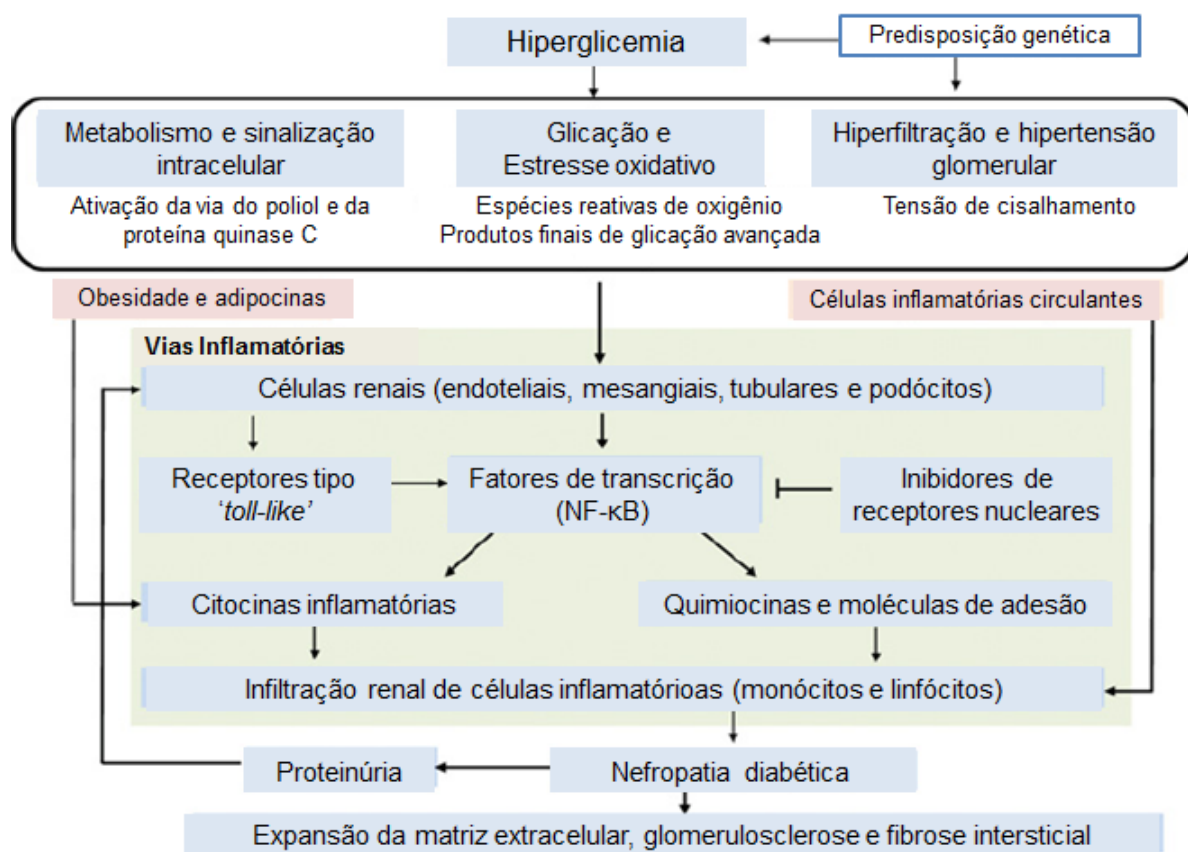


Figura 2. Vias inflamatórias envolvidas na patogênese da ND. Adaptado de Wada, J.; Makino, H. 2013 [43].

2.3.1 Citocinas inflamatórias

Algumas citocinas são produzidas por diversas células em resposta ao estímulo inflamatório e recrutamento dos leucócitos para locais de inflamação, outras são geradas constitutivamente em vários tecidos e recrutam leucócitos (maioritariamente linfócitos) para esses tecidos na ausência de inflamação. É, então, possível fazer uma distinção entre as citocinas cuja expressão está relacionada à função homeostásica e aquelas de função reguladora na inflamação [44].

Um grande conjunto de evidências sugere que a patogênese do DM está relacionada com a presença de um estado inflamatório de baixo grau e com a ativação do sistema imune inato. Além disso, as citocinas inflamatórias são referidas por diversos estudos estando envolvidas no desenvolvimento de complicações diabéticas microvasculares, incluindo a ND [45]. Quando avaliada concomitante com outros marcadores de função renal, a excreção urinária de citocinas pode apresentar-se relevante para descrever a inflamação intrarrenal na ND [43].

As células T em pacientes com DM têm naturalmente seu padrão desviado a um padrão fenotípico pró-inflamatório (Th17), com uma produção proeminente de citocinas. Entretanto, as células T reguladoras (Treg) possuem um perfil de proteção contra a inflamação, reduzindo assim a resistência insulínica. Tal fato pode ser constatado por Abouzeid & Sherif (2015) [46], que observando o aumento dos níveis de células Th17 e a supressão das células Treg, detectaram um aumento da proteinúria e redução do RFG em pacientes com DM, sugerindo assim, que o balanço entre os dois fenótipos celulares pode vir a ser útil no rastreamento da complicação renal desses pacientes [46].

Um dos mecanismos pelos quais as citocinas são capazes de promover um processo inflamatório é por promover a infiltração e adesão de leucócitos nos glomérulos e túbulos renais, juntamente com um significativo aumento da infiltração de macrófagos [47].

O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) na ND foi associado com a extensão da lesão renal, avaliada pelo aumento da EUA, e uma redução da excreção urinária de citocinas resultou em diminuição nos níveis de

albuminúria. No entanto, a elevação de citocinas pró-inflamatórias no sangue pode ser resultante do estresse oxidativo induzido pelo estado hiperglicêmico [31].

2.3.1.1 TNF- α

O TNF- α é um agente central do sistema imunológico, formado por 157 aminoácidos e com um peso molecular de 17kD. O TNF- α é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos e monócitos, também por linfócitos T e B [48] e ainda por células renais ativadas (glomerulares, endoteliais e tubulares) [31].

Vias da resposta inflamatória e do estresse oxidativo são ativadas logo que o TNF- α se liga aos seus receptores (TNFR) [49]. Após esta ligação, pode haver a liberação deste complexo solúvel na circulação plasmática. O papel destes complexos solúveis ainda não é totalmente esclarecido, uma vez que existem evidências de que possam atuar como reservatórios dessa citocina, prolongando sua meia-vida, mas também podem competir com os receptores ainda ligados às células, competindo para a ligação de novas moléculas do TNF- α [50].

Uma série de estudos tem demonstrado que níveis de TNF- α estão aumentados no DM1 [51; 52; 53]. O TNF- α está envolvido no processo de autoimunidade que conduz ao dano de células β -pancreáticas e à indução de DM1. Tem sido sugerido que o TNF- α pode eventualmente ser um marcador de avaliação de controle metabólico em DM1 [54].

Quando em níveis elevados, o TNF- α induz a liberação de outros fatores, como: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas de fase aguda. Como uma citocina pleiotrópica, exerce seus efeitos múltiplos que podem contribuir para o desenvolvimento da ND através de vários mecanismos, incluindo a redução do fluxo sanguíneo glomerular e filtração glomerular e vasoconstrição induzida pelo aumento na produção de endotelina-1. O TNF- α contribui para a retenção de sódio e hipertrofia renal. O aumento na produção de TNF- α também está relacionado com a elevação do estado de estresse oxidativo local, através da ativação do NADPH em células mesangiais [30; 31].

Elmarakby & Sullivan (2012) [55] destacaram diversos estudos que corroboram com a forte correlação entre os níveis de TNF- α e a presença de ND, por meio da relação com a EUA. Além disso, os autores destacam também que o aumento nos níveis de TNF- α renal e sua excreção precedem o aumento da albuminúria no diabetes. Os níveis de TNF- α urinário estão também elevados em pacientes com DM2 e os níveis de TNF- α aumentam à medida que progride a ND, sugerindo que o aumento dos níveis de TNF- α contribuem para o desenvolvimento de lesão renal.

Em um estudo conduzido por Niewczas *et al.* (2009) [51], que incluía pacientes com DM1, sendo 363 com normoalbuminúria e 304 com microalbuminúria, foi possível constatar que elevadas concentrações séricas de TNF- α estiveram fortemente associadas com a diminuição da função renal em pacientes com DM1 e que ainda não estavam com EUA \geq 300 mg/g.

Outros estudos transversais no DM1 relataram que as concentrações séricas de marcadores relacionados ao TNF- α (citocina e seus receptores) estiveram elevados em comparação com indivíduos saudáveis e que as maiores concentrações desses marcadores foram associadas com aumento da EUA [56; 57].

O TNF- α tem sido ainda associado na patogênese da disfunção endotelial, uma vez demonstrado ser responsável pelo aumento da adesão de leucócitos ao endotélio, ativação das vias inflamatórias NF- κ B-dependentes, indução das moléculas VCAM-1 e endotelina-1, e indução, no músculo liso, da expressão de metaloproteinases da matriz, que contribuem na supressão da sintase do óxido nítrico (nOS) [41].

Finalmente, o TNF- α parece ter uma ação apoptótica direta e um efeito citotóxico tanto em células glomerulares [58] quanto em células tubulares [59]. Seu efeito apoptótico sobre as células do glomérulo pode ocasionar um distúrbio ou lesão nas junções intercelulares da barreira de filtração glomerular, que pode ter a sua permeabilidade aumentada, resultando assim no desenvolvimento de proteinúria [60].

2.3.1.2 IL-6

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina imunorreguladora, uma glicoproteína de baixo peso molecular, que quando secretada, ativa as células por meio de um complexo heterodimérico de sinalização celular, constituído do α -receptor próprio da IL-6 (IL-6R) e uma subunidade β glicoproteica (glicoproteína 130 – gp130) de transdução de sinal, que é compartilhada com outras citocinas. O IL-6R existe tanto em forma solúvel quanto ligado a membranas (expresso principalmente em hepatócitos, megacariócitos e várias subpopulações de leucócitos) [61].

A IL-6 exerce vários efeitos estimuladores sobre o crescimento celular e inflamação, sendo envolvida na iniciação e na manutenção da resposta inflamatória de fase aguda, na regulação imunológica e em eventos não imunes em diversos tipos de células e tecidos fora do sistema imune. Afeta também a homeostase do metabolismo da glicose e do seu metabolismo, direta e indiretamente pela ação em células do músculo esquelético, adipócitos, hepatócitos, células β pancreáticas e células neuroendócrinas [62; 63; 64].

O mRNA da IL 6 (IL-6/mRNA) foi demonstrado pela primeira vez nos glomérulos e no interstício renal em amostras de biópsia derivadas de pacientes com ND, e foi ainda demonstrada sua elevação tanto no soro quanto na urina de pacientes com DM1 e ND [65].

Navarro-González et. al. (2011) [31] reportaram em seu estudo uma super-expressão de IL-6 nos rins de ratos diabéticos. Nesse estudo, o aumento dos níveis de IL-6/mRNA no córtex renal foram diretamente associados ao aumento do volume renal. Tal mudança tem ocorrência precoce na evolução da ND e é um índice de hipertrofia renal. Da mesma forma, a super-expressão de IL-6 também está relacionada com o aumento das taxas de EUA [66].

Fawaz *et al.* (2006) [67] avaliaram dois marcadores inflamatórios (PCR-us – proteína C reativa, ultra-sensível – e IL-6) no soro de pacientes com DM1 (dois anos após o início da doença) e, comparando-os com indivíduos sem DM, demonstraram que seus níveis foram significativamente mais elevados. Foram ainda observados níveis maiores de IL-6 em pacientes com diabetes descompensada em comparação

com aqueles sobre controle glicêmico. Foi sugerido que tal elevação poderia estar relacionada com a ativação de macrófagos e aumento do estresse oxidativo.

Estima-se que 15 a 30% nos níveis circulantes de IL-6 são provenientes da sua produção no tecido adiposo, na ausência de um processo inflamatório agudo. Entretanto, no tecido adiposo, a maior proporção de IL-6 não é produzida por adipócitos maduros, mas sim por células do estroma (incluindo: pré-adipócitos, células endoteliais e monócitos/macrófagos) [68]. Um dos principais efeitos da IL-6 é a indução da produção hepática de PCR (proteína C reativa), importante marcador do risco de complicações cardiovasculares. Existe então uma forte correlação entre as concentrações de IL-6 no tecido adiposo e os níveis circulantes dessa citocina e de PCR [69].

Níveis urinários de citocinas também foram associados com maior nível de proteinúria no DM2 [70]. Enquanto no DM1, Wolkow *et al.* (2008) [71], mensurando níveis urinários de citocinas em indivíduos com DM1 com normalalbuminúria, encontraram níveis mais elevados de IL-6, IL-8 e MCP-1 e associados com o declínio da sua função renal.

2.3.1.3 IL-10

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina imunorreguladora produzida por células Th2, células T reguladoras, células B, monócitos e macrófagos. É uma citocina com ações anti-inflamatórias, com potencial capacidade para inibir a síntese de outras citocinas, tais como IL-6, IL-1b, IL-1a e TNF- α , produzidas por macrófagos ativados, e de interferon-gama (IFN- γ) produzido por células T [72; 73].

A IL-10 humana liga-se como um simétrico e duplo homodímero a um complexo tetramérico funcional de dois receptores, que consiste de duas cadeias A (ou -R1), que se ligam à IL-10, e de duas cadeias B (ou -R2) que iniciam os eventos de transdução de sinal induzidos pela IL-10. A cadeia B é um membro da família de receptores de interleucina classe II, que são codificados pelo cromossomo 21 [74].

A IL-10 desempenha um papel importante na fisiologia renal normal, bem como durante a lesão renal aguda e na progressão da insuficiência renal crônica e sua principal fonte local encontra-se nas células mesangiais [75]. O grau de

proteinúria se correlaciona com a progressão da glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial (alterações patológicas que conduzem à doença renal e falha renal em fase terminal), sendo que a IL-10 é capaz de promover a deposição de complexos imunes mesangiais, contribuindo assim para a progressão da lesão glomerular [76; 77; 78]. O papel da IL-10 na progressão da ND encontra-se esquematizado na **Figura 3**.

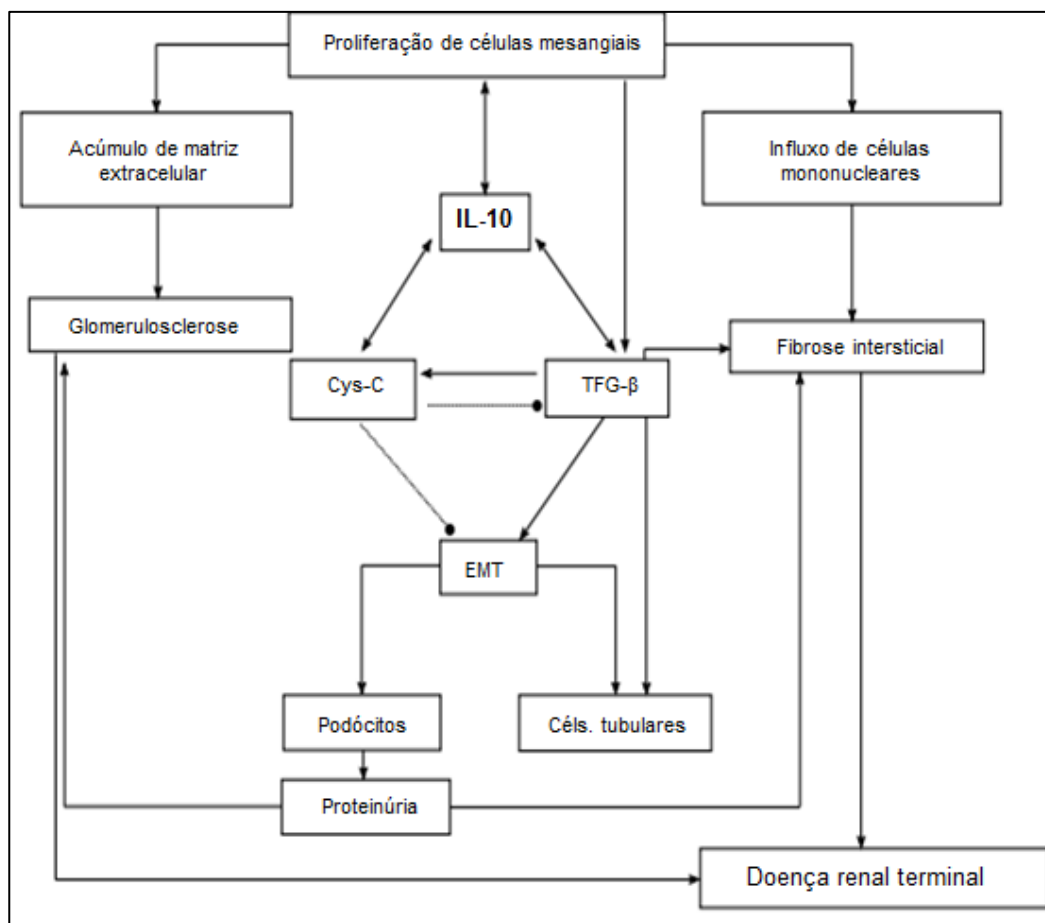


Figura 3. IL-10: Fluxograma da progressão da falência renal. Adaptado de Sinuani (2013) [75]. EMT: transição epitélio-mesenquimal; Cys-C: cistatina C.

Myśliwska *et al.* (2005) [78] encontraram concentração elevada de IL-10 circulante em pacientes diabéticos com ND, em comparação com pacientes diabéticos sem ND. Enquanto Wong *et al.* (2007) [79] observaram que as concentrações plasmáticas de IL-10 exibiram correlação positiva significativa com a relação albumina/creatinina urinária em pacientes com ND. Ainda, foi observado que alterações em níveis de IL-10 correlacionaram-se com a extensão do dano renal em

pacientes com ND. Tais dados indicam que a IL-10 pode contribuir para a patogênese da ND [45].

A produção aumentada de IL-10 é capaz de prever a albuminúria e está correlacionada com a gravidade da ND e sua inibição *in vivo* em ratos com glomerulonefrite induzida diminui grandemente a expansão das células mesangiais e conseqüentemente a EUA, incluindo uma redução da deposição de complexos imunes nos glomérulos, a prevenção da hiperplasia glomerular e expansão mesangial, com diminuição da proteinúria [75].

2.4 Lesão endotelial no diabetes e trombomodulina

Várias anormalidades do endotélio têm sido descritas no DM, incluindo aumento na proliferação celular, alterações na forma das células em área de ateroma e distúrbios no 'turnover' das células endoteliais. Observa-se também aumento dos níveis circulantes de fator de Von Willebrand (vWF) e trombomodulina (TM) nos pacientes diabéticos com microalbuminúria, refletindo uma lesão endotelial. Nesses pacientes, o endotélio mostra também redução da resposta de relaxamento ao óxido nítrico (NO). Por fim, a microalbuminúria pode ser o resultado de uma injúria endotelial generalizada [80; 81]

Vários fragmentos solúveis de TM podem ser detectados em amostras de soro, plasma e urina, além da forma ligada a membrana. Esses fragmentos são derivados a partir de membranas de células endoteliais lesionadas, bem como da clivagem proteolítica de TM ligada à membrana [82].

A TM é um receptor para trombina presente na superfície luminal do endotélio em artérias, veias, capilares e vasos linfáticos. Consiste em uma molécula transmembrana glicosilada, com 557 aminoácidos e com cinco domínios estruturais bem definidos: um grupo amino-(NH₂) terminal globular que ocupa praticamente quase toda porção extracelular da molécula; um domínio composto por seis estruturas consecutivas homólogas ao EGF(fator de crescimento epidérmico); um domínio rico em resíduos de serina e treonina; um domínio transmembranar contendo 23 aminoácidos e finalmente o domínio citoplasmático, carboxi-terminal e que possui sítios para fosforilação essenciais para o processo de endocitose. Uma vez que a trombina liga-se à TM na superfície da célula, forma-se um complexo que

é transferido para o interior da célula, em que a trombina é então degradada, e a TM internalizada é reciclada e retorna para a superfície da membrana [81; 83; 84].

No rim, a proteína C é ativada pela ligação da trombina à TM sobre a superfície da célula endotelial glomerular. A TM forma um complexo de elevada afinidade com a trombina que catalisa a conversão da proteína C para a sua forma ativa, a qual apresenta potente ação anticoagulante, pró-fibrinolítica, anti-inflamatória e citoprotetora. Na ND, a produção de proteína C ativada no glomérulo é alterada, em parte por causa da hiperglicemia induzida por repressão da expressão de trombosmodulina. A diminuição da atividade funcional da proteína C ativada afeta a permeabilidade da parede capilar glomerular e intensifica a apoptose de células endoteliais e podócitos glomerulares. A participação da TM pode ser, portanto, relevante para a fisiopatologia da ND [85].

2.5 Estresse oxidativo

O termo 'estresse oxidativo' tem sido utilizado para definir um estado em que as espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) alcançam níveis excessivos, seja por excesso de produção ou de eliminação insuficiente. Sendo moléculas altamente reativas, ROS e RNS em excesso podem ocasionar dano às proteínas, lipídios e ao DNA. Níveis aumentados de ROS são convertidos pela maquinaria celular antioxidante em outros produtos oxidantes, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito. Essas moléculas propagam o dano oxidativo a todos os compartimentos celulares, levando à oxidação lipídica e de proteínas [86]. Os danos causados pelo estresse oxidativo podem levar ainda à morte celular, diabetes, câncer e ao envelhecimento do organismo [87].

Mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar que as anormalidades estruturais e funcionais, associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, estejam ligadas à capacidade antioxidante endógena prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres [88].

A hiperglicemia e alta quebra de triglicérides, com liberação de ácidos graxos, estão entre as causas e condições para o desenvolvimento do estresse oxidativo. Dessa forma, não é de se surpreender que os indivíduos diabéticos tendem a ter um ambiente celular oxidativo em maior frequência se comparados com indivíduos saudáveis, e conseqüentemente, uma produção aumentada de ROS [89]. Além disso, entre os diabéticos, há uma diminuição das defesas antioxidantes, ou seja, níveis de enzimas antioxidantes encontram-se afetadas pela fisiopatologia da doença, aumentando ainda mais o *status* pró-oxidativo [90].

O néfron produz grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são neutralizados por enzimas antioxidantes endógenas e sistemas de eliminação de radicais livres. Nos rins, similar ao que ocorre em outros tecidos, as ROS induzem diversos efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação lipídica da membrana celular, a oxidação de proteínas, vasoconstrição renal e danos ao DNA. O estresse oxidativo é parte integrante de todos os cinco mecanismos para explicar como ocorre o dano tecidual renal induzido pela hiperglicemia [91]. Como se segue esquematizado a seguir também na **Figura 4**;

- 1) Formação de produtos finais de glicação avançada (AGE's);
- 2) A ativação da proteína quinase C (PKC), que conduz a um aumento da secreção de prostanoídes vasodilatadores, que contribuem para a hiperfiltração glomerular;
- 3) Aceleração da via da aldose-redutase, resultando no acúmulo de sorbitol e metabólitos (ativação da via do sorbitol);
- 4) Ativação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α e TGF- β 1;
- 5) Redução das defesas antioxidantes do plasma.

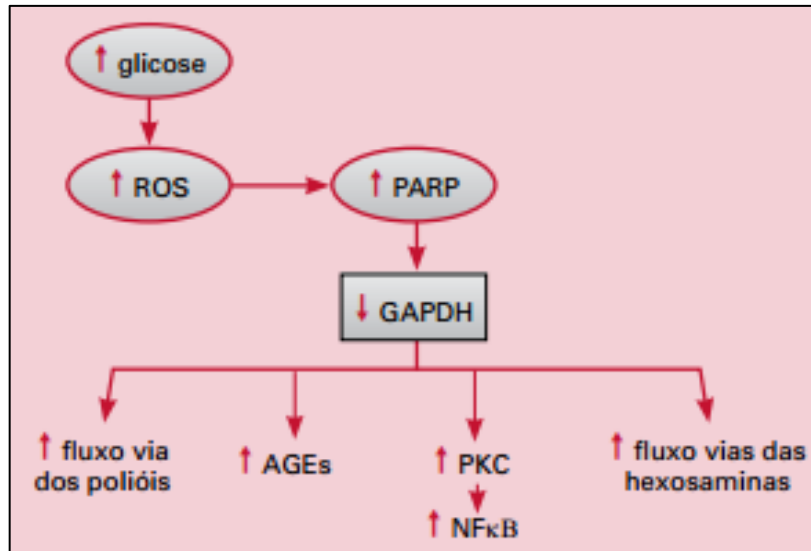


Figura 4. Dano celular induzido pela hiperglicemia. Adaptado de Reis, *et al.* 2008 [88]. ROS: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli ADP-ribose polimerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; AGEs: produtos avançados de glicação não-enzimática; PKC: proteína quinase C; NFκB: fator de transcrição nuclear κB

Uma evidência do estado oxidativo em diabéticos é geralmente demonstrada pelo aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de estresse oxidativo ou uma diminuição dos níveis antioxidantes do plasma [92].

2.5.1 MTT

O ensaio de metabolização dos sais de tetrazólio (MTT) [-3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], reação usada na medida de viabilidade e proliferação celular, tem sido utilizado na avaliação do *status* antioxidante e baseia-se na redução do MTT através da succinato desidrogenase mitocondrial (SHD), que age como doadora de elétrons na redução do MTT. Esta redução, descrita inicialmente como um fenômeno intracelular, envolve NADH₂ e FADH₂ e é primariamente uma medida da taxa de produção de NADH na hiperglicemia, resultando na formação de cristais de *formazan*, um produto insolúvel [93].

O composto colorimétrico *formazan* é formado por meio da reação dos fatores antioxidantes do plasma (tais como ascorbato, α-tocoferol, urato, vitamina E, albumina e o grupo sulfidril das proteínas) [94] e a concentração deste produto final pode ser detectada em um espectrofotômetro.

Num estudo realizado por Reis (2006) [93], não foi observada diferença significativa na capacidade de redução direta do MTT pelo plasma entre DM1 e não-diabéticos, caracterizando a manutenção do poder antioxidante do plasma neste grupo. Além disso, nenhuma correlação entre controle glicêmico e lipídico e os parâmetros avaliados foi encontrada. No entanto, Medina *et al.* (2007) [94] realizaram o ensaio do MTT em amostras de plasma de indivíduos saudáveis e com DM2 e observaram que estes últimos possuíam significativamente menor capacidade antioxidante.

2.5.2 TBARS

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são comumente medidas como um marcador indireto de estresse oxidativo. São formadas a partir de produtos de degradação durante a oxidação de ácidos graxos insaturados (peroxidação lipídica), por ataque de ROS. Níveis de TBARS estão aumentados em pacientes diabéticos, que apresentam um estresse oxidativo aumentado, e seu aumento é paralelo à diminuição da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), bem como à diminuição das concentrações da glutatona reduzida (GSH) e de α -tocoferol [95].

Um estudo demonstrou que níveis de TBARS foram elevados tanto em indivíduos com DM1 quanto DM2 [92]. Foi ainda demonstrado, por Seghrouchni *et al.* (2002) [95], níveis de TBARS significativamente mais elevados em indivíduos com DM2 em uso ou não de insulina, comparado com pacientes com DM1 e ainda com indivíduos controle. Um aumento proeminente dos níveis renais de TBARS foi também observado nos animais não-tratados *versus* animais tratados com água mineral sulfurada, em um estudo conduzido por Safar & Abdelsalam (2014) [96], que objetivava avaliar o efeito de compostos doadores de H₂S na atenuação da ND em ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a associação entre o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a lesão endotelial em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 com diferentes graus de nefropatia;

3.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar a população (pacientes com DM1) em estudo segundo variáveis demográficas e clínicas;
- Quantificar as citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α em amostras de urina e plasma;
- Determinar níveis plasmáticos de trombomodulina e sua associação com o processo inflamatório;
- Determinar níveis plasmáticos de TBARS e MTT e sua associação com o processo inflamatório;
- Comparar a razão plasma/urina da concentração de citocinas nos diferentes grupos.
- Comparar os níveis dos marcadores sanguíneos e renais com um grupo controle sem DM;
- Comparar os níveis destes marcadores nos grupos de pacientes com DM1 nos diferentes graus de nefropatia.

4 CAPÍTULO 1

Artigo submetido intitulado: CYTOKINES PROFILE AND ITS CORRELATION WITH
ENDOTHELIAL DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH TYPE 1
DIABETES MELLITUS AND NEPHROPATHY

**CYTOKINES PROFILE AND ITS CORRELATION WITH ENDOTHELIAL DAMAGE AND
OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS AND
NEPHROPATHY**

Rodrigo M. C. Pestana¹, Caroline P. Domingueti¹, Rita C. F. Duarte¹, Rodrigo B. Fóscolo², Janice S. Reis³, Ana Maria S. Rodrigues⁴, Laís B. Martins⁴, Lirlândia P. Sousa¹, Daniela P. Lage⁵, Cláudia N. Ferreira⁵, Adaliene V. M. Ferreira⁴, Ana P. Fernandes¹, Karina B. Gomes¹

1. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brazil
2. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil
3. Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil
4. Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brazil
5. Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brazil

Corresponding author:

Karina Braga Gomes

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia - UFMG. Av Antonio Carlos, 6627, Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte/MG, Brazil. Phone: +55 (31) 3409 6895 Fax: +55 (31) 3409 6985

E-mail: karinabgb@gmail.com

Abstract

Aim: The aim of the present study was to investigate the correlation between the presence of albuminuria and markers of inflammation, endothelial damage and oxidative stress in patients with type 1 diabetes mellitus (DM1). **Methods:** The sample was composed by 35 healthy individuals, 93 DM1 patients with normo and microalbuminuria (< 300 mg of albumin/g of creatinine) and 32 DM1 patients with macroalbuminuria (\geq 300 mg of albumin/g of creatinine). Plasma and urinary cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) and thrombomodulin levels were determined by ELISA. Oxidative status was evaluated using the TBARS and MTT assays. **Results:** Diabetic patients were characterized by elevated levels of urinary cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10. Those with macroalbuminuria presented significantly higher TNF- α and IL-10 urinary levels when compared to other groups. Urinary and plasmatic levels of TNF- α was positively correlated to plasma levels of cystatin C, creatinine, urea and albuminuria, whilst was negatively correlated with estimated glomerular filtration rate (eGFR). Urinary IL-10 levels proved positive correlation with fasting glucose, Hb1Ac, thrombomodulin and TBARS, while IL-6 plasma levels were positively correlated with HbA1c and albuminuria. Only urinary TNF- α levels were associated with the presence and severity of macroalbuminuria, after logistic regression analysis. **Conclusion:** This finding suggests that measurement of urinary TNF- α level may be helpful to evaluate progression to nephropaty in DM1 patients.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus; albuminuria; cytokines; oxidative stress; endothelial damage

1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN) is the main cause of kidney disease and affects about 40% of Type 1 and Type 2 diabetic patients. DN presents a clinical diagnosis based on the finding of proteinuria or microalbuminuria. The diabetes mellitus is an independent risk factor for the Chronic Kidney Disease (CKD) development and glomerular filtration rate (GRF) decrease, contributing for cardiovascular morbidity and mortality [1; 2].

DN is morphologically characterized by progressive thickening of glomerular basement membrane, accumulation of extracellular matrix proteins (collagen, fibronectin and laminins) in the glomerular mesangium and tubulointerstitial disease, which negatively correlates with glomerular filtration function [3].

Experimental and clinical evidences suggest that inflammation plays a role in the pathogenesis of DN, in addition to hemodynamic and metabolic changes [4]. Inflammation may contributes to the early risk of progression to microalbuminuria and evident nephropathy, even when urinary albumin excretion is within normal limits. Factors that promote renal inflammation and the loss of protective pathways in the preclinical phase of DN are poorly understood, but may include endothelial shear-stress associated to glomerular hyperfiltration [5]. Many studies showed an increase in macrophage infiltration and overproduction of leukocyte adhesion molecules in kidney from diabetic individuals as well as in experimental animal models of diabetes mellitus [6; 7]. In addition, long-term low-grade inflammation may be associated to the onset of several disturbances including insulin resistance, hyperglycemia, oxidative stress and endothelial dysfunction, which secondary play a critical role in perpetuating renal damage and progression [8].

Whereas inflammation, oxidative stress and endothelial damage are strongly associated with the risk of development of diabetic complications, a huge number of

plasma and urine biomarkers have been investigated for early diagnosis of DN progression. In this context, the aim of this study was to evaluate the association between inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) and markers of endothelial dysfunction (thrombomodulin) and oxidative stress (TABARS and MTT) in the development of DN. This study can contribute to expanding the understanding about the mechanisms associated to DN progression and potential laboratorial tools for prognosis and monitoring purposes.

2. Material and Methods

2.1 Subjects

A total of 125 individuals with Type 1 diabetes mellitus (DM1) (45 men, 80 women; aged 18 to 60 years old), consecutively selected in an outpatient diabetic clinic, were included in this study. After investigating the exclusion criteria, each patient was classified according to normo and microalbuminuria (n=93, group 1A) or macroalbuminuria (n=32, group 2A). The control was composed by 35 subjects (12 men, 23 women; aged 18 to 60 years), without diabetes mellitus, renal disease and hypertension.

The diagnosis of diabetes was performed according to the criteria of American Diabetes Association (ADA) [9; 10]. Normo and microalbuminuria was defined as < 300 mg of albumin/g of creatinine and macroalbuminuria as \geq 300 mg of albumin/g of creatinine. The presence of microalbuminuria or macroalbuminuria was confirmed in two out of three occasions, over a period between three and six months.

Data and samples were collected from patients assisted by the Endocrinology Clinic of the University Hospital (Federal University of Minas Gerais) and Santa Casa of Belo Horizonte, in the period from November/2011 to September/2012. The individuals had

their medical records analyzed for information such as the use of medications, comorbidities and complications of diabetes. Individuals (case and control group) with liver disease, alcoholics, coagulation disorder, cancer, infectious or inflammatory process in development, hemodialysis, renal transplantation history or pregnancy were excluded from this study. Individuals that presented C-Reactive Protein (CRP) > 10 mg/dL were also excluded in order to avoid asymptomatic inflammatory process.

2.2 Ethics

This study was approved by Ethics Committee at Federal University of Minas Gerais and Santa Casa of Belo Horizonte. Informed consent was obtained in all cases. The protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki and the Convention on Human Rights and Biomedicine from the Council of Europe. The research protocol did not interfere with the medical recommendation.

2.3 Biochemical determinations

Blood samples were drawn before breakfast after 8-12 h overnight fasting. Samples were collected in sterile tubes, centrifuged at 3000 g. for 15 min at 4°C, and stored at -80°C until assayed.

Fasting glucose, serum creatinine (Cr) and urea were determined by enzymatic method; serum albumin was assessed by a colorimetric method and glycated hemoglobin (HbA1c) was determined by immunoturbidimetry using Johnson & Johnson kits - dry chemistry techniques (Ortho Clinical Diagnostics®) and analytical equipment VITROS 4600. Cystatin C was measured in plasma, collected in sodium citrate samples, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the kit Human Cystatin C (Biovendor®). The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the

abbreviated Modification of Diet in Renal Disease formula [eGFR-MDRDa: $186 \times \text{plasma creatinine (mg/dL)}^{-1.154} \times \text{age (years)}^{-0.203} \times 0.742 \text{ (if female)} \times 1.212 \text{ (if black)}$] [11].

First-morning urine samples (at least 4 hours retention) were collected under sterile conditions and 10 mL of urine were centrifuged at 3000 g. for 10 min. The supernatant was stored at -80°C until assay. The same specimen was used for urinary albumin excretion (UAE) determination. Urinary albumin was corrected by urine creatinine. Urinary albumin was evaluated by immunoturbidimetry and urinary creatinine was determined by enzymatic method, using Johnson & Johnson kits - dry chemistry technology (Ortho Clinical Diagnostics®) and analytical equipment VITROS 4600.

2.4 Cytokines and thrombomodulin determinations

For determination of cytokines and thrombomodulin levels, plasma was collected using sodium citrate as anticoagulant and stored at -80°C until assayed.

Thrombomodulin, which is used as a marker of endothelial damage, was measured by sandwich ELISA method (IMUBIND®, Seikisui Diagnostics). The plasma concentration of TNF- α was determined by a high sensitivity quantitative sandwich enzyme immunoassay (R&D Systems®). The IL-6 levels were measured using a high sensitivity quantitative sandwich enzyme immunoassay (R&D Systems®). For determination of plasma and urinary IL-10 concentrations and urinary levels of TNF- α , we used a solid phase sandwich ELISA (R&D systems®).

Urinary levels of cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) were corrected by urinary Cr concentration and expressed as TNF- α /Cr (pg/g), IL-6/Cr (pg/g), IL-10/Cr (pg/g),

respectively. The ratio between the plasma and urinary levels for each cytokine was also calculated.

2.5 Oxidative stress determination

Lipid peroxidation was evaluated through plasma thiobarbituric acid reactive species (TBARS) concentration. Lipid peroxidation creates secondary products such as alkanes, aldehydes and isoprostanes that can be used to evaluate the oxidative status of biological materials [12]. The TBARS quantification was performed according to Duarte *et al.* [13] modified: 100 μL of plasma were added to 100 μL of ice cold solution of TBA 1% (TBA 1%, NaOH 0.05 mol/L and 0.1mmol/L butylated hydroxytoluene -BHT) and 100 μL of phosphoric acid (H_3PO_4) concentrate. The solution were incubated in bath-dried for 25 minutes at 98 $^\circ\text{C}$ and then put in the freezer for 10 minutes. Thereafter, 375 μL of butanol were added, which were vortexed for 10 seconds and centrifuged for 5 minutes at 2000 g. The absorbance of the supernatant was measured in a spectrophotometer at 532 nm and 600 nm.

The antioxidant capacity of the plasma was determined with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) quantification, according to described by Medina *et al.* [14] modified. A solution containing 100 μL of plasma, 50 μL of PBS, and 12.5 μL of MTT solution were incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 60 minutes and protected from light. Then, 750 μL of a solution of isopropanol acid (0,04 M; HCl) were added and vortexed for 30 seconds. Subsequently, the tubes were centrifuged at 3000 g for 10 minutes. The absorbance of the supernatant was measured at 570 nm.

2.6 Statistical analysis

Analyses were performed with SPSS package (version 13.0 for Windows; Chicago, Illinois, USA). Data were expressed as mean \pm SD or median (interquartile range) as appropriate. The normality of the quantitative variables was assessed by the Shapiro-Wilk test. Student's t-test and ANOVA or the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis (followed by Bonferroni Test) determined the differences between two and three groups in parametric and non-parametric variables, respectively. Differences in frequencies were evaluated with Chi-Square test. Correlations between plasma and/or urinary cytokines and other parameters were performed using Spearman's Correlation test. A forward stepwise multivariate logistic regression analysis was applied to identify the independent predictors of macroalbuminuria among the variables with a p-value <0.2 in the univariate analysis. Hosmer-Lemeshow Test was applied to evaluate the adequacy of the multivariate model. Level of statistical significance was considered as *P* value <0.05 .

3. Results

Clinical and laboratory characteristics are described in Table 1. Gender, age and body mass index (BMI) were not different between the groups after Bonferroni Test correction, but retinopathy and hypertension were more prevalent on group 1A, while dyslipidemia was less frequent in control group.

There were no significant differences between the groups 1A/2A regarding to glycemic control (fasting glucose and HbA1c), but these markers were higher than the values presented by the control group. Duration of diabetes did not differentiated the 1A and 2A groups.

As expected, patients in the group 2A had higher levels of albuminuria, creatinine, urea, cystatin C and lower eGFR when compared to the control and 1A groups, whereas the 1A group presented higher levels of urea and albuminuria when compared to control group.

When compared to 1A group, individuals with diabetes and macroalbuminuria presented significantly higher TNF- α and IL-10 urinary levels, as well as smaller IL-10 ratio plasma/urine. The grupo 2A showed elevated TNF- α plasma and urinary levels, IL-6 and IL-10 urinary levels, besides smaller plasma/urine ratio of IL-6 and IL-10, when compared with the control group. No difference between 1A group and control group was observed (Table 2).

Regarding the thrombomodulin, no difference was observed when compared the three groups, although a tendency to higher levels in 2A group was observed when compared with 1A and control groups. Similarly, TBARS levels did not differentiated among the three groups. However, the antioxidant capacity, measured through MTT levels, was higher in both groups with diabetes than in the control group (Table 3).

In the group with diabetes, urinary TNF- α levels was positively correlated to plasma levels of cystatin C, creatinine, urea and albuminuria, whilst was negatively correlated with eGFR. Similar correlations were found for plasma TNF- α levels to cystatin C, urea and albuminuria. IL-6 plasma levels were positively correlated with HbA1c and albuminuria. Finally, urinary IL-10 levels proved positive correlation with Hb1Ac, fasting glucose, thrombomodulin and negative with TBARS (Figure 1). No other significant correlation was observed between the cytokines levels and laboratorial parameters.

The logistic regression analysis showed that the only variable independently associated to macroalbuminuria in patients with diabetes was the urinary TNF- α levels,

which showed an Odds Ratio of 8.96 (CI - 2.19 – 36.68) and $p= 0.002$ (Hosmer & Lemeshow test = 0.657).

4. Discussion

While the mechanism responsible for the development of kidney injury is not completely understood, inflammation is critical in the development of early injury in preclinical DN [15]. Therefore, the evaluation of plasma and urine markers of inflammation that could predict the progression to macroalbuminuria in patients with diabetes is a focus in many studies.

Here, increased TNF- α and IL-10 urinary levels, as well as IL-10 ratio plasma/urine were observed with the worsening of the nephropathy (UAE ≥ 300 mg / g Cr), since higher values were observed for the 2A group, when compared to 1A. The TNF- α plasma levels were also higher in the 2A group, nevertheless, the significance was lost when the Bonferroni correction was applied. These results suggest that these mediators may offer potential for diagnosis of macroalbuminuria in diabetic patients. No significant difference in cytokine levels were observed between diabetics with normo or microalbuminuria and the control group, suggesting that these biomarkers are not adequate to predict nephropathy, in early stages.

These data are in agreement with Lampropolou *et al.* [16] and Ruotsalainen *et al.* [17]. In a previous study [18], we have also shown that inflammatory status is associated with nephropathy in DM1, since higher plasma levels of INF- γ , TNF- α , IL6, IL-10 in patients with diabetes and CKD (albuminuria ≥ 30 mg/g and/or GFR < 60 mL/min/1.73m²) were observed when compared to those without CKD. Interestingly, we suggested that, although IL-10 has been considered an anti-inflammatory cytokine, its increase could be

associated to a compensatory mechanism, in consequence of pro-inflammatory cytokines levels increase.

Urinary TNF- α was a distinguishing factor associated with macroalbuminuria in patients with diabetes. This result can be strengthened by those found by Kalantarinia, *et al.* [19] in an experimental animal model. Three days after of diabetes induction in mice promoted a significant increase in urinary and interstitial (renal) levels of TNF- α , which correlated with the increase in UAE. Similar results were reported by DiPetrillo, *et al.* [20], who found that TNF- α urinary levels were still significantly higher than the interstitial levels, suggesting that there are other sections of the kidneys responsible for TNF- α production, especially in the renal cortex. In a logistic regression analyzes, Ng *et al.* [21] found that the score of TNF- α system (plasma TNF- α and soluble forms of cellular receptors; sTNFR1 and sTNFR2) was independently associated with UAE. Likewise, Lampropoulou *et al.* [16] observed that urinary levels of TNF- α were the only independent contributor to UAE, despite of other factors had been included in the multivariate analysis: age, duration of diabetes, BMI, history of cardiovascular disease, presence of retinopathy, hypertension, and HbA1c levels.

The main mechanism proposed indicates that high glucose and advanced glycation end products (AGEs) induce expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and cell adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in many renal cellular compartments, which enhance recruitment and maturation of monocytes/macrophages in the kidney under high-glucose environment. AGEs are also involved on polarization towards a proinflammatory M1 phenotype and release considerable amounts of proinflammatory factors, as TNF- α , which consequentially stimulate production of reactive oxygen species (ROS), leading to subclinical chronic inflammation, glomerular and tubular damage, preceding the albuminuria [22; 23; 24; 25;

26]. This increased local production of TNF- α could result in urinary release, which confirm our data. The importance of this cytokine in the progression of DN was also demonstrated experimentally by Awad *et al.* [27], who showed that TNF- α -neutralizing antibody prevents kidney hypertrophy, albuminuria and preserves kidney function in a murine model of DM1. Furthermore, we observed a correlation between TNF- α and the markers currently used in the DN evaluation, suggesting that the use of all these markers together could enhance the sensibility of laboratorial diagnosis of DN progression.

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine produced by macrophages and lymphocytes. In human studies, it has been shown that there is a greater incidence of insulin resistance in subjects with reduced serum levels of IL-10 [28; 29; 30; 31]. Curiously, we observed a huge increase of IL-10 in patients with macroalbuminuria only in urinary samples. This finding indicates a renal production of this cytokine and that IL-10 could be a counter-regulatory inflammation marker, acting in order to reduce the inflammatory process observed in the DN. In agreement with our results, Wong *et al.* [32] showed that IL-10 plasma levels showed a significant positive correlation with the UAE in patients with DN, and Mys'liwska *et al.* [33] found strong evidence that IL-10 may influence the degree of albuminuria.

Moreover, urinary IL-10 levels were correlated (Figure 1) with fasting glucose, HbA1c, TBARS and thrombomodulin. Evidence has indicated that high-glucose conditions can modulate thrombomodulin expression in human aortic endothelial cells and mouse glomerular capillaries, as well as oxidative stress [34; 35]. These studies support our findings, in which we demonstrated a positive correlation between urinary levels of IL-10 with glycemic control markers, suggesting that inefficient glycemic control may induce an increase in urinary production of IL-10, endothelial injury and lipid peroxidation.

Although only urinary IL-6 levels were elevated in 2A group when compared to controls, plasmatic levels were positively correlated with HbA1c and albuminuria. IL-6 is a sensitive physiological marker of subclinical systemic inflammation, which is associated with insulin resistance, metabolic syndrome, hyperglycemia and diabetes [36]. Navarro-Gonzalez *et al.* [37] reported on their study an IL-6 over-expression in the kidneys of diabetic rats directly associated with increased kidney size. Likewise, IL-6 overexpression was associated with increased UAE [38]. It is plausible that IL-6 affects extracellular matrix dynamics at the mesangial cell and podocyte levels, contributing to mesangial expansion and glomerular basement membranes [39].

Several studies have demonstrated that plasma levels of thrombomodulin [40; 41] are significantly increased in diabetic patients with nephropathy. The loss of podocytes is a clear event in the progression of DN, which results of apoptosis, induced by a high concentration of glucose in several renal compartments. Yang *et al.* [42] have demonstrated that the recombinant thrombomodulin had a significant inhibitory effect on apoptosis in podocytes, *in vitro*. Some mechanisms have been proposed to explain the anti-inflammatory potential of thrombomodulin, at the renal setting, including: (1) interference with the binding of lipopolysaccharide to its receptor and inhibition of inflammatory mediator production by macrophages; (2) suppression of adhesion molecule expression by neutrophils acting via the NF- κ B and MAPK pathways; (3) prevention of leucocyte activation and (4) interference with complement activation (C3a and C5a) via the classical and lectin pathways [42; 43; 44]. Such hypotheses can be raised as an adaptive event to inflammatory state *per se* present in DN or by direct endothelial injury.

The role of oxidative stress in the pathophysiology of diabetes and nephropathy is evident and can be demonstrated in various experimental and clinical studies that shown a significant increase in lipid peroxidation, which correlates to glycemic control and may be

consequent of non-enzymatic glycation activation of the sorbitol pathway and metabolic stress, resulting in increased production of free radicals and the decrease in the antioxidant capacity [45; 46]. Lipid peroxidation and free radicals generation can induce nephropathy by different means. A probable mechanism may result from the increased activity of phospholipase A2 (PLA2) that produces thromboxane A2 (TXA2) and the vasodilator prostacyclin (PGI2). A balance between PGI2 and TXA2 preserves natural vascular tone, but in diabetes, levels of TXA2 are increased while PGI2 levels are decreased and this imbalance may lead to a decrease of blood flow, associated to nephropathy [47].

The results observed in our study are in agreement with those reported by Medina *et al.* [14] who demonstrated that the antioxidant status of patients with type 2 diabetes is lower than in healthy subjects. In our study, this difference was observed among patients with Type 1 diabetes (1A and 2A group) when compared with control group. In a study of Medina-Navarro *et al.* [48; 49], the results demonstrated that albumin isolated and purified from diabetic patients with advanced stages of renal damage and lower GFR presented a higher antioxidant response to stress than albumin from normal patients or patients in earlier stages of DN.

Some limitations may be raised in this study, as the small sample size and the transversal design. However, our results can contribute to better understand the relationship between inflammation and DN development. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first study that investigated the plasma/urine ratio of cytokines levels in order to establish the association with UAE.

5. Conclusion

The DM1 patients were characterized by elevated levels of urinary cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10). However, only urinary TNF- α levels were independently associated with the presence of macroalbuminuria, indicating that its intra-renal production may be involved in the pathogenesis and progression of DN. While further longitudinal studies are needed to elucidate the exact role of this cytokine in DN, this finding suggests that measurement of urinary TNF- α levels may be helpful, in association with other marker, to evaluate progression to nephropathy in DM1 patients.

Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG, CAPES and CNPq/Brazil. APF and KBG are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

Declaration of Interest

The authors report no declarations of interest.

References

- [1] Gross J.L., Azevedo M.J., Silveiro S.P., Canani L.H., Caramori M.L., Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*. 2005; 28: 176–188.
- [2] National Kidney Foundation, KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am. J. Kidney Dis*. 2007; 49: S12–154.

- [3] Cvetković T., Mitić B., Lazarević G., Vlahović P., Antić S., Stefanović V. Oxidative stress parameters as possible urine markers in patients with diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complications*. 2009; 23: 337–342.
- [4] Wu Y., Dong J., Yuan L., Liang C., Ren K., Zhang W., et al. Cytokine Nephrin and podocin loss is prevented by mycophenolate mofetil in early experimental diabetic nephropathy. *Cytokine*. 2008; 44: 85–91.
- [5] Cherney D.Z.I., Scholey J.W., Daneman D., Dunger D.B., Dalton R.N., Moinuddin R., et al. Urinary markers of renal inflammation in adolescents with Type 1 diabetes mellitus and normoalbuminuria. *Diabet. Med.* 2012; 29: 1297–302.
- [6] Utimura R., Fujihara C.K., Mattar A.L., Malheiros D.M.A., Noronha I. L., Zatz R. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003; 63: 209–216.
- [7] Tone A., Shikata K., Sasaki M., Ohga S., Yozai K., Nishishita S., et al. Erythromycin ameliorates renal injury via anti-inflammatory effects in experimental diabetic rats. *Diabetologia*. 2005; 48: 2402–2411.
- [8] Rivero A., Mora C., Muros M., Garc J. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin. Sci.* 2009; 492: 479–492.
- [9] American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes - 2015, *Diabetes Care*. 2015; 38: 59–67.
- [10] Reutens A.T., Epidemiology of Diabetic Kidney Disease. *Med. Clin. North Am.* 2013; 97: 1–18.

- [11] Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B., Greene T., Rogers N., Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.* 1999; 130: 461–470.
- [12] Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 2004; 43: 200–227.
- [13] Duarte R.C.F., Campos F.M.F., Filho O.A.M., Alves M.T., Fernandes A.P., Borges K.B.G., et al. Effect of acetylsalicylic acid on platelet activation and oxidative profile in a set of Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2015; 26:123–130.
- [14] Medina L.O., Veloso C.A., Borges E. A., Isoni C.A., Calsolari M.R., Chaves M.M., et al. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007; 77:193–197.
- [15] Cherney D.Z.I., Scholey J.W., Daneman D., Dunger D.B., Dalton R.N., Moinuddin R., et al. Urinary markers of renal inflammation in adolescents with Type 1 diabetes mellitus and normoalbuminuria., *Diabet. Med.* 2012; 29:1297–302.
- [16] Lampropoulou I., Stangou M., Papagianni A., Didangelos T., Iliadis F., Efstratiadis G. TNF- α and Microalbuminuria in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* 2014; 2014: 1 – 7.
- [17] Ruotsalainen E., Stancakova A., Vauhkonen I., Salmenniemi U., Pihlajamaki J., Punnonen K., et al. Changes in cytokine levels during acute hyperinsulinemia in offspring of type 2 diabetic subjects. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 536–541.

- [18] Domingueti C.P., Fóscolo R.B., Reis J.S., Magalhães F., Campos F., Dusse L.M.S., et al. Association of Haemostatic and Inflammatory Biomarkers with Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* 2016; 2016:1 – 8.
- [19] Kalanatarinia K., Awad A.S., Siragy H.M., Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- α increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int.* 2003; 64: 1208–1213.
- [20] Petrillo K.D.I., Coutermarsh B., Gesek F.A., Coutermarsh B., Frank A. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003; 284: 113–121.
- [21] Ng D.P.K., Fukushima M., Tai B.C., Koh D., Leong H., Imura H., et al. Reduced GFR and albuminuria in Chinese type 2 diabetes mellitus patients are both independently associated with activation of the TNF-alpha system. *Diabetologia.* 2008; 51: 2318–2324.
- [22] Sun L., Kanwar Y.S. Relevance of TNF- α in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2015; 88: 662–665.
- [23] Manda G., Checherita A., Comanescu M.V., Hinescu M.E. Redox Signaling in Diabetic Nephropathy : Hypertrophy versus Death Choices in Mesangial Cells and Podocytes. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:1 - 13.
- [24] Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25: 677–686.
- [25] Galkina E., Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: 368–377.

- [26] Moriwaki Y., Yamamoto T., Shibutani Y., Aoki E., Tsutsumi Z., Takahashi S., et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism*. 2003; 52: 605–608.
- [27] Awad A.S., You H., Gao T., Cooper T.K., Nedospasov S.A., Vacher J., et al. Macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha mediates diabetic renal injury. *Kidney Int*. 2015; 88: 722–733.
- [28] Hirayama K., Ebihara I., Yamamoto S., Kai H., Muro K., Yamagata K., et al. Predominance of type-2 immune response in idiopathic membranous nephropathy. Cytoplasmic cytokine analysis. *Nephron*. 2002; 91: 255–261.
- [29] Dokter W.H., Koopmans S.B., Vellenga E. Effects of IL-10 and IL-4 on LPS-induced transcription factors (AP-1, NF-IL6 and NF-kappa B) which are involved in IL-6 regulation. *Leukemia*. 1996; 10: 1308–1316.
- [30] Korholz D., Banning U., Bonig H., Grewe M., Schneider M., Mauz-Korholz C., et al. The role of interleukin-10 (IL-10) in IL-15-mediated T-cell responses. *Blood*. 1997; 90: 4513–4521.
- [31] Schottelius A.J., Mayo M.W., Sartor, R.B., Baldwin A.S.J. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappa- β DNA binding. *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 31868–31874.
- [32] Wong C.K., Ho A.W.Y., Tong P.C.Y., Yeung C.Y., Kong A.P.S., Lun S.W.M., et al. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Clin. Exp. Immunol*. 2007; 149: 123–131.

- [33] Mysliwska J., Zorena K., Semetkowska-Jurkiewicz E., Rachon D., Suchanek H., Mysliwski A. High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. *Eur. Cytokine Netw.* 2005; 16:117–122.
- [34] Isermann B., Vinnikov I.A., Madhusudhan T., Herzog S., Kashif M., Blautzik J., et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat. Med.* 2007; 13: 1349–1358.
- [35] Wang H., Vinnikov I., Shahzad K., Bock F., Ranjan S., Wolter J., et al. The lectin-like domain of thrombomodulin ameliorates diabetic glomerulopathy via complement inhibition. *Thromb. Haemost.* 2012; 108: 1141–1153.
- [36] Pickup J.C., Mattock M.B., Chusney G.D., Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* 1997; 40: 1286–1292.
- [37] Navarro-Gonzalez J.F., Mora-Fernandez C., Muros de Fuentes M., Garcia-Perez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* 2011; 7: 327–340.
- [38] Thomson S.C., Deng A., Bao D., Satriano J., Blantz R.C., Vallon V. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 217–224.
- [39] Dalla Vestra M., Mussap M., Gallina P., Bruseghin M., Cernigoi A.M., Saller A., et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16 Suppl 1: S78–82.

- [40] Rinno T., Kuramoto T., Iijima M., Yagame Y. Measurement of soluble thrombomodulin in sera from various clinical stages of diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* 1996; 10: 119–124.
- [41] Shimano H., Takahashi K., Kawakami M., Gotoda T., Harada K., Shimada M., et al. Elevated serum and urinary thrombomodulin levels in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* 1994; 225: 89–96.
- [42] Yang S., Ka S., Wu H., Yeh Y., Kuo C., Hua K., et al. Thrombomodulin domain 1 ameliorates diabetic nephropathy in mice via anti-NF- κ B / NLRP3 inflammasome-mediated inflammation, enhancement of NRF2 antioxidant activity and inhibition of apoptosis. *Diabetologia.* 2014; 57: 424–434.
- [43] Shi C.S., Shi G.Y., Hsiao H.M., Kao Y.C., Kuo K.L., Ma C.Y., et al. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood.* 2008; 112: 3661–3670.
- [44] Conway E.M., Van de Wouwer M., Pollefeyt S., Jurk K., Van Aken H., De Vriese A., et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappa β and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 565–577.
- [45] Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I., Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann. Clin. Biochem.* 2005; 42: 99–104.

- [46] Yilmaz G., Yilmaz F.M., Aral Y., Yucel D. Levels of serum sialic acid and thiobarbituric acid reactive substances in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Lab. Anal.* 2007; 21: 260–264.
- [47] Afshari A.T., Shirpoor A., Farshid A., Saadatian R., Rasmi Y., Saboory E., et al. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats, *Food Chem.* 2007; 101: 148–153.
- [48] Medina-Navarro R., Corona-Candelas I., Barajas-Gonzalez S., Diaz-Flores M., Duran-Reyes G., Albumin antioxidant response to stress in diabetic nephropathy progression. *PLoS One.* 2014; 9: e106490.
- [49] Medina-Navarro R., Duran-Reyes G., Diaz-Flores M., Vilar-Rojas C. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function., *PLoS One.* 2010; 5: e8971.

Table 1. Clinical and laboratory variables in control and diabetic groups

	Control group	Type 1 diabetics		P value
		1A UAE < 300 mg/g	2A UAE ≥ 300 mg/g	
Subjects (n, %)	35 (21,9)	93 (58,1)	32 (20,0)	
Age (years)	32,80 ± 8,63	33,61 ± 9,70	33,94 ± 10,37	0,671 ^a 0,630 ^b 0,869 ^c
Gender; male (n, %)	12 (21,1)	31 (54,4)	14 (24,6)	0,559
BMI (kg/m ²)	24,1 (5,0)	24,5 (4,9)	22,0 (3,4)	0,653 ^a 0,025 ^b 0,025 ^c
Retinopathy (n, %)	-	61 (87,1)	09 (12,9)	< 0,001*
Neuropathy (n, %)	-	79 (75,2)	26 (24,8)	0,063
Hypertension (n, %)	0 (0,0) ^{###}	55 (66,3) [#]	28 (33,7)	< 0,001*
Dyslipidemia (n, %)	0 (0,0) ^{###}	31 (63,3)	18 (36,7)	< 0,001*
Duration of diabetes (years)	-	18,88 ± 8,35	21,19 ± 7,18	0,166
Fasting glucose (mg/dL)	82,0 (08,0)	152,0 (142,0)	139,0 (207,0)	< 0,001* ^a < 0,001* ^b 0,968 ^c
Hb1Ac (%)	5,1 (0,4)	8,4 (1,8)	8,9 (3,2)	< 0,001* ^a < 0,001* ^b 0,100 ^c
Creatinine (mg/dL)	0,75 (0,19)	0,80 (0,31)	1,59 (1,16)	0,041 ^a < 0,001* ^b < 0,001* ^c
Urea (mg/dL)	26,0 (9,0)	30,0 (10,0)	52,0 (32,0)	0,002* ^a < 0,001* ^b < 0,001* ^c
Cystatin C (ng/mL)	754,93 (263,00)	770,0 (261,00)	1834,51 (1484,00)	< 0,139 ^a < 0,001* ^b < 0,001* ^c
Albuminuria (mg/g Cr)	1,90 (3,40)	13,8 (44,15)	1274,7 (3620,6)	< 0,001* ^a < 0,001* ^b < 0,001* ^c
eGFR (mL/min/1,73m ²)	108,4 ± 12,3	100,8 ± 29,8	56,9 ± 36,5	0,150 ^a < 0,001* ^b < 0,001* ^c

Normally-distributed data were expressed as mean ± SD and compared by ANOVA and T test. Not normally distributed data were expressed as median (range) and compared by the Kruskal-Wallis H test with Bonferroni correction and Mann-Whitney U test, followed by Bonferroni correction. Categorical variables were expressed as frequencies n (%) and compared using the chi-square test (χ^2). *Significant. Adjusted residue: # more frequente; ### less frequent.

^a control group *versus* group 1A

^b control group *versus* group 2A

^c group 1A *versus* group 2A

Table 2. Plasma and urine cytokines levels in control and diabetic groups.

	Control group	Type 1 diabetics		P value
		1A UAE < 300 mg/g Cr	2A UAE ≥ 300 mg/g Cr	
Plasma TNF-α (pg/mL)	5,98 (6,31)	5,05 (5,95)	7,36 (3,91)	0,617 ^a 0,017 ^{*b} 0,032 ^c
Urine TNF-α (pg/g Cr)	0,16 (0,25)	0,24 (0,29)	0,56 (0,65)	0,703 ^a 0,001 ^{*b} < 0,001 ^{*c}
Ratio TNF-α (plasma/urine)	17,36 (41,06)	19,39 (34,21)	11,96 (12,75)	0,698 ^a 0,170 ^b 0,028 ^c
Plasma IL-6 (pg/mL)	1,80 (4,15)	1,48 (1,87)	1,71 (3,20)	0,266 ^a 0,903 ^b 0,210 ^c
Urine IL-6 (pg/g Cr)	0,015 (0,01)	0,017 (0,02)	0,031 (0,08)	0,330 ^a 0,006 ^{*b} 0,028 ^c
Ratio IL-6 (plasma/urine)	228,3 (736,7)	88,0 (186,8)	37,8 (208,8)	0,045 ^a 0,010 ^{*b} 0,166 ^c
Plasma IL-10 (pg/mL)	7,93 (2,01)	6,76 (4,01)	6,81 (2,85)	0,244 ^a 0,174 ^b 0,964 ^c
Urine IL-10 (pg/g Cr)	0,16 (4,89)	1,83 (8,65)	14,69 (24,76)	0,057 ^a 0,010 ^{*b} 0,005 ^{*c}
Ratio IL-10 (plasma/urine)	44,30 (71,13)	7,57 (72,40)	0,43 (5,58)	0,055 ^a < 0,001 ^{*b} 0,017 ^{*c}

Not normally distributed data were expressed as median (range) and compared by the Kruskal-Wallis H test and Mann-Whitney U test, followed by Bonferroni correction. *Significant.

^a control group *versus* group 1A

^b control group *versus* group 2A

^c group 1A *versus* group 2A

Table 3. Oxidative stress and endothelial damage markers in control and diabetic groups.

	Control group	Type 1 diabetics		p-value
		1A UAE < 300 mg/g Cr	2A UAE ≥ 300 mg/g Cr	
Thrombomodulin (pg/mL)	1,73 (1,60)	2,22 (8,25)	3,88 (3,41)	0,639 ^a 0,090 ^b 0,090 ^c
TBARS	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,218 ^a 0,766 ^b 0,401 ^c
MTT	0,22 (0,09)	0,29 (0,10)	0,27 (0,11)	< 0,001 ^a < 0,001 ^b 0,949 ^c

Normally-distributed data were expressed as mean ± SD and compared by ANOVA and T test. Not normally distributed data were expressed as median (range) and compared by the Kruskal-Wallis H test and Mann-Whitney U test, followed by Bonferroni correction. TBARS and MTT – arbitrary units. *Significant.

^a control group *versus* group 1A

^b control group *versus* group 2A

^c group 1A *versus* group 2A

Figure 1. Significant correlation between cytokines levels and other variables in diabetic group.

VARIABLE	Plasma TNF- α (pg/mL)	Urinary TNF- α (pg/g Cr)	Plasma IL-6 (pg/mL)	Urinary IL-10 (pg/g Cr)
Cystatin C (ng/dL)	r=0.346 P<0.001	r=0.434 P<0.001		
Creatinine (mg/dL)		r=0.281 P=0.007		
Urea (mg/dL)	r=0.271 P=0.003	r=0.379 P=0.007		
Albuminuria (mg/g Cr)	r=0.251 P=0.007	r=0.410 P<0.001	r=0.244 P=0.002	
eGFR (mL/min/1.72m ²)		r=-0.437 P<0.001		
HbA1c (%)			r=0.165 P=0.049	r=0.166 P=0.036
Fasting glucose (mg/dL)				r=0.216 P=0.006
Trombomodulin (pg/mL)				r=0.211 P=0.021
TBARS (arbitrary units)				r=0.192 P=0.015

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pacientes com DM1 foram caracterizados por níveis elevados de citocinas urinárias (TNF- α , IL-6 e IL-10). No entanto, apenas os níveis de TNF- α urinários foram independentemente associados com a presença de microalbuminúria, indicando que a sua produção intra-renal pode estar envolvida na patogênese e progressão da ND. Embora mais estudos longitudinais sejam necessários para elucidar o papel exato dessa citocina no DN, este achado sugere que a medição dos níveis de TNF-alfa urinário pode ser útil, para avaliar a progressão para nefropatia em pacientes com DM1.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados observados no presente trabalho abrem algumas perspectivas importantes, como:

- Realização de pesquisas semelhantes, em populações com os demais tipos de diabetes mellitus com finalidade de esclarecer se tais resultados são exclusivos da patogênese do DM1;
- Realização de pesquisas semelhantes, em outras populações cujo desfecho é a nefropatia e perda da função renal;
- Inclusão de demais citocinas e também de seus receptores solúveis e sua associação com a patogênese e progressão da ND;
- Realização de estudos *in vitro*, utilizando cultura de linhagens de células renais para o maior esclarecimento da síntese renal das citocinas;
- Avaliação do valor preditivo das citocinas estudadas para ND;
- Avaliação concomitante de marcadores inflamatórios e de risco cardiovascular (PCR-us) na população estudada;
- Realização de estudos longitudinais, com finalidade de acompanhar o comportamento dos níveis (plasmáticos e urinários) das citocinas com a evolução da nefropatia.

REFERÊNCIAS

- [1] ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69–82, 2014.
- [2] SALGADO, P. P. C. D. A. **Prevalência E Fatores Associados À Nefropatia Diabética Em Pacientes Com Diabetes Mellitus Tipo 1**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG. 2007.
- [3] LITHOVIUS, R.; HARJUTSALO, V.; FORSBLOM, C.; SARAHEIMO, M.; GROOP, P. H. The consequences of failure to achieve targets of guidelines for prevention and treatment of diabetic complications in patients with type 1 diabetes. **Acta Diabetologica**, v. 52, n. 1, p. 31–38, 2015.
- [4] BARNETT, A. Prevention of loss of renal function over time in patients with diabetic nephropathy. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 5 Suppl 1, p. S40–7, 2006.
- [5] MOU, S.; WANG, Q.; LIU, J.; et al. Prevalence of non-diabetic renal disease in patients with type 2 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 3, p. 354–359, 2010.
- [6] PYRAM, R.; KANSARA, A.; BANERJI, M. A.; LONEY-HUTCHINSON, L. Chronic kidney disease and diabetes. **Maturitas**, v. 71, n. 2, p. 94–103, 2012.
- [7] KIKKAWA, R.; KOYA, D.; HANEDA, M. Progression of diabetic nephropathy. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 41, n. 3 Suppl 1, p. S19–21, 2003.
- [8] RITZ, E.; RYCHLIK, I.; LOCATELLI, F.; HALIMI, S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 34, n. 5, p. 795–808, 1999.
- [9] WOLF, G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. **European journal of clinical investigation**, v. 34, n. 12, p. 785–796, 2004.
- [10] MARTINI, S.; EICHINGER, F.; NAIR, V.; KRETZLER, M. Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 9, n. 4, p. 267–274, 2008
- [11] BENZ, D.; CADET, P.; MANTIONE, K.; ZHU, W.; STEFANO, G. Tonal nitric oxide and health--a free radical and a scavenger of free radicals. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 8, n. 1, p. RA1–4, 2002.

- [12] BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.
- [13] DABHI, B.; MISTRY, K. N. Oxidative stress and its association with TNF-alpha-308 G/C and IL-1alpha-889 C/T gene polymorphisms in patients with diabetes and diabetic nephropathy. **Gene**, v. 562, n. 2, p. 197–202, 2015.
- [14] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes — 2015. **Diabetes Care**, v. 38, n. January, p. 59–67, 2015.
- [15] FERREIRA, S. R. G.; PITITTO, B. DE A. Aspectos epidemiológicos do Diabetes Mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade. In: **Sociedade Brasileira de Diabetes. Diabetes na prática clínica. E-book 2.0.**, 2015. Disponível em: <<http://ebook.diabetes.org.br/component/k2/item/73-capitulo-1-aspectos-epidemiologicos-do-diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade>>. Acesos em: 15 abril 2015.
- [16] GOMES, M. B.; LUCCHETTI, M. R.; GAZZOLA, H.; et al. Microalbuminuria and associated clinical features among Brazilians with insulin dependent diabetes mellitus. **Diabetes research and clinical practice**, v. 35, n. 2-3, p. 143–147, 1997.
- [17] FRADKIN, J. E.; WALLACE, J. A.; AKOLKAR, B.; RODGERS, G. P. Type 1 Diabetes—Reaping the Rewards of a Targeted Research Investment. **Diabetes**, v. 65, n. 2, p. 307–313, 2016.
- [18] KARVONEN, M.; VIK-KAJANDER, M.; MOLTCHANOVA, E.; et al. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. **Diabetes care**, v. 23, n. 10, p. 1516–1526, 2000.
- [19] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chapter 1: Burden : mortality , morbidity and risk factors. **Global Status Report on non-communicable diseases 2010**, p. 9–31, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_chapter1.pdf>. Acesso em: 15 abril 2015.
- [20] LLOYD, A.; KOMENDA, P. Optimizing Care for Canadians with Diabetic Nephropathy in 2015. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, n. 3, p. 221–228, 2015.
- [21] SIVIERO, P.; MACHADO, C. J.; RODRIGUES, R. N. DOENÇA RENAL CRÔNICA : UM AGRAVO DE PROPORÇÕES CRESCENTES NA POPULAÇÃO BRASILEIRA. , 2013.
- [22] CARAMORI, M. L.; FIORETTO, P.; MAUER, M. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: an indicator of more advanced glomerular lesions. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 1036–1040, 2003.

- [23] MCFARLANE, P. A. Testing for Albuminuria in 2014. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 38, n. 5, p. 372–375, 2014.
- [24] KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, n. 1, p. 4–4, 2013. Disponível em: <[http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO CKD-MBD GL KI Suppl 113.pdf](http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_CKD-MBD_GL_KI_Suppl_113.pdf)><<http://www.nature.com/doi/10.1038/kisup.2012.73>><<http://www.nature.com/doi/10.1038/kisup.2012.76>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- [25] MARSHALL, S. M. Natural history and clinical characteristics of CKD in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 21, n. 3, p. 267–272, 2014.
- [26] AHMAD, J. Management of diabetic nephropathy: Recent progress and future perspective. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, p. 343–358, 2015.
- [27] FARIA, J. B. LOPES DE. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 23, n. 2, p. 121–129, 2001. Disponível em:
- [28] ICHINOSE, K.; KAWASAKI, E.; EGUCHI, K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. **American journal of nephrology**, v. 27, n. 6, p. 554–564, 2007.
- [29] BLANTZ, R. C.; SINGH, P. Glomerular and tubular function in the diabetic kidney. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 21, n. 3, p. 297–303, 2014.
- [30] NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 19, n. 3, p. 433–442, 2008.
- [31] NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C.; MUROS DE FUENTES, M.; GARCIA-PEREZ, J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature reviews. Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327–340, 2011.
- [32] NAJAFIAN, B.; MAUER, M. Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 83, n. 1, p. 1–8, 2009.
- [33] MORESCO, R. N.; SANGOI, M. B.; CARVALHO, J. A. M. DE; TATSCH, E.; BOCHI, G. V. Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 17–30, 2013.

- [34] MUTHUPPALANIAPPAN, V. M.; SHEAFF, M.; YAQOUB, M. M. Diabetic nephropathy. **Medicine**, v. 43, n. 9, p. 520–525, 2015.
- [35] KARALLIEDDE, J.; GNUDI, L. Endothelial factors and diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, v. 34, n. SUPPL. 2, p. 291–296, 2011.
- [36] HAR, R.; SCHOLEY, J. W.; DANEMAN, D.; et al. The effect of renal hyperfiltration on urinary inflammatory cytokines/chemokines in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 1166–1173, 2013.
- [37] YAMAGISHI, S.; INAGAKI, Y.; OKAMOTO, T.; et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20309–20315, 2002.
- [38] ROY, M. S.; JANAL, M. N.; CROSBY, J.; DONNELLY, R. Markers of endothelial dysfunction and inflammation predict progression of diabetic nephropathy in African Americans with type 1 diabetes. **Kidney international**, v. 87, n. 2, p. 427–433, 2015.
- [39] MACISAAC, R. J.; EKINCI, E. I.; JERUMS, G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 2 SUPPL.2, p. S39–S62, 2014.
- [40] CHERNEY, D. Z. I.; SCHOLEY, J. W.; DANEMAN, D.; et al. Urinary markers of renal inflammation in adolescents with Type 1 diabetes mellitus and normoalbuminuria. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 10, p. 1297–302, 2012.
- [41] ALEXANDRAKI, K.; PIPERI, C.; KALOFOUTIS, C.; et al. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1084, p. 89–117, 2006.
- [42] HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 15 Suppl 3, p. 39–50, 2013
- [43] WADA, J.; MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clinical science**, v. 124, n. 3, p. 139–52, 2013
- [44] GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores: Característica e funções fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. SUPPL.4, p. 967–976, 2011
- [45] PENG, X.; XU, J.; WANG, P.; ZHOU, J.; GUO, H. Interleukin-10-1082A/G polymorphism and diabetic nephropathy: a meta-analysis. **Medical science**

monitor : international medical journal of experimental and clinical research, v. 21, p. 890–894, 2015.

- [46] ABOUZEID, S.; SHERIF, N. Role of alteration in Treg/Th17 cells' balance in nephropathic patients with Type 2 diabetes mellitus. **Electronic physician**, v. 7, n. 8, p. 1613–1618, 2015.
- [47] CHOUDHARY, N.; AHLAWAT, R. S. Interleukin-6 and C-reactive protein in pathogenesis of diabetic nephropathy: new evidence linking inflammation, glycemic control, and microalbuminuria. **Iranian journal of kidney diseases**, v. 2, n. 2, p. 72–79, 2008.
- [48] KALANTARINIA, K.; AWAD, A. S.; SIRAGY, H. M. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- α increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. **Kidney International**, v. 64, n. 4, p. 1208–1213, 2003.
- [49] CARLSSON, A. C.; LARSSON, T. E.; HELMERSSON-KARLQVIST, J.; et al. Soluble TNF receptors and kidney dysfunction in the elderly. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 25, n. 6, p. 1313–20, 2014.
- [50] MARTINS, A. F. **Avaliação de marcadores de inflamação em pacientes com lesão renal aguda em unidade de terapia intensiva**. 2008. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Nefrologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.
- [51] NIEWCZAS, M. A.; FICOCIELLO, L. H.; JOHNSON, A. C.; et al. Serum concentrations of markers of TNF α and Fas-mediated pathways and renal function in nonproteinuric patients with type 1 diabetes. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 62–70, 2009
- [52] LOPES-VIRELLA, M. F.; BAKER, N. L.; HUNT, K. J.; et al. Baseline markers of inflammation are associated with progression to macroalbuminuria in type 1 diabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 36, n. 8, p. 2317–2323, 2013.
- [53] TIMAR, R.; TIMAR, B.; DEGERATU, D.; SERAFINCEANU, C.; OANCEA, C. Metabolic syndrome, adiponectin and proinflammatory status in patients with type 1 diabetes mellitus. **The Journal of international medical research**, v. 42, n. 5, p. 1131–8, 2014
- [54] BOUTZIOS, G.; KALTSAS, G. **Immune System Effects on the Endocrine System**. In: L. J. De Groot; P. Beck-Peccoz; G. Chrousos; et al. (Eds.); , 2000. South Dartmouth (MA).
- [55] ELMARAKBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 49–59, 2012.

- [56] SCHRAM, M. T.; CHATURVEDI, N.; SCHALKWIJK, C. G.; FULLER, J. H.; STEHOUSER, C. D. A. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. **Diabetologia**, v. 48, n. 2, p. 370–378, 2005. G
- [57] ZOPPINI, G.; FACCINI, G.; MUGGEO, M.; et al. Elevated plasma levels of soluble receptors of TNF-alpha and their association with smoking and microvascular complications in young adults with type 1 diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3805–3808, 2001.
- [58] LAMPROPOULOU, I.-T.; STANGO, M.; PAPAGIANNI, A.; et al. TNF-alpha and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of diabetes research**, v. 2014, p. 394206, 2014.
- [59] NAVARRO, J. F.; MORA, C.; GOMEZ, M.; et al. Influence of renal involvement on peripheral blood mononuclear cell expression behaviour of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in type 2 diabetic patients. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 23, n. 3, p. 919–926, 2008.
- [60] MORIWAKI, Y.; YAMAMOTO, T.; SHIBUTANI, Y.; et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 52, n. 5, p. 605–608, 2003.
- [61] WOLF, J.; ROSE-JOHN, S.; GARBERS, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. **Cytokine**, v. 70, n. 1, p. 11–20, 2014.
- [62] KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 149, p. 1–38, 2003.
- [63] KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S114–24, 2005.
- [64] SCHELLER, J.; OHNESORGE, N.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. **Scandinavian journal of immunology**, v. 63, n. 5, p. 321–329, 2006.
- [65] SVENSSON, M. K.; ERIKSSON, J. W. Change in the amount of body fat and IL-6 levels is related to altered insulin sensitivity in type 1 diabetes patients with or without diabetic nephropathy. **Hormone and metabolic research**, v. 43, n. 3, p. 209–215, 2011.
- [66] THOMSON, S. C.; DENG, A.; BAO, D.; et al. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 2, p. 217–224, 2001.

- [67] FAWAZ, L.; ELWAN, A. E.; KAMEL, Y. H.; et al. Value of C-reactive protein and IL-6 measurements in type 1 diabetes mellitus. **Archives of Medical Science**, v. 5, n. 3, p. 383–390, 2009.
- [68] MOHAMED-ALI, V.; GOODRICK, S.; RAWESH, A.; et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4196–4200, 1997.
- [69] BASTARD, J. P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 1, p. 4–12, 2006.
- [70] MEZZANO, S.; AROS, C.; DROGUETT, A.; et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 19, n. 10, p. 2505–2512, 2004.
- [71] WOLKOW, P. P.; NIEWCZAS, M. A.; PERKINS, B.; et al. Association of urinary inflammatory markers and renal decline in microalbuminuric type 1 diabetics. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 19, n. 4, p. 789–797, 2008.
- [72] D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 3, p. 1041–1048, 1993.
- [73] MTIRAOU, N.; EZZIDI, I.; MOHAMED, M. B. H.; et al. Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, , n. 30, p. 96–102, 2014.
- [74] RAFIQ, K.; CHARITIDOU, L.; BULLENS, D. M.; et al. Regulation of the IL-10 production by human T cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 53, n. 2, p. 139–147, 2001.
- [75] SINUANI, I.; BEBERASHVILI, I.; AVERBUKH, Z.; SANDBANK, J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. **World journal of transplantation**, v. 3, n. 4, p. 91–98, 2013.
- [76] COVE-SMITH, A.; HENDRY, B. M. The regulation of mesangial cell proliferation. **Nephron. Experimental nephrology**, v. 108, n. 4, p. e74–9, 2008.
- [77] STOCKAND, J. D.; SANSOM, S. C. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 723–744, 1998.

- [78] MYSLIWSKA, J.; ZORENA, K.; SEMETKOWSKA-JURKIEWICZ, E.; et al. High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. **European cytokine network**, v. 16, n. 2, p. 117–122, 2005.
- [79] WONG, C. K.; HO, A. W. Y.; TONG, P. C. Y.; et al. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Clinical and experimental immunology**, v. 149, n. 1, p. 123–131, 2007.
- [80] HELLEMONS, M. E.; KERSCHBAUM, J.; BAKKER, S. J. L.; et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with Type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 29, n. 5, p. 567–577, 2012.
- [81] NASSER, M. **Valor preditivo da trombomodulina sérica em isquemia crítica de membros inferiores.** , 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- [82] BOEHME, M. W. J.; STREMMEL, W. Comparison of three commercially available thrombomodulin ELISA kits. **Journal of Immunological Methods**, v. 286, n. 1-2, p. 231–240, 2004.
- [83] WEILER, H.; ISERMANN, B. H. Thrombomodulin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 24, n. 2, p. 285–305, 2003.
- [84] UEHARA, S.; GOTOH, K.; HANDA, H. Separation and characterization of the molecular species of thrombomodulin in the plasma of diabetic patients. **Thrombosis research**, v. 104, n. 5, p. 325–332, 2001.
- [85] GILBERT, R. E.; MARSDEN, P. A. Activated protein C and diabetic nephropathy. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 15, p. 1628, 2008.
- [86] BOVERIS, A.; VALDEZ, L. B.; ZAOBORNYY, T.; BUSTAMANTE, J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 535–542, 2006.
- [87] LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY, Maria-Luiza; FERNÁNDEZ-MEJÍA, Cristina. Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. In: José A. Morales-González (editor). **Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants.** Intech, 2013.
- [88] REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 7, p. 1096–105, 2008.

- [89] YAMAGISHI, S.; MAEDA, S.; MATSUI, T.; et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 5, p. 663–671, 2012.
- [90] ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 9, p. 2709–2729, 2014.
- [91] PANENI, F.; BECKMAN, J. A.; CREAGER, M. A.; COSENTINO, F. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part i. **European Heart Journal**, v. 34, n. 31, p. 2436–2446, 2013.
- [92] VANDERJAGT, D. J.; HARRISON, J. M.; RATLIFF, D. M.; HUNSAKER, L. A.; Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. **Clinical biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 265–270, 2001.
- [93] REIS, J. S. **Diabetes Tipo 1: Estudo da associação entre o balanço oxidante/antioxidante com parâmetros clínicos e bioquímicos**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina/Endocrinologia) – Programa de Pós-Graduação da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte – Minas Gerais. 2006.
- [94] MEDINA, L. O.; VELOSO, C. A.; ABREU BORGES, E. DE; et al. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes research and clinical practice**, v. 77, n. 2, p. 193–197, 2007.
- [95] SEGHROUCHNI, I.; DRAI, J.; BANNIER, E.; et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clinica chimica acta**, v. 321, n. 1-2, p. 89–96, 2002.
- [96] SAFAR, M. M.; ABDELSALAM, R. M. H₂S donors attenuate diabetic nephropathy in rats: Modulation of oxidant status and polyol pathway. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 1, p. 17–23, 2015.

APÊNDICE A – Comprovante de submissão do artigo em periódico científico

IMRE-D-16-00046 - Submission Notification to co-author



Immunologic Research (IMRE)

Para: Rodrigo M Pestana <rodrigomcpestana@hotmail.com>;

Responder | v

dom 14/02/2016 12:24

Re: "CYTOKINES PROFILE AND ITS CORRELATION WITH ENDOTHELIAL DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS AND NEPHROPATHY"

Full author list: Rodrigo M Pestana; Caroline P Domingueti; Rita C Duarte; Rodrigo B Fóscolo; Janice S Reis; Ana Maria S Rodrigues; Lais B Martins; Lirlândia P Sousa; Daniela P Lage; Cláudia N Ferreira; Adaliene V Ferreira; Ana P Fernandes; Karina Gomes

Dear Dr Pestana,

We have received the submission entitled: "CYTOKINES PROFILE AND ITS CORRELATION WITH ENDOTHELIAL DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS AND NEPHROPATHY" for possible publication in Immunologic Research, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. Karina Gomes who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Immunologic Research

APÊNDICE B – Parecer de Comitê de Ética da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE - 0392.0.203.000-11

Interessado(a): Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de setembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof.ª Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

APÊNDICE C – Parecer comitê de ética da Santa Casa de Belo Horizonte



Registro CEP: 006/2012 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto).

Belo Horizonte, 30 de março de 2012.

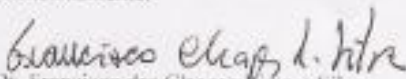
Para: Sra.
Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Pesquisadora Responsável

Informamos-lhe que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 30 de março de 2012, analisou e **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado: "Estudo de enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose.", registrado neste CEP sob número 006/2012, no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

OBS:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).

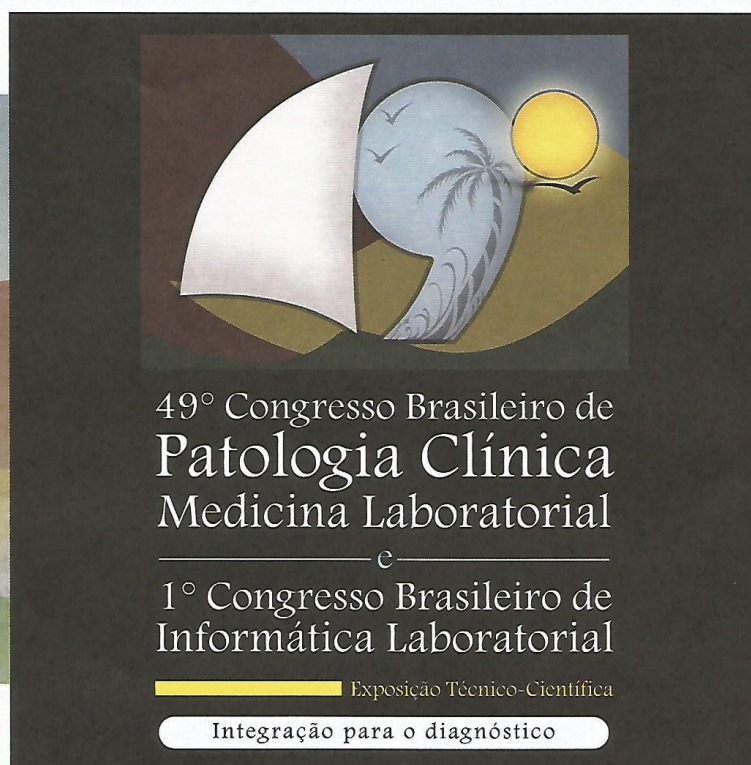
Atenciosamente:


Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva
Coordenador do CEP

APÊNDICE D – Comprovantes de participação em evento científico

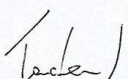
certificado de participação

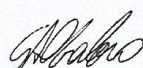
RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

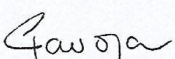


participou

na qualidade de autor responsável do tema livre selecionado para apresentação oral "**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF-ALFA: HÁ RELAÇÃO COM A NEFROPATIA DIABÉTICA?**", tendo como co-autores "DOMINGUETI, C. P., FERNANDES, A. P., FERREIRA, A. V., BORGES, K. B. G."


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


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


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

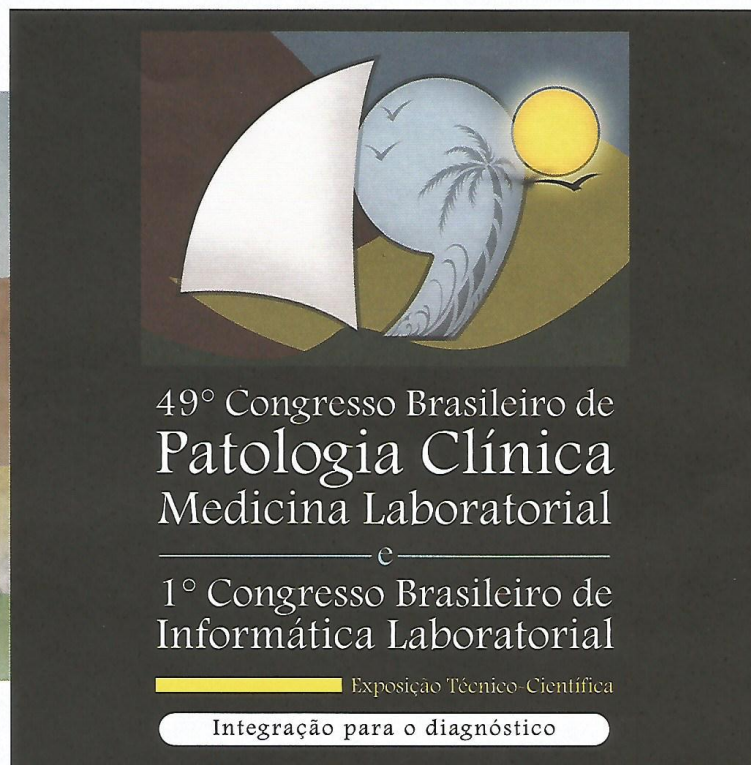
29 de setembro a 2 de outubro de 2015
Fortaleza - CE - centro de Eventos do Ceará

Realização



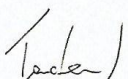
certificado de participação

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

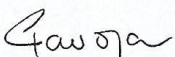


participou

na qualidade de autor responsável do tema livre "**NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF-ALFA: HÁ RELAÇÃO COM A NEFROPATIA DIABÉTICA?**", tendo como co-autores "DOMINGUETI, C. P., FERNANDES, A. P., FERREIRA, A. V., BORGES, K. B. G.".


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


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


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

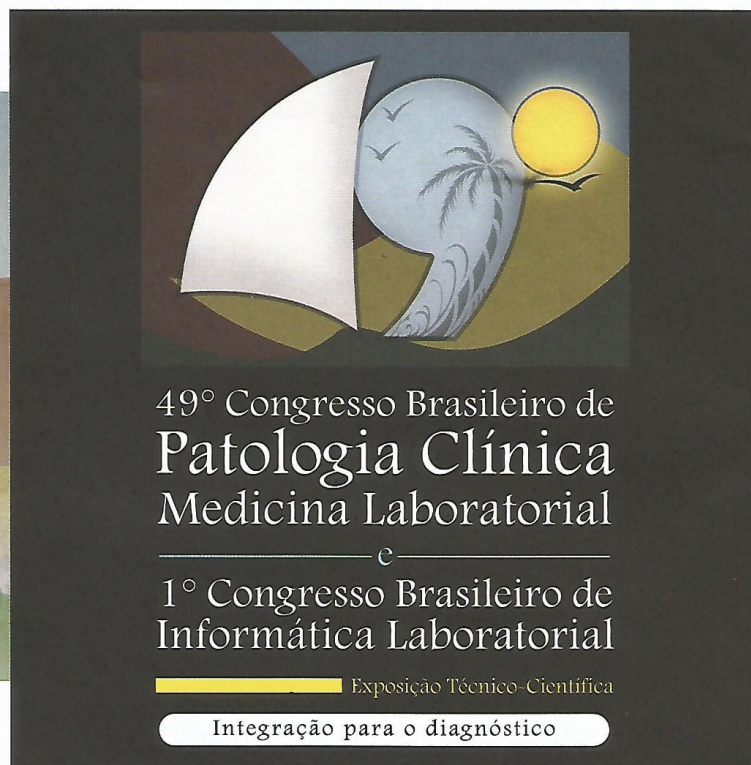
29 de setembro a **2** de outubro de **2015**
Fortaleza - CE - centro de Eventos do Ceará

Realização



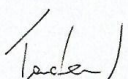
certificado de participação

RODRIGO MENDONÇA CARDOSO PESTANA

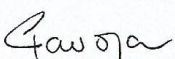


participou

na qualidade de autor responsável do tema livre "**NÍVEIS URINÁRIOS DE INTERLEUCINA-6 E SUA RELAÇÃO COM A NEFROPATIA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**", tendo como co-autores "DOMINGUETI, C. P., FERNANDES, A. P., FERREIRA, A. V., BORGES, K. B. G."


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


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


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

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

Realização



APÊNDICE E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PROJETO DE PESQUISA: “Estudo da enzima ADAMTS13 e de
outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes
diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e
aterosclerose”

Prezado (a) Sr.(a),

Este projeto tem por objetivo estudar a coagulação do sangue, os processos inflamatórios e as doenças renais que podem ocorrer nos pacientes diabéticos. Para obter a conclusão da pesquisa, será necessário comparar os resultados dos exames dos pacientes com diabetes que possuem problemas renais com os resultados de pacientes com diabetes que não possuem problemas renais e de indivíduos não diabéticos (grupos controles).

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta.

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário, sem custo algum pelos exames realizados. Se você quiser participar poderá fazê-lo doando 10 mL de seu sangue e uma amostra da sua urina para o uso nesta pesquisa, sendo este material armazenado em condições adequadas para pesquisas. Se você não quiser participar, não haverá qualquer problema e se você fizer parte do grupo de pacientes, não haverá alteração no seu tratamento e

assistência recebida pelo seu médico caso você não aceite participar do estudo. As amostras coletadas serão utilizadas para a realização de alguns exames de laboratório com o objetivo de estudar os problemas circulatórios e renais que podem ocorrer nos pacientes diabéticos.

Seu nome será mantido em segredo, não sendo divulgado em nenhuma hipótese.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

De acordo: _____

(Assinatura)

Nome: _____

Data: ___/___/_____

Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo, por favor, entre em contato com a Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes da Faculdade de Farmácia / UFMG no telefone 3409-6884 ou com a farmacêutica Caroline Pereira Domingueti no telefone 3409-6902.

Desde já agradecemos sua valiosa participação.

Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Caroline Pereira Domingueti

Data: ___/___/_____

Santa Casa de Misericórdia – Av. Francisco Sales, 1111,

Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG – Brasil – Cep 30.150.221 – Telefone

31 3238-8100

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade

Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG

– Brasil. Telefax 31 3409-4592. coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICE F – Ficha clínica

FICHA CLÍNICA

Projeto: “**Estudo da enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose.**”

Número de identificação: _____ Número do prontuário: _____

Data da coleta: _____

1. Identificação

Nome: _____

Nascimento: _____ Sexo: M__ F__ Naturalidade: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Tel: _____ Cel: _____

2. Dados clínicos

Peso (kg): _____ Altura (m): _____ IMC (kg/m²): _____

Circunferência abdominal (cm): _____

Pressão sanguínea (mmHg): _____

Espessura íntimo-medial das artérias carótidas (mm): _____

Data do diagnóstico do diabetes: _____

História familiar: () sim () não

Patologias Associadas: _____

Medicamentos em Uso: _____

Complicações do diabetes: _____
