

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Edgar Eduardo Ilaquita Flores*

Inibição combinada do receptor AT1 e produtos finais de glicação avançada na nefropatia diabética

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Anissa Daliry

Rio de Janeiro

2021

Ilaquita Flores, Edgar Eduardo.

Inibição combinada do receptor AT1 e produtos finais de glicação avançada na nefropatia diabética / Edgar Eduardo Ilaquita Flores. - Rio de Janeiro, 2021.

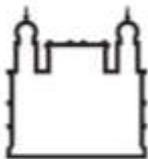
xiii, 73f. f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientadora: Anissa Daliry.

Bibliografia: f. 53-72

1. Nefropatia. 2. Diabetes. 3. AGEs. 4. AT1. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Edgar Eduardo Ilaquita Flores*

Inibição combinada do receptor AT1 e produtos finais de glicação avançada na nefropatia diabética

**Aprovada em: 13/05/2021**

### **EXAMINADORES:**

Prof. Dr<sup>a</sup> Adriana Ribeiro Silva - Fundação Oswaldo Cruz **Presidente**

Prof. Dr<sup>a</sup> Sandra Barbosa da Silva - Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Prof. Dr<sup>a</sup> Caroline Fernandes dos Santos Bottino - Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr<sup>a</sup> Andressa Bernardi - Fundação Oswaldo Cruz - Suplente

Prof. Dr<sup>a</sup> Dayane Teixeira Ognibene - Universidade Estadual do Rio de Janeiro - Suplente

Rio de Janeiro, 13 de Maio de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

Muitos foram os que me apoiaram na realização deste projeto, proporcionando-me condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho até sua conclusão. A todos meus agradecimentos, em especial:

A Deus, pela minha existência e por protegem e guiar-me durante toda a minha vida.

A meus pais Francisco e Marcela, pela vida, carinho e amor

A Profa. Dra. Anissa Daliry minha orientadora por ter me acolhido como aluno com todo carinho, paciência e pelo suporte em todas as etapas desta pesquisa.

As amigas do Laboratório de Investigação Cardiovascular da Fiocruz, Evelyn Nunes, Raquel Rangel Silveiras, Karine Lino, Beatriz Pires e Carolina Machado pelo apoio, pela amizade e também pelos momentos de descontração e por sempre esclarecer minhas dúvidas. Muito obrigada por tudo.

As amigas do Laboratório de Inflamação da Fiocruz, Natalia Ribeiro e Carol pela amizade e pelo apoio.

## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é um grande problema de saúde pública, que afeta cerca de 463 milhões de pessoas no mundo e pode alcançar 700 milhões de pessoas até 2045. A nefropatia é uma das complicações microvasculares do diabetes e a maior causa de insuficiência renal. Uma vez que a ativação do receptor AT1 pela angiotensina II causa vasoconstrição da artéria aferente, e que o acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) causam glicotoxicidade intracelular de células mesangiais, podocitárias e tubulares, foi avaliado se o tratamento combinado de olmersatana (OLM) e piridoxamina (PYR) é capaz de melhorar a nefropatia diabética quando comparado aos tratamentos isolados. Para isto, o diabetes mellitus experimental foi induzido em 50 camundongos C57BL/6 pela administração de estreptozotocina (50 mg/kg/dia via intraperitoneal por 5 dias). Os animais foram divididos em cinco grupos: controle, diabéticos, diabéticos tratados com OLM (20 mg/Kg/dia), diabéticos tratados com PYR (400 mg/Kg/dia) e diabéticos tratados com OLM e PYR (20 mg/Kg/dia e 400 mg/Kg/dia, respectivamente) Os tratamento durou 16 semanas. Como resultado, os camundongos que receberam STZ desenvolveram hiperglicemia e doença renal, diminuição de peso, poliúria, polidipsia, polifagia, e albuminúria, além de aumento de frutossamina, ferro, uréia e fosfatase alcalina na urina, diminuição da atividade de catalase no rim e aumento de excreção dos AGEs na urina. Histologicamente, houve aumento de área glomerular e do espaço de Bowman. O tratamento com OLM atenuou a albuminúria e atenuou o declínio da função renal, uma vez que o OLM melhorou a polidipsia, polifagia, poliúria, marcadores bioquímicos de disfunção renal e parâmetros histológicos, apesar de não apresentar ação sobre a fosfatase alcalina, uréia, ferro, frutossamina e ácido úrico. O tratamento isolado com PYR melhorou a maioria dos parâmetros alterados pela doença, entre eles a ingestão alimentar, ingestão hídrica, volume urinário, creatinina sérica, excreção de albumina na urina, ACR, AGEs no tecido renal e urina, ureia na urina e todos os parâmetros morfológicos analisados, contudo sem efeito sobre a fosfatase alcalina, ferro, frutossamina e ácido úrico. O tratamento combinado (PYR e OLM) melhorou a polifagia, polidipsia e poliúria comparado aos animais diabéticos sem tratamento, entretanto não houve diferença comparado a cada tratamento isolado. Os parâmetros histológicos e bioquímicos (creatinina no soro, albumina na urina, ACR e uréia) também apresentaram melhorara em relação aos animais diabéticos sem tratamento, mas não em relação aos animais em tratamento isolado. Tanto PYR quanto OLM não influenciaram a excreção de AGEs na urina. Esses dados nos levam a concluir que o tratamento combinado não ofereceu efeitos benéficos adicionais quando comparado aos tratamentos isolados, e que o tratamento que mais ofereceu benefícios foi o tratamento isolado com PYR nos parâmetros metabólicos, morfológicos e de função renal

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a major public health problem, affecting about 463 million people worldwide and can reach 700 million people by 2045. Nephropathy is one of the microvascular complications of diabetes and the major cause of kidney failure. Since activation of AT1 by angiotensin II causes vasoconstriction of the afferent artery, impairing renal hemodynamics, and the accumulation of advanced glycation end products (AGEs) cause intracellular glycototoxicity of mesangial, podocyte and tubular cells, it was assessed whether the treatment combination of olmesartan (OLM) and pyridoxamine (PYR) was able to confer superior improvement in diabetic nephropathy parameters when compared to isolated treatments. Experimental diabetes was induced in 50 C57BL/6 mice by the administration of streptozotocin (intraperitoneal route, 50 mg/kg/day, 5 days). The animals were divided into five groups: control, diabetics, diabetics treated with OLM (20 mg/Kg/day), diabetics treated with PYR (400 mg/Kg/day) and diabetics treated with OLM and PYR. (20 mg/Kg/day e 400 mg/Kg/day). The animals were treated for 16 weeks. The results of the present study showed that C57BL/6 mice that received STZ administration developed a model of diabetes with kidney disease, with hyperglycemia, weight loss, polyuria, polydipsia, polyphagia, and albuminuria, in addition to an increase in fructosamine, iron, urea and alkaline phosphatase in the urine, in addition to decreased catalase activity in the kidney, and a significant increase in the excretion of AGEs in the urine. Histologically, we demonstrated that there was an increase in the glomerular area and Bowman's space. Treatment with OLM attenuated albuminuria and decreased the decline in renal function, since treatment with OLM offered an improvement in polydipsia, polyphagia, polyuria, biochemical markers of renal dysfunction, as well as in Bowman's space area, however there was no change in other parameters including alkaline phosphatase, urea, iron, fructosamine and uric acid. Regarding the isolated effect of PYR, we observed that there was a significant improvement in most parameters altered by the disease, including food intake, water intake, urinary volume, serum creatinine, excretion of albumin in the urine, ACR, AGEs in the renal tissue, AGEs in the urine, urea in the urine, and in all morphological parameters. However, there was no change in the levels of alkaline phosphatase, iron, fructosamine and uric acid in the group treated with PYR. Regarding the treatment with PYR and OLM, we showed that there was improvement in polyphagia, polydipsia and polyuria, when compared with diabetic animals without treatment, however there was no difference when compared with the isolated treatments. Histological and biochemical parameters such as serum creatinine, urine albumin, ACR and urea also improved in relation to diabetic animals, but not in relation to isolated treatments. PYR and OLM did not influence the excretion of AGEs in the urine. These data lead us to conclude that the combined treatment did not offer additional beneficial effects when compared to the isolated treatments, and that the treatment that offered the most benefits was the isolated treatment with PYR, in metabolic parameters, renal and morphological function.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA.....	Associação Americana de Diabetes
ADH .....	Hormônio antidiurético
ACE .....	Enzima conversora de angiotensina
ACR .....	Relação albumina/creatinina
AGEs.....	Produtos finais de glicação avançada
AGT.....	Angiotensinogênio
Ang II.....	Angiotensina II
AKT .....	Proteína kinase B
AT1R .....	Receptores da angiotensina tipo 1
AT2R.....	Receptores da angiotensina tipo 2
BCC .....	Bloqueador do canal de cálcio
BHT .....	Hidroxitolueno butilado
BK .....	Bradicinina
BRAs .....	Bloqueadores dos receptores da angiotensina II
CE .....	Células endoteliais
CEL.....	Carboxietil-lisina
CML .....	Carboximetilisina
CTGF .....	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CXCL2 .....	Ligante 2 de quimiocina
CXCL9 .....	Ligante 9 de quimiocina
DAG.....	Diacilglicerol
DG .....	Diabetes gestacional
DHAP.....	Dihidroxiacetona derivado de frutose
DM .....	Diabetes mellitus
DM1.....	Diabetes mellitus do tipo 1
DM2.....	Diabetes mellitus do tipo 2
DPP-4 .....	Dipeptidil peptidase 4
DRC .....	Doença renal crônica
ECA .....	Enzima conversora de angiotensina
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENaC .....	Canais de sódio epiteliais
ET <sub>A</sub> .....	Receptor de endotelina tipo A

EROS..... Espécies reativas de oxigênio  
 FN3K ..... Frutosamina-3-quinase  
 G3P..... Gliceraldeído-3-fosfato  
 GFs..... Fatores de crescimento  
 GFTA ..... Glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase  
 GLUT-2 ..... Transportador de glicose do tipo 2  
 GLUT-4 ..... Transportador de glicose do tipo 4  
 GLUT-9 ..... Transportador de glicose do tipo 9  
 GLO1..... Glioxalase 1  
 GLO2 .....Glioxalase 2  
 GLO3 .....Glioxalase 3  
 GMPc ..... Monofosfato cíclico de guanossina  
 GPCRs..... Receptores acoplados à proteína G  
 GPx..... Glutaciona peroxidase  
 GSH ..... Glutaciona  
 HbA1c..... Hemoglobina glicosilada  
 Hb2..... Haptoglobina  
 iECA..... Inibidores da enzima conversora de angiotensina  
 ICAM ..... Molécula de adesão intercelular  
 IGF-1 ..... Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
 IL- 1 $\alpha$  ..... Interleucina 1alfa  
 IL- 6 ..... Interleucina 6  
 IL-1 $\beta$  ..... Interleucina 1beta  
 JAK2 ..... Ativação da janus quinase 2  
 MasR ..... Receptor Mas  
 MAPK ..... Proteína quinase ativada por mitogeno  
 MBG ..... Membrana baso-glomerular  
 MCP-1..... Proteína quimioatraente de monócito 1  
 MGO ..... Metilglioxal  
 MG-H1 ..... Hidroimidazolona-1 derivada de metilglioxal  
 mTOR1 ..... Alvo da rapamicina em mamíferos  
 MODY..... Início de diabetes na maturidades em jovens  
 NAD..... Dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo  
 NADPH..... Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ND .....	Nefropatia diabética
NDRD .....	Doença renal não diabética
NF-Kb .....	Fator nuclear kappa B
NMN.....	Mononucleotido de nicotinamida
NO .....	Oxido nítrico
Nrf2 .....	Fator nuclear relacionado ao eritroide 2
OGT .....	O-GlcNAc transferase
OMS .....	Organização mundial de saúde
PDGF .....	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTECs.....	Células epiteliais tubulares proximais
PM.....	Piridoxamina
PPAR- $\gamma$ .....	Proliferação peroxissomal do tipo gama
PKC.....	Proteína quinase C
RAGE .....	Receptor de AGEs
ROS.....	Espécies reativas de oxigênio
SGLT.....	Cotransportador de sódio e glicose
SIRT-1.....	Sirtuína 1
SOD.....	Superóxido dismutase dependente de magnésio
SRAA .....	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT3 .....	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
STZ .....	Streptozotocina
TBARS.....	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- $\beta$ .....	Fator de crescimento transformador- $\beta$
TFG .....	Taxa de filtração glomerular
TNF- $\alpha$ .....	Fator de necrose tumoral – $\alpha$
UA.....	Unidades arbitrárias
UDP-GlcNac.....	Difosfato de uridina N-acetil glucosamina
UFe .....	Ferro urinário
UKPDS .....	Prospectivo de Diabetes do Reino Unido
UPA .....	Unidades de perfusão arbitrária
URAT1.....	Transportadores de urato 1
UT-A1.....	Transportadoras de ureia
VCAM .....	Molécula de adesão de células vasculares
VEGF.....	Fator de crescimento endotelial vascular

VDR.....Receptores da vitamina D

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.1:** Heterogeneidade do diabetes.

**Figura 1.2:** Lesões patológicas na ND.

**Figura 1.3:** Formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e o sistema glioxalase.

**Figura 1.4:** Anatomia do Rim.

**Figura 1.5:** Circulação e microcirculação renal: Imagem representativa dos vasos pré-glomerulares renais (A), vasos glomerulares e túbulos (B).

**Figura 1.6:** Patogênese da disfunção de células endoteliais (CE) renais na nefropatia diabética (ND).

**Figura 1.7:** O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).

**Figura 1.8:** Efeitos da ativação do receptor de ANGII AT1.

**Figura 1.9:** Peptídeos identificados da angiotensina (ANG) e seus receptores na sinalização de SRAA.

**Figura 1.10:** Mecanismos envolvendo proteção renal mediada por AT2R em doenças renais.

**Figura 1.11:** Estrutura química da olmesartana.

**Figura 1.12:** Estrutura química da olmesartana medoxomil.

**Figura 1.13:** Estrutura química da piridoxamina.

**Figura 3.14:** Desenho experimental do presente projeto.

**Figura 3.15:** Imagem representativa de histopatologia do glomérulo renal, demonstrando as áreas analisadas.

**Figura 4.16:** Valores de glicose no sangue em jejum (A), peso corporal (B), pressão arterial sistólica (C) e peso do rim/tíbia (D).

**Figura 4.17:** Parâmetros metabólicos: ingestão de alimentos (A), consumo de água (B) e volume de urina (C).

**Figura 4.18:** Parâmetros de função glomerular renal creatinina no soro (A), albumina na urina (B) e relação albumina/creatinina (C).

**Figura 4.19:** Parâmetro de função tubular fosfatase alcalina/creatinina em urina 24h.

**Figura 4.20:** Valores dos metabólitos uréia (A), ferro (B), frutossamina (C) e ácido úrico (D) em urina 24h.

**Figura 4.21:** Valores da série vermelha, glóbulos vermelhos (A), hemoglobina (B) e hematócrito (C).

**Figura 4.22:** Parâmetros histológicos do rim em HE.

**Figura 4.23:** Parâmetros histológicos do rim incluindo a área glomerular (A), área de tufo glomerular (B) e área do espaço de Bowman (C).

**Figura 4.24:** Valores do fluxo sanguíneo microvascular (A) e variação do fluxo em resposta à acetilcolina (B).

**Figura 4.25:** Valores da atividade da catalase (A) e TBARS (B).

**Figura 4.26:** Níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs) no soro (A), no rim (B) e relação AGE/creatinina na urina (C).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1.** Classificação do Diabetes Mellitus segundo Associação Americana de Diabetes (ADA).

**Tabela 1.2.** Estágios da nefropatia diabética de acordo com os níveis de albumina urinária.

**Tabela 1.3.** Biomarcadores associados com lesões na estrutura renal e/ou declínio na função renal na diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
<b>1.1 Diabetes mellitus</b> .....	1
<b>1.1.1 Definições e classificação</b> .....	1
<b>1.1.2 Epidemiologia</b> .....	4
<b>1.2 Nefropatia diabética</b> .....	5
<b>1.2.1 Definição</b> .....	5
<b>1.2.2 Fisiopatologia</b> .....	5
<b>1.2.3 Diagnóstico</b> .....	9
<b>1.2.4 Epidemiologia</b> .....	11
<b>1.3 Sistema renal</b> .....	11
<b>1.4 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)</b> .....	14
<b>1.5 Tratamento do Diabetes</b> .....	18
<b>1.5.1 Olmesartana</b> .....	21
<b>1.5.2 Piridoxamina</b> .....	24
2. OBJETIVOS.....	26
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	26
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	26
3. METODOLOGIA .....	27
<b>3.1 Animais e protocolo experimental</b> .....	27
<b>3.2. Avaliação da pressão arterial</b> .....	28
<b>3.3. Eritrograma</b> .....	28
<b>3.3.1 Contagem de eritrócitos</b> .....	28
<b>3.3.2 Determinação de hemoglobina</b> .....	29
<b>3.3.3. Hematócrito</b> .....	29
<b>3.4. Gaiola metabólica</b> .....	29
<b>3.5. Parâmetros microcirculatórios</b> .....	29
<b>3.6. Medição glicemia de jejum</b> .....	30

3.7. Marcadores bioquímicos.....	30
3.8. Histopatologia.....	30
3.9. Níveis de AGEs através de fluorescência.....	31
3.10. Estresse oxidativo no tecido renal.....	31
3.11. Catalase.....	32
3.12. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Metabolismo e hemodinâmica.....	33
4.2. Eritrograma.....	37
4.3. Morfologia renal.....	37
4.4. Fluxo sanguíneo renal.....	39
4.5. Estresse oxidativo.....	40
4.6. Produtos finais de glicação avançada.....	41
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	52
7. BIBLIOGRAFIA.....	53
ANEXO.....	73
Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética.....	73

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Definições e classificação

O Diabetes mellitus (DM) é um termo comum utilizado para distúrbios metabólicos heterogêneos que tem como principal característica a hiperglicemia (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o diabetes se tornou uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo e um importante problema de saúde pública (2). No diabetes, a hiperglicemia pode ocorrer por deficiência na secreção de insulina ou na ação da insulina ou por ambos e está relacionada a lesões de longo prazo, disfunção e falha de diferentes órgãos como, por exemplo, a retina, rins, nervos, coração e disfunção em vasos sanguíneos (3,4).

Existem dois mecanismos principais relacionados ao desenvolvimento do DM, entre eles: (a) o dano autoimune das células  $\beta$  do pâncreas, que leva desde a deficiência de insulina até um desequilíbrio que resulta em resistência à ação da insulina (5); e (b) a ação alterada da insulina que altera o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas nos tecidos alvo (4).

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA), o DM pode ser classificado em diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2), diabetes gestacional (DG), diabetes monogênica (que incluem diabetes neonatal e a diabetes da maturidade de início no jovem (MODY – do inglês *Maturity Onset Diabetes of the Young*), doenças do pâncreas exócrino (diabetes relacionado à fibrose cística e diabetes pancreatogênica) ou diabetes induzida por drogas (Tabela 1.1) (6).

**Tabela 1.1:** Classificação do Diabetes Mellitus segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA). Fonte: (6).

<b>Tipo</b>	<b>Descrição</b>
Diabetes tipo 1	Causado pela destruição de células beta por mecanismos autoimunes, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina.
Diabetes tipo 2	Causada pela diminuição progressiva da secreção de insulina, frequentemente associada a resistência à insulina.
Diabetes gestacional	Diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez, sem diagnóstico prévio de diabetes antes da gestação.
Diabetes monogênica	Existem dois subgrupos: diabetes da maturidade de início no jovem (MODY) e diabetes neonatal.
Doença do pâncreas exócrino	Causada por pancreatite, fibrose cística ou outros distúrbios do pâncreas.
Química ou induzida por drogas	Causado por glicocorticóides, medicamentos para HIV/SIDA, medicamentos para transplante de órgãos.

Diabetes Mellitus do tipo 1: Doença autoimune crônica, caracterizada pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas por parte do sistema imune do próprio indivíduo, causando deficiência na produção de insulina e hiperglicemia (7). Essa doença era reconhecida exclusivamente como uma doença autoimune, mas, atualmente, vem sendo discutido que a mesma pode resultar da interação complexa de diversos fatores, dentre eles metabolismo, genoma, sistema imune, fatores ambientais (8,9). Apesar de ser mais prevalente em crianças e jovens, a doença pode ocorrer em qualquer idade (10).

Diabetes Mellitus do Tipo 2: Os fatores ambientais são os principais influenciadores na fisiopatologia da DM2, mas a predisposição genética também influencia. Ela é caracterizada por resistência à insulina, que está intimamente associada à obesidade, e menos ligada às células  $\beta$  pancreáticas (11,12). É mais comum em adultos, porém, um grande número de crianças e adolescentes são afetados de acordo com a Organização mundial da saúde (OMS). Sabe-se que o principal fator para o comprometimento ao longo do tempo da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas está baseada na resistência à insulina pré-existente no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, a qual estimula uma disfunção relativa das células  $\beta$  pancreática por diferentes vias (12,13). A DM2 é negligenciada por muito tempo até ser diagnosticada, pois, no início, os sintomas não são percebidos, e, com evolução da doença os

pacientes apresentam um risco aumentado de desenvolver complicações macrovasculares (como ataque cardíaco e acidente vascular encefálico) e microvasculares (incluindo retinopatia, nefropatia e neuropatia) (14).

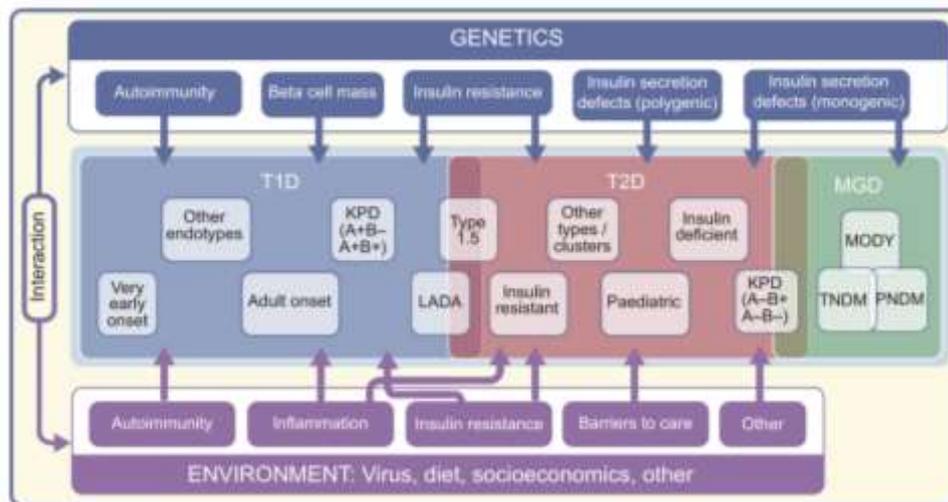
Diabetes Gestacional (DG): Essa condição é definida quando ocorre a detecção de hiperglicemia pela primeira vez durante a gestação e é considerada a complicação médica mais comum durante a gravidez (15). Macrossomia fetal, distúrbios metabólicos neonatais, risco aumentado de desenvolvimento de diabetes e obesidade durante o crescimento são resultados adversos que estão relacionados a DG (16).

Diabetes Monogênica: Apresenta basicamente dois subgrupos, diabetes neonatal e MODY. A diabetes neonatal é desenvolvida antes dos 6 meses de vida e, anteriormente, era classificada como transitória (desenvolvimento acontece nas primeiras semanas de vida e desaparece com alguns meses de idade) ou como permanente, mas, atualmente, é possível a definição genética e já se sabe que existem 23 diferentes causas genéticas de diabetes neonatal (17,18) MODY é diagnosticada precocemente, geralmente antes dos 25 anos de idade, e é caracterizada por uma forma de diabetes hereditária autossômica dominante, não dependente de insulina, que reflete um grupo heterogêneo de distúrbios causados por mutações em genes importantes para o desenvolvimento, função e regulação das células  $\beta$  pancreáticas (18,19)

Doença do Pâncreas Exócrino (DPE): Sabe-se que qualquer processo que cause dano ao pâncreas pode levar a DM, esses processos são: trauma, pancreatite, infecção, câncer e pancreatectomia. Para que desenvolva a DM, a destruição tem que ser relativamente extensa, o que causa uma perda na massa de células  $\beta$  (20,21) A DPE geralmente é classificada pelos médicos como DM2 e raramente como DPE (22).

Química ou induzida por drogas: Alguns medicamentos causam danos no processo de secreção de insulina ou até mesmo podem alterar a ação da insulina. Dentre eles estão os glicocorticóides, hormônios da tireóide, tiazidas, agonistas  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos, ácido nicotínico e pentamidina. No entanto, as reações a essas drogas são raras (23,24)

Classificar a DM dentre os diferentes tipos está cada vez mais complexo, devido a heterogeneidade entre os tipos e os diversos fatores que podem influenciar o seu desenvolvimento e progressão (6) (Fig.1.1).



**Figura 1.1:** Heterogeneidade da diabetes: tipos e fatores. Fatores genéticos e ambientais, e sua interação, influenciam múltiplos mecanismos (por exemplo, autoimunidade, redução da massa de células  $\beta$ , defeitos na secreção de insulina, inflamação, barreiras aos cuidados de saúde) que podem contribuir em grau variável para o desenvolvimento e progressão do diabetes em cada indivíduo. Esta variabilidade individual leva à heterogeneidade dentro dos tipos de diabetes (por exemplo, diabetes tipo 1 de início muito precoce, diabetes tipo 2, MGD e outros).  
 Fonte: (6).

### 1.1.2 Epidemiologia

Segundo dados publicados no Atlas de Diabetes da Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2019, existiam 463 milhões de adultos (20-79 anos) com diabetes em todo o mundo e dentre esses, 16,8 milhões eram brasileiros. Nesse mesmo ano, o Brasil ocupava a 5ª posição global em número de adultos com diabetes. A IDF estima que 578 milhões de adultos terão diabetes no ano de 2030 e, no ano de 2045, serão 700 milhões (25).

Dos 463 milhões de indivíduos que vivem com diabetes, metade não sabem que são portadores dessa comorbidade, estando assim mais suscetíveis a desenvolver complicações mais graves (25). O diabetes é uma doença que pode causar inúmeras complicações ao indivíduo, principalmente quando o controle da doença não é feito ou não é adequado, e essas complicações podem ser classificadas em agudas ou crônicas. As complicações agudas podem ser hipoglicemia, hiperglicemia, cetoacidose diabética ou síndrome hiperosmolar não cetótica. As complicações crônicas incluem a retinopatia, neuropatia, incidência aumentada de doença cardiovascular e nefropatia (26,27).

## **1.2 Nefropatia diabética**

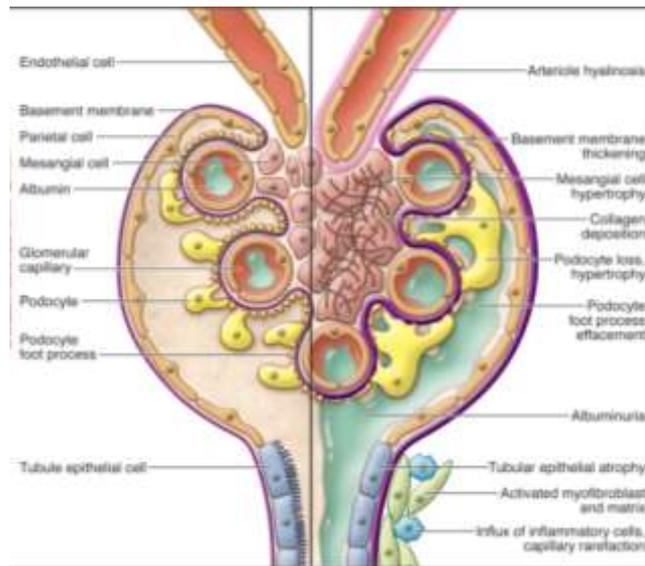
### **1.2.1 Definição**

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais causas de doença renal em estágio terminal em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (28). É caracterizada pela presença de quantidades patológicas de albumina na urina, lesões glomerulares diabéticas e redução da taxa de filtração glomerular (TFG) (29). Essa complicação microvascular se desenvolve em aproximadamente 30% dos pacientes com DM1 e em aproximadamente 40% dos pacientes com DM2 (30).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a etnia, a história familiar, o diabetes gestacional, a pressão arterial elevada, a dislipidemia, a obesidade e a resistência à insulina são os principais fatores de risco para a ND (31). Outros fatores de risco incluem nível elevado de hemoglobina glicada (HbA1c), pressão sistólica elevada, proteinúria e tabagismo (32).

### **1.2.2 Fisiopatologia**

A ND é uma consequência do diabetes mellitus, pois as alterações na homeostase glicêmica podem levar a alterações funcionais e estruturais nos rins em quatro estágios: hipertrofia glomerular e aumento da taxa de filtração glomerular (TFG), com normoalbuminúria (primeiro estágio), expansão mesangial, espessamento da membrana basal e microalbuminúria (segundo estágio), diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), proteinúria e glomerulosclerose (terceiro estágio) e por fim, a nefropatia terminal (33) (Fig. 1.2).



**Figura 1.2: Lesões patológicas na Nefropatia Diabética.** O glomérulo normal saudável inclui arteríolas aferentes, alças capilares, células endoteliais, membrana basal, podócitos, células epiteliais parietais e células epiteliais tubulares e é impermeável à albumina. Em contraste, o glomérulo diabético exibe hialinose arterial, expansão mesangial, deposição de colágeno, espessamento da membrana basal, perda e hipertrofia de podócitos, albuminúria, atrofia epitelial tubular, acúmulo de miofibroblastos ativados e matriz, influxo de células inflamatórias e rarefação capilar. Fonte : (34).

Já foi demonstrado que alterações no metabolismo intracelular através de diversas vias levam ao desenvolvimento da ND. Dentre elas estão a ativação das vias do sorbitol, proteína quinase C (PKC), a formação de produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products*, AGEs) e hipertensão intraglomerular induzida por hiperfiltração glomerular (36).

Em condições normais, a glicose é metabolizada para liberar dióxido de carbono e energia. Quando a glicose está em alta concentração na célula, a aldose redutase converte a glicose em sorbitol, que por sua vez se acumula nos tecidos, sobretudo nos túbulos renais e nos glomérulos (37). O aumento do sorbitol pode causar lesão tecidual, por danos osmóticos, e depleta o meio intracelular de mioinositol, o que consequentemente aumenta os níveis de diacilglicerol (DAG). O DAG é o principal ativador endógeno da via da PKC, que também está envolvida na patogênese da ND. A reação da aldose redutase utiliza como cofator a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) e consequentemente reduz o nível de glutatona, enquanto a reação catalisada pela sorbitol desidrogenase depende de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>), para converter sorbitol em frutose. A depleção de cofatores de NADPH e NAD<sup>+</sup> comprometem o sistema de defesa antioxidante com a diminuição de glutatona, alterando o equilíbrio redox (38).

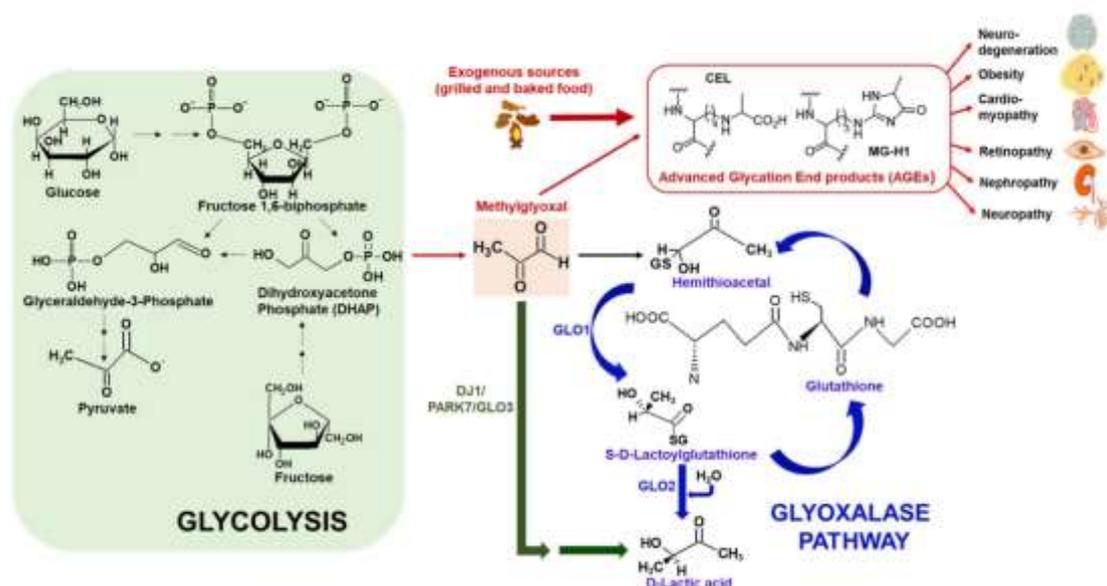
Níveis elevados de frutose são responsáveis também pela formação de AGEs (39). Alguns estudos mostraram uma diminuição na excreção urinária de albumina em animais que receberam inibidores da aldose redutase, mas em humanos esses agentes não foram amplamente estudados e os resultados são inconclusivos (40).

O papel da PKC na indução e progressão da ND é por meio de um mecanismo complexo que envolve suas isoformas (PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta$  e PKC- $\epsilon$ ) (41). Essas isoformas têm sido implicadas como mediadoras de fibrose renal e expansão mesangial, através da suprarregulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células mesangiais, bem como fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), colágeno tipo IV, laminina e fibronectina nos glomérulos. A expressão induzida por hiperglicemia de algumas subunidades de NADPH oxidase em células mesangiais ocorre de forma dependente de PKC, e o estresse oxidativo renal impulsionado por NADPH oxidase estimula a expansão mesangial e albuminúria, aumentando a expressão de fibronectina e colágeno do tipo 1 no rim, sendo o TGF- $\beta$ 1 a principal citocina “fibrogênica” *in vivo* (42,43).

Outra via envolvida na patogênese da ND é a via da hexosamina. A glicose intracelular em excesso é desviada parcialmente para a via da hexosamina, e então a enzima glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GFTA) converte a frutose-6-fosfato em N-acetilglucosamina-6-fosfato. O N-acetilglucosamina-6-fosfato é então convertido em N-acetilglucosamina-1,6-fosfato e UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). A UDP-GlcNAc serve como substrato para a O-GlcNAc transferase (OGT), uma enzima citosólica e nuclear que catalisa uma modificação reversível da proteína O-GlcNAcilação que altera a expressão gênica fatores de transcrição (44). Na ND, a ativação da NF- $\kappa$ B via fluxo da via hexosamina leva a ativação de genes pró-inflamatórios (45). O-GlcNAcilação leva ao aumento da expressão do TGF- $\beta$ 1 e do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (46), levando à expansão da matriz renal (47). Na ND, a O-GlcNAc transferase aumenta e consequentemente eleva em duas vezes ou mais a O-GlcNAcilação de proteínas do citoesqueleto, incluindo a  $\beta$ -actina, junto com alterações morfológicas nos glomérulos e túbulos proximais (48).

Diversos autores discutem o papel dos AGEs na etiologia da ND (49). Os AGEs podem ser ingeridos através da alimentação exogenamente (50,51), ou serem produzidos endogenamente (52). Os AGEs são formados por reações não enzimáticas entre glicose redutores ou lipídios oxidados e proteínas, que se inicia com a formação de uma base de Schiff, um produto instável formado pela reação entre um grupo carbonila da glicose e um grupo amina de uma proteína. Posteriormente, a base de Schiff sofre rearranjos para formar os produtos de Amadori que são estruturas mais estáveis e, posteriormente, os AGEs são formados (53). Outra

via de formação dos AGEs é a via da metilglioxal (MG): o aumento de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) intermediário da via glicolítica leva a aumento de MG, este é um composto do tipo alfa-dicarbonil altamente reativo que se liga a resíduos de arginina, lisina e cisteína o que leva a formação de AGEs endógenos (Fig. 1.3) (54).



**Figura 1.3: Formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e o sistema glicoxalase.** A figura ilustra a formação e desintoxicação do metilglioxal (MG), um subproduto glicolítico que é formado a partir de glicose ou frutose. Subprodutos glicolíticos derivados endogenamente (por exemplo, MG) ou seus AGEs derivados (por exemplo, Nε-carboxietil-lisina [CEL] e hidroimidazolona derivada de metilglioxal [MG-H1]) levam a uma variedade de doenças que afetam diferentes órgãos (como cérebro, coração, retina, rins, pulmões) que complicam com a idade. Além de fontes endógenas, como glicose ou fosfato de diidroxiacetona derivado de frutose (DHAP) (formado durante a glicólise), fontes dietéticas exógenas, como alimentos cozidos em calor seco, apresentam alto teor de AGEs. A desintoxicação de MG ocorre via glutatona (GSH) - dependente da via da glicoxalase mediada por duas enzimas mitocondriais: glicoxalase 1 (GLO1) e glicoxalase 2 (GLO2), que eventualmente converte MG em ácido láctico. Alternativamente, o MG também pode ser convertido em ácido láctico em uma única etapa mediada por uma enzima citosólica, a glicoxalase 3 (GLO3) independente de GSH, um ortólogo de mamífero da proteína DJ1/PARK7. Fonte: (55).

O aumento de AGEs está associado a alterações estruturais renais que levam à progressão da ND, seguida por um aumento adicional na concentração de AGEs (56). Além do dano vascular, foi demonstrado que a ligação de AGE ao seu receptor (RAGE) estimula o desenvolvimento da glomeruloesclerose e promove a ativação dos podócitos no curso da nefropatia diabética (57). Quase todas as estruturas renais são suscetíveis aos acúmulo e danos

por AGEs, incluindo membranas basais, células mesangiais e endoteliais, podócitos e túbulos renais (58).

Além disso, o desequilíbrio na resistência arteriolar aferente e eferente também é um fator primordial na fisiopatologia da ND e resulta em aumento da pressão hidrostática glomerular e hiperfiltração. A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) aumenta os níveis de angiotensina II, levando à vasoconstrição arteriolar eferente e produção de moléculas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, por meio de múltiplos mecanismos. Níveis elevados de enzima conversora de angiotensina (ECA) estão associados a maior albuminúria e nefropatia em animais e pessoas afetadas pelo diabetes (59,60).

Todas as vias interagem em uma cascata de mecanismos moleculares complexos, resultando nos principais componentes patogênicos da ND, que consistem em fibrose renal, expansão mesangial, hipertrofia glomerular, estresse oxidativo e inflamação tubular (61). Atualmente, essas vias são os principais alvos para tratamento e prevenção da ND.

Alguns autores relatam que a disfunção endotelial é um fator chave no desenvolvimento da ND, levando assim à hipótese de que a natureza heterogênea da lesão glomerular observada em pessoas com diabetes pode ser explicada pela extensão da lesão endotelial (62). Bangstad et al. encontraram uma associação entre a proporção de dimetilarginina assimétrica:L-arginina (um marcador de disfunção endotelial) com lesão tubulointersticial em pacientes com DM1 (63). Da mesma forma, Shibata et al. demonstraram que a disfunção endotelial poderia ser responsável pela lesão tubulointersticial observada em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (64). Um mecanismo pelo qual a disfunção endotelial pode induzir lesão tubulointersticial é o vazamento de plasma de capilares peritubulares lesionados, provocando uma resposta inflamatória tubulointersticial (65,66).

### **1.2.3 Diagnóstico**

A maioria das diretrizes recomenda o rastreamento da ND utilizando a relação albumina/creatinina (ACR) na urina (Tabela 1.2) na primeira urina da manhã (preferencial) ou em amostras aleatórias. Um resultado anormal é repetido uma ou duas vezes durante alguns meses para consistência. Este parâmetro, junto com a TFG estimada (eTFG) é utilizado para a avaliação da função renal, e diagnóstico de doença renal crônica (DRC) (67).

**Tabela 1.2:** Estágios da nefropatia diabética de acordo com os níveis de albumina urinária.

<b>Estágios da nefropatia</b>	<b>Urina ACR</b>	<b>Albuminúria (urina de 24 h)</b>
Normal	< 2	< 30 mg/dia
Microalbuminúria	2 – 20	30-300 mg/dia
Nefropatia evidente	> 20 > 67	> 300 mg/dia > 1000 mg/dia

O uso rotineiro de biópsia renal para confirmar ND é muito debatido. Um estudo buscou determinar a utilidade da biópsia renal em pacientes com diabetes e a previsibilidade do diagnóstico ND *versus* doença renal não diabética (NDRD) a partir de dados clínicos e laboratoriais. Os autores viram que 43% das biópsias com ND demonstraram necrose tubular aguda sobreposta. Assim, uma biópsia renal é útil para excluir lesão tubular aguda e doenças passíveis de terapia específica (68).

Tradicionalmente, os biomarcadores são utilizados com base em sua capacidade de prever o início ou monitorar a progressão da ND. Diferentes biomarcadores estão associados com lesões na estrutura renal e/ou declínio na função renal no DM, dentre esses existem marcadores urinários (como, albumina, cistatina C, glicosaminoglicanos e fibronectina) e marcadores de soro/plasma (bilirrubina, apolipoproteínas, ácido úrico, entre outros) (Tabela 1.3) (69).

**Tabela 1.3:** Biomarcadores associados com lesões na estrutura renal e/ou declínio na função renal no diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. Fonte: (69).

<b>Marcadores urinários</b>	<b>Marcadores de soro/plasma</b>
Excreção de albumina urinária	Bilirrubina
Relação albumina/creatinina	Copeptina
Alfa-1 microglobulina	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
Transferrina	Cistatina C
Angiotensinogênio	Proteína 1 semelhante a quitinase-3
Molécula de lesão renal-1	Apolipoproteínas
Haptoglobina	Proteína reguladora de redox p66Shc
Glicosaminoglicanos	Bilirrubina
Marcadores de podócitos (nefrina e podocalixina)	Ácido úrico
Aquaporinas urinárias	Interleucina-19
Produtos finais de glicação avançada urinários	Fator de diferenciação de crescimento-15

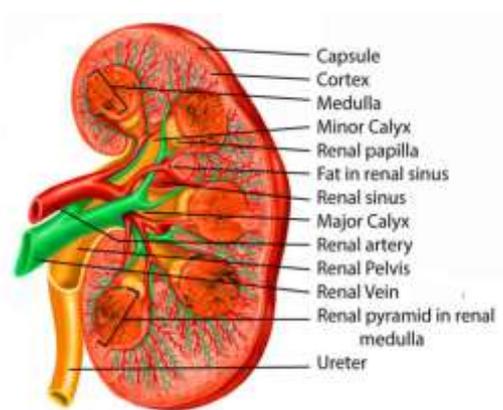
### 1.2.4 Epidemiologia

A mortalidade de indivíduos com ND é aproximadamente 30 vezes maior do que a de pacientes diabéticos sem nefropatia e a grande maioria dos pacientes com ND morrerão de doença cardiovascular antes de atingirem o estágio terminal da doença renal (70).

Como o número total de pessoas com diabetes está estimado a aumentar substancialmente até 2050, a prevalência de ND aumentará dramaticamente, com aumento concomitante na mortalidade cardiovascular associada e doença renal terminal (71).

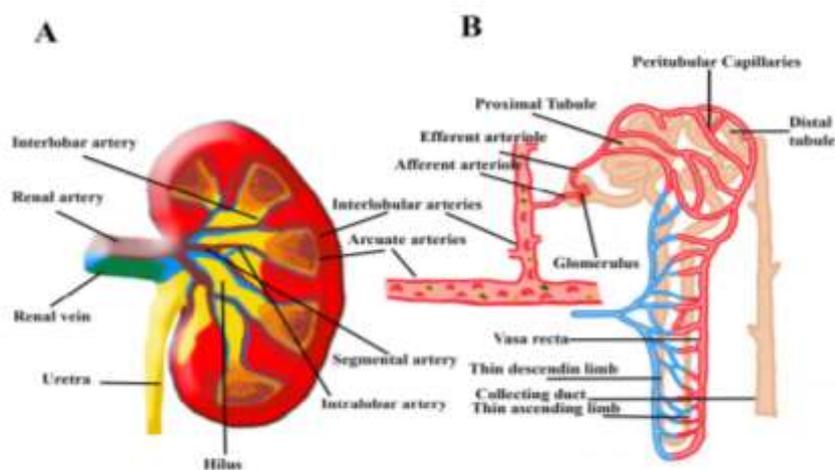
### 1.3 Sistema renal

O sistema renal é composto pelos rins, ureteres e uretra e tem como função principal a filtração do sangue, o que permite a excreção de produtos residuais como metabólitos e íons em excesso, mantendo as substâncias essenciais no sangue (72). O rim é um órgão localizado na região abdominal no espaço retroperitoneal, em humanos, e pesa em torno de 150 gramas. Anatomicamente, sua margem medial é côncava e conhecida como hilo, e por ela passam a artéria e veias renais, vasos linfáticos, nervo renal e o ureter, que é responsável por levar a urina do rim para a bexiga. Além disso, ele é revestido por uma cápsula fibrosa que tem como função a proteção de estruturas mais internas (73). A medula renal é a região mais interna e o córtex renal a camada mais externa. A medula renal contém cerca de oito a 10 pirâmides renais em formato de cones. A base das pirâmides renais está localizada no limite das regiões cortical e medular e termina na papila renal, que está intimamente associada a pelve renal, desembocando no ureter (Fig. 1.4) (73).



**Figura 1.4:** Anatomia das principais partes do rim, demonstrando, a cápsula renal, o córtex, a medula, e as principais veias e artérias renais. Fonte: (73).

A microcirculação renal é complexa e desempenha um papel importante no fornecimento de oxigênio ao rim e garante a filtração do plasma sanguíneo, troca eletrolítica e reabsorção de água. Nela estão envolvidos dois sistemas capilares: o sistema capilar glomerular e o sistema capilar peritubular. O sistema capilar glomerular é encontrado dentro do glomérulo, responsável pela TFG, que é conduzida pela pressão de filtração (dentro da cápsula de Bowman e pressão hidrostática). O sistema capilar glomerular termina com a arteríola eferente. O leito capilar peritubular emerge dessa arteríola e envolve todos os túbulos. Na medula renal, ele se torna o *vasa recta* para criar o sistema de troca contracorrente, junto com a alça de Henle posicionada de forma paralela. O papel do sistema de troca contracorrente é manter o gradiente osmótico corticomedular para concentrar o ultrafiltrado (Fig. 1.5) (74).



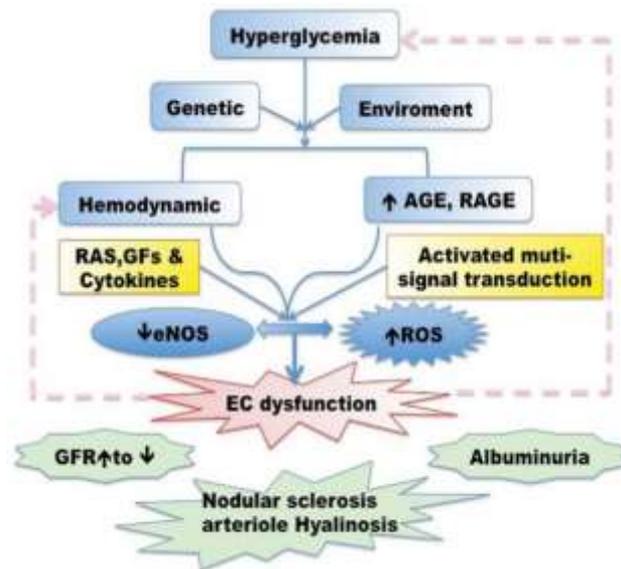
**Figura 1.5: Circulação e microcirculação renal:** Imagem representativa dos vasos pré-glomerulares renais (A), vasos glomerulares e túbulos (B). Fonte: (74).

O fluxo sanguíneo para o rim é em média 20% do débito cardíaco. O sangue entra no rim através das artérias renais e passa por ramos seriais (interlobar, arqueado e interlobular) antes de entrar nos glomérulos pelas arteríolas aferentes. A porção do plasma não filtrada através da parede capilar glomerular sai dos glomérulos através das arteríolas eferentes e entra nos capilares pós-glomerulares. No córtex renal, esses capilares correm em oposição aos túbulos adjacentes, embora não necessariamente aos segmentos tubulares do mesmo glomérulo. Além disso, os ramos das arteríolas eferentes dos glomérulos justamedulares entram na medula e formam os vasos capilares retos. A microcirculação renal afeta a formação da urina da seguinte maneira: (1) a TFG é um importante determinante da excreção de soluto e água; (2) os capilares peritubulares no córtex retornam solutos reabsorvidos e água para a circulação sistêmica e podem modular o grau de reabsorção e secreção tubular proximal; e (3) os capilares na medula

renal retornam o sal reabsorvido e a água para a circulação sistêmica e participam do mecanismo de contracorrente, permitindo a conservação da água pela excreção da urina hiperosmótica (75).

O endotélio é a camada fina que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e vasos linfáticos (76) e é conhecido por ser um alvo primário no processo de várias doenças renais, incluindo a nefrite glomerular, vasculite, nefrite lúpica, pré-eclâmpsia, síndrome hemolítico-urêmica, insuficiência renal aguda isquêmica, rejeição de transplante renal e doença renal crônica progressiva (77). O rim possui uma das populações de células endoteliais mais ricas e diversificadas. Essa grande diversidade pode ser explicada por dois motivos. Em primeiro lugar, o endotélio renal contribui para a capacidade de transporte diferencial entre os vários segmentos do néfron e em segundo lugar, o endotélio deve resistir a extremos ambientais incomparáveis em níveis de oxigenação e osmolalidade (78,79).

A disfunção endotelial desempenha um papel importante na patogênese da ND (80) e uma correlação entre o diabetes e a disfunção endotelial vascular foi confirmada em vários estudos (81,82). Há evidências sugestivas de que a disfunção endotelial pode até mesmo existir em indivíduos com tolerância normal à glicose e com histórico familiar de diabetes (83). Além da hiperglicemia, a disfunção endotelial também pode ser exacerbada pela hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, microalbuminúria, inflamação e resistência à insulina (84). Experimentos com animais sugerem que a dilatação da arteríola glomerular aferente é a principal responsável pela resposta de hiperfiltração, pelo aumento da pressão intraglomerular e fluxo sanguíneo renal (85). A hiperfiltração renal tem sido proposta como um fator comum no diabetes precoce associado à disfunção vascular, que pode eventualmente levar a um declínio da função renal e ao desenvolvimento de glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial (86). A disfunção endotelial também diminui a capacidade antiaterogênica das células endoteliais, contribuindo assim para a disfunção renal (87). A patogênese da lesão de CE no diabetes é um processo complicado, com diversas vias sendo ativadas e vários mediadores envolvidos (Fig. 1.6).

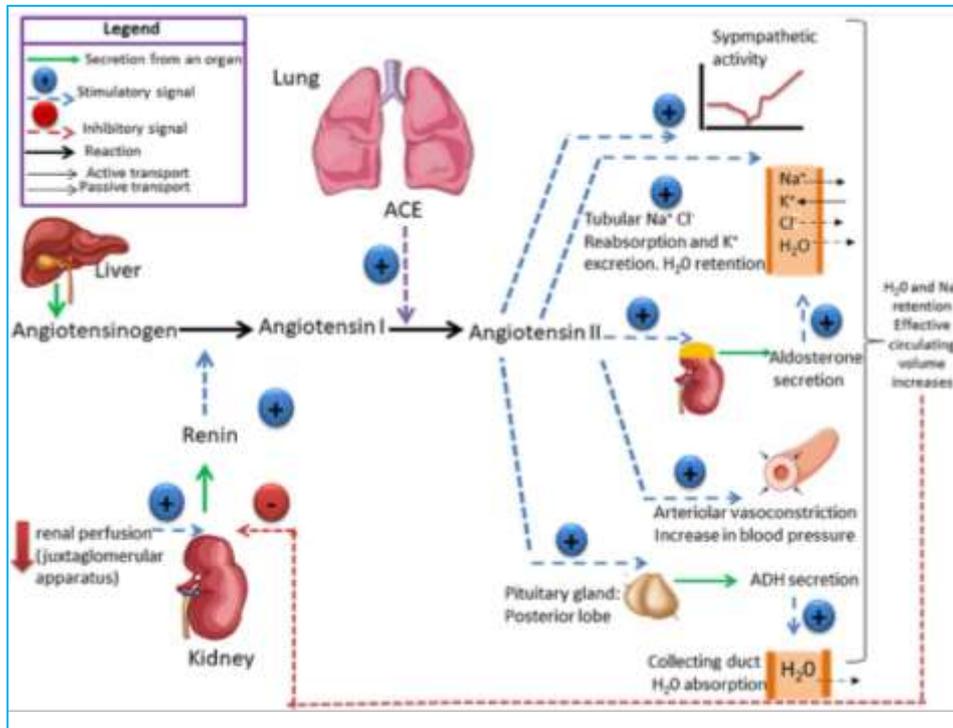


**Figura 1.6: Patogênese da disfunção das células endoteliais renais na nefropatia diabética (ND).** A hiperglicemia, junto com seus metabólitos e outros estímulos, ativa diversas vias de sinalização e induz vários fatores de crescimento, citocinas, geração de ROS e comprometimento da eNOS, levando à disfunção renal das CEs. As células endoteliais lesionadas, por sua vez, podem contribuir ainda mais para a progressão da ND. RAS: Sistema renina-angiotensina-aldosterona; GFs: fatores de crescimento; eNOS: óxido nítrico endotelial; AGEs: produtos finais de glicação avançada; RAGE: receptor de AGEs; ROS: espécies reativas de oxigênio; TFG: taxa de filtração glomerular. Fonte: (88).

#### 1.4 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

O SRAA tem papel fundamental no controle da perfusão tecidual, pressão arterial e volume extracelular (89). A ativação desse sistema começa pela síntese e secreção do angiotensinogênio, no fígado (90). Esse pré-pró-hormônio circulante é clivado pela renina, uma enzima sintetizada e liberada das células justaglomerulares nas arteríolas aferentes renais, sendo convertido em angiotensina I (ANGI) (91). O decapeptídeo intermediário inativo, ANGI, é posteriormente clivado pela enzima de conversão da angiotensina (ECA), uma peptidase localizada na superfície luminal das células endoteliais e do pulmão, no octapeptídeo angiotensina II (ANGII) (91). ANGII atua através de dois subtipos de receptor, o receptor AT1 e o receptor AT2. A ANGII não apenas medeia os efeitos fisiológicos imediatos de vasoconstrição e regulação da pressão arterial, mas também está implicado na inflamação, disfunção endotelial, aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva (92), a ANGII contribui para a homeostase vascular por seu efeito no volume do fluido extracelular (93). A ANGII estimula o córtex adrenal a liberar aldosterona, que atua nos rins para aumentar a retenção de Na<sup>+</sup> e fluidos

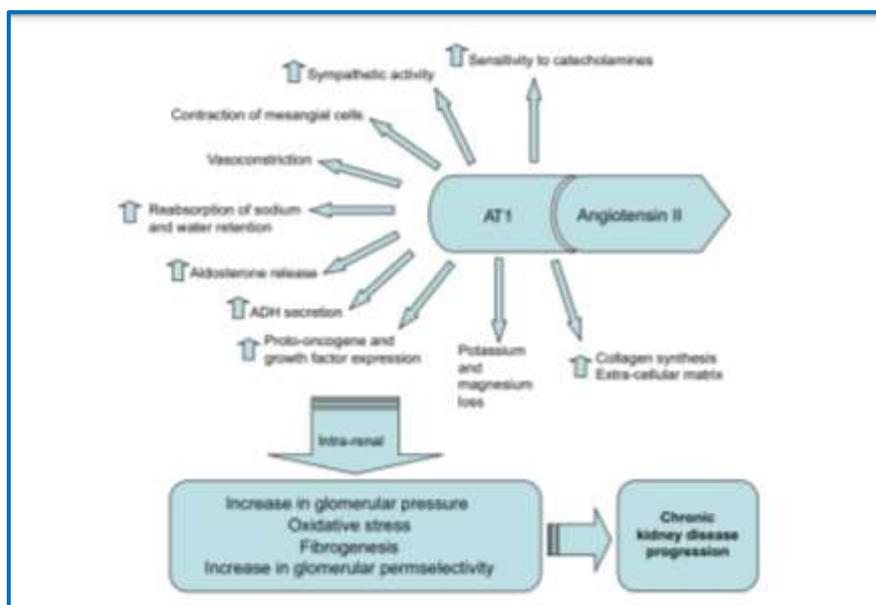
(93). A ANGI II também estimula a liberação do hormônio antidiurético (ADH) pela hipófise posterior, fazendo com que os rins aumentem a retenção de líquidos (Fig.1.7) (94).



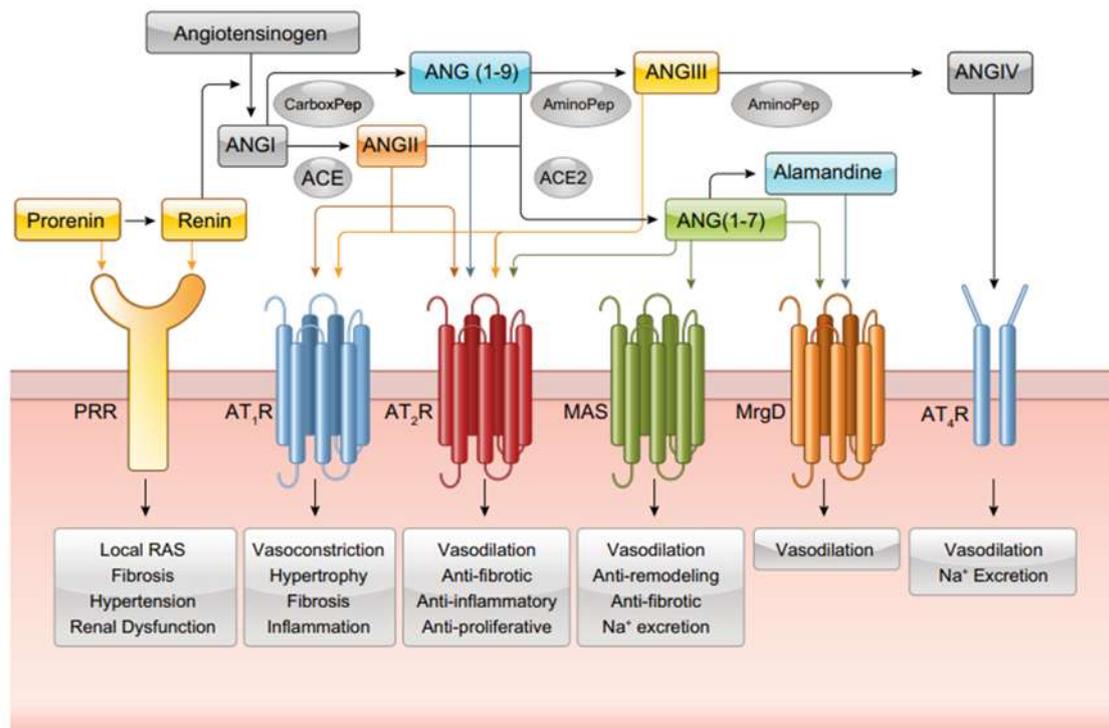
**Figura 1.7: O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA).** O SRAA é responsável pela manutenção do equilíbrio de sódio e água no sangue e tecidos. A renina catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (ANGII). A ANG II controla a secreção de aldosterona, que estimula a retenção de  $\text{Na}^+$  e os hormônios antidiuréticos (ADH) que estimulam a reabsorção de  $\text{H}_2\text{O}$  pelo rim. Fonte: (95).

O receptor da angiotensina II do tipo 1 (AT1), pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que uma vez ativada promove uma cascata de sinalização intracelular que regula vários processos fisiológicos e patológicos. Sabe-se que patologias como, por exemplo, a hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, arritmia, acidente vascular encefálico, nefropatia diabética e doenças isquêmicas do coração e renais estão relacionados à superestimulação do receptor AT1 (96,97). Como resultado, há estimulação de vasoconstrição, contração de células mesangiais, reabsorção de sal e água, liberação de aldosterona, secreção de ADH, aumento da atividade simpática, expressão de fatores de crescimento, síntese de componentes da matrix extracelular como o colágeno e estimulação da liberação de aldosterona. Em resposta à ANGI II, ocorre

aumento da pressão intraglomerular e da permeabilidade glomerular, bem como ativação da fibrose e crescimento celular no rim (Figs. 1.8 e 1.9) (98).



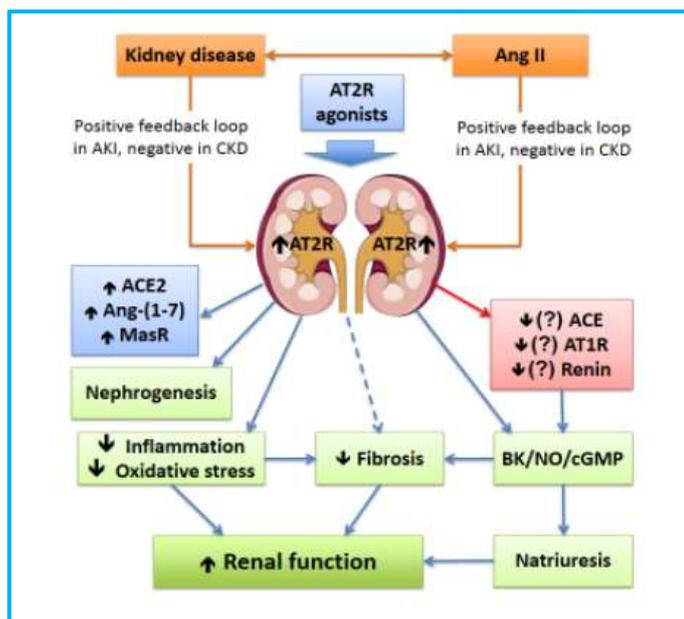
**Figura 1.8: Efeitos da ativação do receptor AT1 por ANGI.** As alterações hemodinâmicas, vasoconstrução e liberação da aldosterona contribuem no rim para o aumento da pressão intraglomerular, permeabilidade glomerular e fibrose. Fonte: (98).



**Figura 1.9: Peptídeos identificados da angiotensina (ANG) e seus receptores na sinalização de SRAA.** Foi identificado que a pró-renina e a renina se ligam ao receptor (pró) renina. 7) por meio de ECA2 ou ANG III por meio de uma aminopeptidase. ANG (1–7) foi identificado por se ligar ao receptor AT2, ao receptor MAS ou ao receptor MrgD. ANG (1–7) também pode formar alamandina, que se liga ao receptor MrgD. ANG III liga-se aos receptores AT1 e AT2. ANG III pode ser posteriormente clivado em ANG IV que se liga ao receptor AT4. Fonte: (99)

O receptor AT2 medeia efeitos diferentes e muitas vezes opostos aos do receptor AT1. Ele é altamente expresso em tecido saudável e a sua ativação previne o desenvolvimento de processos patológicos como inflamação, ativação do sistema nervoso simpático, morte celular apoptótica, autofagia, fibrose cardíaca e rigidez arterial. Paralelamente, a estimulação do receptor AT2 ativa os mecanismos de defesa do coração, como regeneração cardíaca, vasodilatação dos vasos da microcirculação coronariana e hipertrofia compensatória dos miócitos cardíacos, resultando na diminuição do ventrículo esquerdo e melhora funcional do coração. No rim, o receptor AT2 é um dos principais componentes que regulam a nefrogênese. A ativação do receptor AT2 reduz a fibrose renal diretamente ou por meio da supressão da inflamação e pela redução do estresse oxidativo. A estimulação do receptor AT2 também promove a natriurese pela via BK/NO/cGMP. Em conjunto, a ativação do receptor AT2 melhora a função renal em doenças renais. A ativação do receptor AT2 também é responsável indiretamente pela regulação positiva do receptor Mas (MasR), da atividade da ECA2 e dos níveis

de Ang-(1-7), que também podem contribuir para os mecanismos de proteção dos órgãos e tecidos (Fig. 1.10) (100).



**Figura 1.10: Mecanismos envolvendo a proteção renal mediada pelo receptor AT2 em doenças renais.** O receptor AT2 é um dos principais componentes que regulam a nefrogênese. A expressão do receptor AT2 é elevada na lesão renal aguda e reduzida nas doenças renais crônicas. A estimulação do receptor AT2 com agonistas endógenos (ANGII) ou exógenos leva a expressão aumentada do receptor AT2, ECA2, Ang-(1–7) e receptor Mas e expressão reduzida do receptor AT1, ACE e renina. A ativação do receptor AT2 reduz a fibrose renal diretamente ou por meio de mecanismos anti-inflamatórios e redução do estresse oxidativo. A estimulação do receptor AT2 também promove a natriurese pela via BK/NO/cGMP. Em conjunto, a ativação do receptor AT2 melhora a função renal em doenças renais. Fonte [90].

## 1.5 Tratamento do Diabetes

O controle do DM é complexo e deve ser efeito através de várias frentes, controlando: a pressão arterial, a glicemia, a dislipidemia, a hipercolesterolemia e a proteinúria. Em estágios mais avançados, quando há insuficiência renal, a diálise é necessária e em alguns casos o transplante renal é a única alternativa.

Um bom controle glicêmico é eficaz na redução das complicações microvasculares. Uma meta-análise mostrou que o controle intensivo da glicose no sangue a longo prazo tem efeitos benéficos na progressão da microalbuminúria para normoalbuminúria em pacientes com DM1 (101). Em outro estudo, com indivíduos com DM2 recém diagnosticada, mostrou-se que os

pacientes que receberam tratamento intensivo para o controle da glicemia tinham menos probabilidade de desenvolver insuficiência renal (102).

Alguns medicamentos podem conferir efeitos benéficos independentemente da redução da glicose, como os inibidores dos receptores ativadores de proliferação peroxissomal do tipo gama PPAR- $\gamma$ , como a pioglitazona e a rosiglitazona, que demonstraram efeitos anti-fibróticos e anti-inflamatórios nos rins de ratos diabéticos (103,104). No DM2, a adição de rosiglitazona ao tratamento com metformina por 32 semanas reduziu a albuminúria e a pressão arterial, independentemente do controle glicêmico (105). Os inibidores da gliptinas ou dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) mostraram propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas em modelos de ND (106). No DM2, o tratamento com sitagliptina por seis meses reduziu a albuminúria independentemente da modulação da HbA<sub>1c</sub> (107). Em um estudo com a alogliptina em DM2, os pesquisadores mostraram uma redução no estresse oxidativo, mas nenhuma alteração na função renal (108). Por último, os inibidores do co-transportador de sódio e glicose (SGLT-2), como a empagliflozina, podem reduzir a hiperfiltração glomerular por seu efeito no *feedback* tubuloglomerular (109).

O tratamento da hipertensão arterial sistêmica é considerado um componente importante no manejo clínico dos pacientes. A evidência disso foi observada no estudo Prospectivo de Diabetes do Reino Unido (UKPDS), onde a redução da pressão arterial sistólica foi associada a uma diminuição na incidência de complicações decorrentes do diabetes (110). Os inibidores do SRAA, incluindo os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (iECA) e os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA), são atualmente as terapias de primeira linha para ND (111). É aceito que esses agentes proporcionam benefícios que vão além do simples controle da pressão arterial, conforme evidenciado pela redução da microalbuminúria (112). Ao reduzir a pressão intraglomerular, os iECAs e os BRAs têm efeitos de longo prazo na função renal, mesmo após a cessação do tratamento, sugerindo que esses medicamentos anti-hipertensivos normalizam alguns aspectos da patologia da ND (113). Embora esses agentes tenham sido usados inicialmente em todos os pacientes com ND, as diretrizes recentes recomendam limitar sua prescrição a pacientes com proteinúria > 300 mg/dia (114).

A aldosterona é o componente final da cascata do SRAA. A aldosterona promove fibrose, inflamação e geração de ROS, juntamente com disfunção endotelial, crescimento celular e proliferação (115). A espironolactona parece reduzir a proteinúria quando utilizada isoladamente ou em combinação com iECA ou BRA em indivíduos com DM (116). Apesar de representar o tratamento atual de escolha, esses medicamentos apenas retardam a progressão da ND. Além disso, as abordagens tradicionais para inibir o SRAA são limitadas por um risco aumentado de

hipercalcemia em pacientes com doença avançada. Como tal, tem havido um esforço concentrado para otimizar a inibição do SRAA, ao mesmo tempo que se limita os possíveis efeitos adversos.

A adição de um bloqueador do canal de cálcio (BCC) como o verapamil junto com o tratamento com iECA demonstraram reduzir a albuminúria e participar no declínio da TFG (117). O tratamento para a dislipidemia com atorvastatina melhorou o declínio da TFG, particularmente naqueles indivíduos com albuminúria (118). Atualmente, as estatinas já são recomendadas para diabéticos com ND acima de 40 anos, independentemente de seus níveis lipídicos basais. Isso é principalmente por conta do benefício cardiovascular, e não para a doença renal em si, uma vez que a albuminúria demonstrou ser um fator de risco independente para eventos cardiovasculares e mortalidade (119).

O meio diabético é um ambiente complexo onde uma série de intervenções podem ser utilizadas para minimizar diversos processos patológicos. Como nenhuma terapia melhora completamente a ND, novas estratégias são necessárias para complementar as intervenções existentes. Como novos agentes terapêuticos já comercializados temos: (1) um inibidor direto da renina (Aliscireno) que tem efeitos renoprotetores independentes de seu efeito de redução da pressão arterial, uma vez que também reduz a albuminúria e a creatinina em pacientes com DM2 (120); (2) em ratos diabéticos, o uso de inibidores de endotelina para o bloqueio do receptor ET<sub>A</sub> com atrasentan ou avosentan reduziu a albuminúria e a fibrose renal (121); (3) a ruboxistaurina é um inibidor seletivo de PKC- $\beta$  que mostrou efeitos benéficos na redução da expansão mesangial, hiperfiltração, e albuminúria; (4) piridoxamina, que remove radicais livres e carbonil e reduz significativamente a creatinina sérica e albuminúria em DM1 e DM2 (122). Além disso, estudos recentes avaliaram os efeitos da inibição específica de RAGE com aptâmeros ou com FPS-ZM1, como novas estratégias terapêuticas. (123).

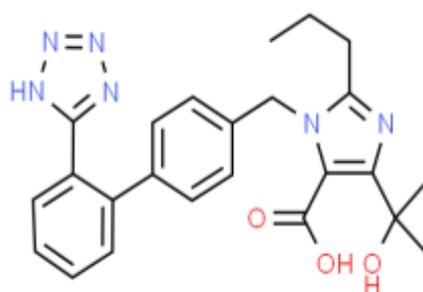
O estresse oxidativo e a inflamação na ND também podem levar à redução do Nrf2, um fator de transcrição nuclear que desempenha um papel fundamental nos mecanismos antioxidantes e citoprotetores. Bardoxolona, que é um potente ativador de Nrf2, em ensaios com DM2 foi associada a uma melhora na estimativa da TFG (124). Glicosaminoglicanos, como a Sulodexide, que é uma mistura de sulfato de heparana (80%) e sulfato de dermatana (20%), pode reduzir a degradação intensificada de sulfato de heparana na membrana basal glomerular, alteração recorrente na ND. A Sulodexide possui propriedades anti-inflamatórias e inibe a produção de ROS, proteína quimioatrante de monócito (MCP-1) e interleucina 6 (IL-6) induzida por hiperglicemia nas células endoteliais fenestradas do glomérulo (125).

A hiperatividade do SRAA tem sido implicada na deterioração da função renal em pacientes com ND e em pacientes com doença renal crônica em estágio três ou quatro com

microalbuminúria ou macroalbuminúria (126). Nos últimos anos, uma série de fármacos tem sido usada para o tratamento da ND, como os bloqueadores do SRAA, incluindo os inibidores iECAs e os BRAs, que são atualmente recomendados pelas diretrizes clínicas para o tratamento da ND para retardar a progressão da doença (127,128). Os iECAs e BRAs diminuem o agravamento da TFG, diminuem a taxa de excreção de albumina (129), reduzem a progressão da glomeruloesclerose, fibrose intersticial e proteinúria (130). No DM2, eles previnem a progressão e desenvolvimento da ND (131).

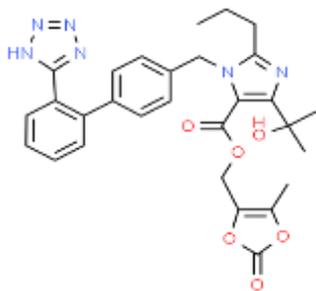
### 1.5.1 Olmesartana

A Olmesartana, fórmula molecular  $C_{24}H_{26}N_6O_3$ , é um composto de última geração utilizado no tratamento da hipertensão arterial sistêmica, sendo classificado como BRA (Fig. 1.11). Dentre outros compostos da classe dos BRAs podemos citar a valsartana, losartana, telmisartana, e a candersartana. Existem evidências de que os BRAs são mais eficazes do que os iECA, comumente prescritos na clínica (129) (132).



**Figura 1.11:** Estrutura química da olmesartana. Fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.139674.html>.

A olmesartana é administrada por via oral na forma de pró fármaco olmesartana medoxomil ( $C_{29}H_{30}N_6O_6$ ) (133) (Figura 1.12).



**Figura 1.12:** Estrutura química da olmesartana medoxomil. Fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.115748.html?rid=8861c994-0517-434e-a7bc-fa0d69ae4836>.

Após administração oral, ocorre a desesterificação da olmesartana medoxomil no trato intestinal e o metabólito ativo olmesartana é produzido. A ação eficaz da olmesartana medoxomil pode estar atrelada à interação farmacológica única do medicamento com o receptor AT1, resultando em um bloqueio potente, de longa duração (133).

O mecanismo de ação da olmesartana, gerando efeito anti-hipertensivo, tem sido bem descrito na literatura, mas outros potenciais mecanismos de ação já foram estudados. A olmesartana inibe receptores AT1 na glândula adrenal e no músculo liso vascular, especificamente nas arteríolas (134). A ligação competitiva da olmesartana ajuda a reduzir a pressão arterial, diminuindo a resistência arteriolar por meio da vasodilatação, que por sua vez reduz a pressão arterial. A olmesartana bloqueia competitivamente a ligação de ANGII ao seu receptor, inibindo assim a liberação de aldosterona da zona glomerulosa do córtex adrenal. A redução da aldosterona sérica, por sua vez, resulta na redução da expressão dos canais de sódio das células epiteliais (ENaC) no túbulo coletor distal do néfron, levando à diminuição da reabsorção de sódio. A expressão diminuída do canal ENaC resulta em natriurese, acompanhada por diurese osmótica (134).

Tem sido observado que a olmesartana medoxomil exerce um efeito benéfico sobre a ND por diferentes vias e pode atuar como um fármaco renoprotetor no tratamento da ND em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Além disso, também foi demonstrado que o

tratamento com olmesartana modulou a cascata AT-1R/MAPK, que promoveu a atenuação da ND em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (135) (136).

Em estudos clínicos foi demonstrado que a olmesartana retarda o início da microalbuminúria em pacientes com DM2 (137). A inibição do receptor AT1 diminui o estresse oxidativo, inflamação, disfunção endotelial e remodelação tecidual (138). O tratamento com olmesartana em camundongos diabéticos db/db, além de reduzir a albuminúria, preveniu o aumento de apoptose e diminuição de podócitos (139). Em ratos diabéticos, BRA foi capaz de diminuir as formas fosforiladas de AKT e atividade de mTOR1 em podócitos (140).

Apesar da olmesartana ser utilizado para tratamento da ND (141), alguns estudos clínicos com esse fármaco apresentaram resultados desapontadores na proteção da ND e eficácia limitada quando administrados em estágios avançados da diabetes (142,143). Fato esse que justifica a busca de novas alternativas terapêuticas para ND, como por exemplo a associação de olmesartana com novos fármacos, que potencializem o seu efeito.

Os efeitos colaterais do tratamento com a olmesartana são relativamente moderados em comparação com outros medicamentos anti-hipertensivos. Estudos mostram que o efeito colateral mais comum é cefaleia associada, que pode ocorrer em até 7% dos pacientes e 3% podem ter tontura associada. As queixas respiratórias decorrentes da medicação incluem infecções respiratórias superiores (até 5%), gripe (até 3,5%) e sinusite (até 1%). Anormalidades endócrinas também podem resultar do tratamento com a olmesartana, incluindo hiperglicemia (maior que 1%) e hipertrigliceridemia (mais de 1%). O sistema gastrointestinal também pode ser afetado, apresentando como efeitos colaterais dor abdominal e diarreia (mais de 1%) (144). Efeitos colaterais potenciais muito raros incluem insuficiência renal aguda, alopecia, anafilaxia, ansiedade, dor torácica, dispepsia, eczema, disfunção erétil, hiperbilirrubinemia, hipercalemia, hipotensão, insônia e síncope. A olmesartana também tem alguns efeitos colaterais raros com risco de vida, incluindo anafilaxia, angioedema e insuficiência renal grave (144).

Os pacientes não devem tomar olmesartan se apresentarem reações de hipersensibilidade anterior ao medicamento ou a qualquer componente da formulação. Além disso, o uso da olmesartana é contraindicado em pacientes com DM com uso concomitante de aliscireno (inibidor direto da renina), durante a gravidez, com insuficiência renal, hipotensão e pacientes hipercalêmicos (145). A olmesartana é especialmente teratogênico durante o segundo e terceiro trimestres, pois pode causar anúria (parada de eliminação de urina) e oligodrâmnio (redução de líquido na bolsa amniótica), levando a defeitos nos membros, hipoplasia pulmonar e anormalidades craniofaciais (146). Pacientes com história significativa de hipotensão

persistente também devem se abster de usar a olmesartana, pois pode aumentar o fluxo urinário e a natureza natriurética do medicamento (133).

A toxicidade da olmesartana é baixa. A toxicidade pode se manifestar com visão alterada, angina, vertigem, tontura, diaforese, hipotensão e taquicardia (147).

### 1.5.2 Piridoxamina

A piridoxamina (PYR) é um análogo estrutural da vitamina B6, cuja fórmula molecular é  $C_8H_{12}N_2O_2$ . Ela surgiu recentemente como uma droga promissora contra o aumento da modificação química oxidativa das proteínas do tecido e produção de produtos finais de glicoxidação e lipoxidação avançadas que ocorrem no DM e outras doenças, identificado com um potente agente anti-glicante (Fig. 1.13) (148–150).



**Figura 1.13:** Estrutura química da piridoxamina. Modificada de: (151).

Já foi visto que a PYR retarda a evolução da ND em modelos de animais com diabetes induzida por dieta (149). Em outro estudo, o tratamento com a PYR durante seis meses foi capaz de reduzir a alteração na creatinina sérica e a excreção de TGF- $\beta$ 1 em 212 pacientes com diabetes e ND (152). Elseweidy et al. demonstraram que além de reduzir os níveis de glicose sérica, creatinina, IL-1 alfa, IL-6, a proteína C reativa e microalbuminúria, a PYR diminuiu significativamente o conteúdo de malondialdeído renal e a expressão de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (153).

O mecanismo de ação do PYR *in vivo* e *in vitro* inclui, além da inibição da formação de AGEs, a eliminação de produtos tóxicos de radicais carbonil e a degradação de lipídios e a captura de espécies reativas de oxigênio (154). Em modelos animais, a PYR retarda o desenvolvimento da ND e reduz a albuminúria tanto em modelos animais de DM1 como DM2 (155). O tratamento com PYR também está associado à diminuição de dislipidemia, aterosclerose e hipercolesterolemia (154).

Em um modelo de rato com lesão renal aguda, o pré-tratamento com PYR causou uma redução na lesão tubular aguda dependente da dose, fibrose pós-lesão de longo prazo, bem como melhora na recuperação funcional após isquemia-reperfusão (156). A PYR inibiu o aumento da proporção lactato/piruvato plasmático em ratos diabéticos, sem afetar a glicemia ou hemoglobina glicada e também diminuiu significativamente o AGEs, como a carboximetilisina (CML) (157). A PYR elimina o MGO, impedindo assim a formação de AGEs (158,159).

A PYR inibe a oxidação de LDL catalisada por cobre e diminuiu a alta geração de superóxido induzida por glicose e a peroxidação lipídica em glóbulos vermelhos humanos (160). A PYR atua como quelante metálico e apresenta capacidade de eliminar espécies reativas de carbonila e EROS (161). O tratamento com PYR em células epiteliais tubulares proximais humanas HK-2 reduz o estresse oxidativo com incremento das atividades de glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase dependente de magnésio (MnSOD) e diminuição de EROS.

Em camundongos diabéticos induzidos pela superexpressão de ON sintase induzível (iNOS) nas células beta pancreáticas, o tratamento com PYR teve diminuição da expressão de IL-1b, proteína quimioatrante de monócito (MCP-1 e MCP-2), receptor de quimiocina CC tipo 2 (Ccr2), colágeno 1-a1 (Colla1) e diminuição da glomerulosclerose (162). Em estágios iniciais de lesão e disfunção renal dependente da dieta hiperlipídica, a PYR neutralizou a perda da borda em escova dos túbulos renais e a diminuição da degeneração vacuolar, além de reduzir a superativação das vias NF-kB e Rho/ROCK, interferindo em muitos níveis com a sinalização pró-fibrótica e cascatas inflamatórias (149).

Baseada na capacidade de antagonista de AT1 da olmesartana e inibição da formação de AGEs pela piridoxamina, o presente estudo visa avaliar se o tratamento conjunto utilizando os dois compostos é capaz de conferir maior proteção renal, quando comparado aos tratamentos isolados. Os resultados obtidos com esse estudo contribuirão na busca de estratégias terapêuticas mais eficazes para o manejo de indivíduos com ND.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar se o tratamento com olmesartana e piridoxamina confere maior proteção renal quando comparado ao tratamento isolado.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar e comparar os seguintes parâmetros, entre os grupos de animais estudados:

1. Perfil hemodinâmico e metabólico através de análise de pressão arterial sistólica, glicemia de jejum, peso corporal e peso do rim;
2. Parâmetros associados a disfunção renal diabética — polidipsia, poliúria e polifagia — através de análises em gaiola metabólica;
3. Perfil bioquímico através de dosagem de albumina, creatinina, uréia, ácido úrico fosfatase alcalina e frutossamina na urina e creatinina no soro;
4. Eritrograma completo: contagem de eritrócitos totais, quantificação de hemoglobina e hematócrito;
5. Parâmetros microcirculatórios incluindo o fluxo microvascular basal e em resposta a acetilcolina no rim utilizando a fluxometria laser-speckle;
6. Parâmetros histopatológicos no rim;
7. Parâmetros de estresse oxidativo no rim: dosagem de malondialdeído por TBARS e atividade de catalase;
8. Níveis de AGEs no soro, na urina e no rim através de espectroscopia de fluorescência.

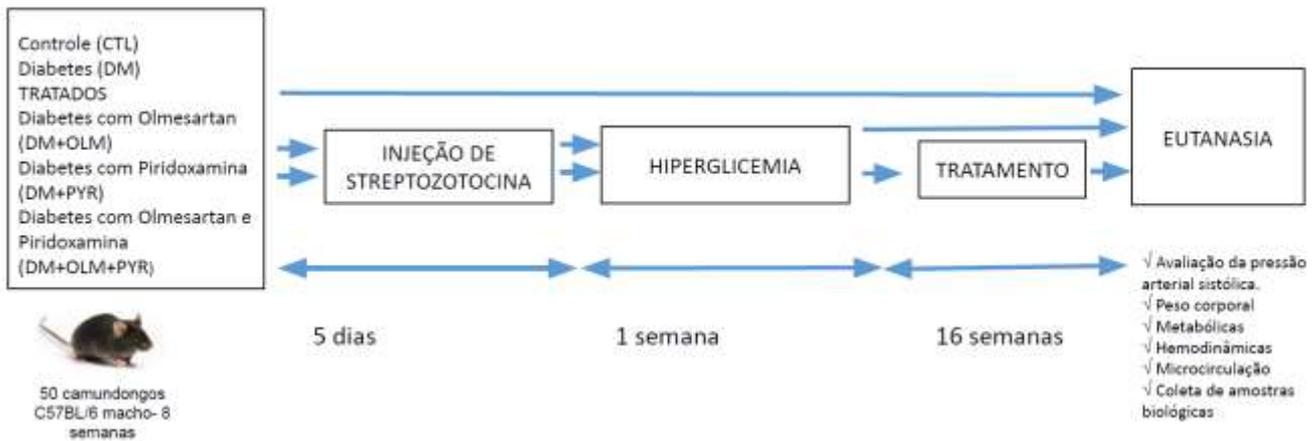
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 50 camundongos C57BL/6 machos pesando 18–22 g, com oito semanas de idade, providos pelo centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz). Os animais foram mantidos em gaiolas padrão com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e com ciclos de luz/escuro de 12h (início do escuro às 18h), na nona semana de idade se iniciou o protocolo experimental. Para induzir o diabetes tipo 1, os camundongos foram submetidos à injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (50 mg/Kg/dia) por 5 dias, diluído em tampão citrato (pH = 4,5) após jejum de 6 horas, enquanto os animais controle receberam o mesmo volume de tampão citrato. O nível de glicose no sangue foi monitorado nos dias 3 e 7 após a injeção de STZ usando um glicosímetro automático (One Touch Ultra 2, Johnson Medical S.A., Buenos Aires, Argentina).

Sete dias após a injeção de STZ, camundongos com glicose no sangue em jejum de 12 horas acima de 300 mg/dL foram considerados diabéticos e, em seguida, divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais: 1) Animais controle, submetidos ao tratamento com veículo (tampão citrato) por 16 semanas (CTL); 2) Animais diabéticos, submetidos a injeção com STZ e tratados com veículo por 16 semanas (DM); 3) Animais diabéticos tratados com olmesartana (20 mg/Kg/dia, via oral) por 16 semanas (DM+OLM); 4) Animais diabéticos tratados com piridoxamina (400 mg/Kg/dia, via oral) por 16 semanas (DM+PYR) e 5) Animais diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (20 mg/Kg/dia e 400 mg/Kg/dia, respectivamente, v. o.) por 16 semanas (DM+OLM+PYR).

As análises de pressão arterial, peso, glicemia e microcirculatórias foram realizadas ao final do protocolo experimental. Após todas as avaliações, os animais sob anestesia (quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, intraperitoneal) foram sujeitos a punção cardíaca no ventrículo esquerdo, que foi acessado pelo lado esquerdo do tórax para coleta de sangue total e coleta dos rins direito e esquerdo (Fig. 3.1). Para separar o soro, o sangue foi colocado em mini tubos de 0,5 ml com gel separador; após retração do coágulo o soro foi separado por centrifugação a 700xG durante 15 min a 4°C e as alíquotas de soro foram armazenadas a -80°C para as análises posteriores. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pelo comitê de ética de uso animal (Licença L-012/2018 A1L) do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz (Anexo 1).



**Figura 3.1: Desenho experimental do presente projeto.** Indução de diabetes tipo 1 por injeção de streptozotocina (STZ), tratamento por 16 semanas, seguidas de análises de hemodinâmica e microcirculatórias e, ao fim, a eutanásia para a análises bioquímicas. Fonte : Flores., E.E.I..

### 3.2. Avaliação da pressão arterial

Foi realizada através de medida da pressão arterial não invasiva na cauda dos animais por técnica de fotopletimografia com aquisição automática de dados (BP-2000, Visitech *blood pressure analysis system*, EUA). Antes da primeira aferição, os animais foram adaptados por 20 minutos durante 3 dias alternados no recipiente de contenção para minimizar o estresse e a possível variação de pressão arterial. O protocolo para aferição iniciou com um prévio aquecimento dos animais a uma temperatura de 36°C durante 20 minutos, em uma estufa com temperatura controlada. Posteriormente, os animais foram colocados no aparelho para a aferição da pressão arterial. Foram feitas duas medidas nos dias que antecederam as análises terminais e a eutanásia, e os resultados foram expressos em médias das duas análises.

### 3.3. Eritrograma

#### 3.3.1 Contagem de eritrócitos

A contagem do número total de eritrócitos por  $\text{mm}^3$  foi feita em câmara de Neubauer. O sangue em EDTA foi diluído em líquido de Gower (1:200, v/v) com pipeta hematimétrica para glóbulos vermelhos. Após a sedimentação da amostra na câmara de Neubauer, a contagem foi feita em microscópio de luz (MEIJI Techno, Japão) em objetiva de 40x. As hemácias foram contadas em cinco campos no quadrante central (a câmara de Neubauer é composta de 25

quadrados menores contendo 16 quadrados cada um, delimitados pelas linhas triplas, e os 25 quadrados correspondem à 1 mm<sup>2</sup>). O cálculo para a microdiluição foi: 200 x 5 x 10 x hemácias contadas = hemácias contadas x 10.000 = hemácias x 10<sup>6</sup> /mm<sup>3</sup>(163).

### **3.3.2 Determinação de hemoglobina**

Em um tubo de ensaio foi pipetado 5,0 mL de reativo de Drabkin e colocado 20 µl de sangue total homogeneizado. Após incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 540 nm, zerando o aparelho com Drabkin. A leitura padrão foi realizada com Cianeto de Potássio (KCn) (10 g/dL). Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula: concentração da amostra (ConcA) = absorvância da amostra (AbsA) X concentração do padrão (ConcP g/dL)/ absorvância do padrão AbsP. (163)

### **3.3.3. Hematócrito**

O tubo capilar foi preenchido com sangue até ¾ da sua altura. Uma das extremidades foi fechada com massa de modelar e o capilar colocado em uma centrífuga apropriada para microhematócrito. O material foi centrifugado por 5 minutos em 12000 g e a leitura realizada.

## **3.4. Gaiola metabólica**

Durante a semana anterior à eutanásia, os camundongos foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas por 24 horas para determinar o volume da urina e a ingestão de água e ração. As amostras de urina foram centrifugadas para remover os resíduos e o sobrenadante foi dividido em alíquotas e armazenado a -80 ° C para uso posterior.

## **3.5. Parâmetros microcirculatórios**

A avaliação de fluxo sanguíneo microvascular foi realizada no rim por fluxometria por Laser Speckle (sistema Pericam PSI, Perimed, Suécia) (164). O fluxo foi avaliado no rim antes e depois da administração de acetilcolina 2%. Os animais sob anestesia tiveram o rim exposto cirurgicamente e colocados sob um sistema de aquisição de imagens por laser Speckle com comprimento de onda de 785 nm, para medida contínua da perfusão sanguínea tecidual em tempo real. Foram feitas 16 imagens/seg. As imagens foram analisadas utilizando o software do

fabricante (Perimed). Uma área de aproximadamente 2,0 cm foi avaliada para determinar o fluxo sanguíneo em unidades de perfusão arbitrária (UPA) (165).

### **3.6. Medição glicemia de jejum**

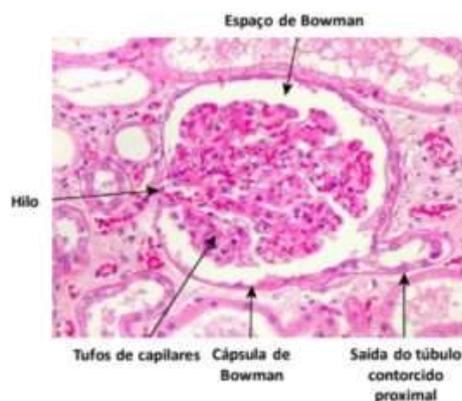
Após 16 semanas de tratamento, alíquotas de sangue foram coletadas da ponta da cauda dos animais em jejum de 12 horas para análise dos níveis de glicose utilizando um glicosímetro (One Touch Ultra 2, Johnson Medical S.A., Buenos Aires, Argentina) (Mikus *et al.*, 2010).

### **3.7. Marcadores bioquímicos**

No soro foram avaliados os níveis de creatinina, através de método cinético colorimétrico. Na urina de 24 horas foram determinados por método colorimétrico, os níveis de albumina, frutossamina, ferro, por métodos enzimático colorimétrico a uréia e o ácido úrico, e por método cinético a fosfatase alcalina, o gama glutamil transferase (GGT). Para todas as avaliações foram utilizados kits comerciais específicos (Bioclin, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e analisados por espectrofotometria. A razão albumina/creatinina foi calculada como  $ACR = \text{albumina urinária}/\text{creatinina urinária}$  (mg/g).

### **3.8. Histopatologia**

Os rins foram fixados em solução de formalina tamponada com fosfato Millonig (pH 7,2), processados segundo protocolo histológico de rotina para desidratação e a diafanização e então embebidos em parafina (Paraplast plus, Sigma-Aldrich, USA). Os cortes em parafina (5  $\mu\text{m}$ ) foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e então visualizados com um microscópio de luz (MEIJI Techno, Japão), com objetivo de 40 X. Para quantificar as alterações glomerulares, foram avaliados 50 glomérulos por animal (n=5-6 animais/grupo), e quantificada a (a) área glomerular, (b) área do tufo glomerular e (c) área do espaço de Bowman, utilizando o software Image J. Cada área específica do glomérulo foi demarcada através da marcação do contorno utilizando o imagem J, e a área correspondente foi então calculada pelo programa (166).



**Figura 3.15: Imagem representativa de histopatologia do glomérulo renal, demonstrando as áreas analisadas: área glomerular, tufos glomerulares ou capilares e espaço de Bowman.** Fonte: Johnson, 2016. <https://www.sanarmed.com/doencas-glomerulares>

### 3.9. Níveis de AGEs através de fluorescência

A quantificação de AGEs no rim foi realizada segundo o método de Nakayama et al. 1993. Resumidamente, frações de tecido cortado foram incubados com clorofórmio (2:1, v/v) durante 16h. Após a lavagem, o tecido foi homogeneizado em NaOH 0,1N, seguido de centrifugação a 8.000 g, por 14 min, à 4°C. A quantidade de AGE foi então determinada medindo a fluorescência com filtro de emissão de 440 nm e excitação de 370 nm. Solução de albumina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL em NaOH 0,1N) foi usada como padrão e sua intensidade de fluorescência definida como 1 unidade de fluorescência. Os valores de fluorescência das amostras foram medidos utilizando 1 mg/mL de proteína de cada amostra e expressos em unidades arbitrárias (UA) relativas a preparação padrão de BSA (167).

A medição de AGEs em amostras de soro e urina foi medida a 440 nm após excitação a 370 nm, em amostras diluídas em 1:10 e 1:20, respectivamente, em solução tamponada com fosfato. A taxa de excreção urinária de AGEs também foi calculada como UA por 1g de creatinina urinária (168,169).

### 3.10. Estresse oxidativo no tecido renal

O estresse oxidativo no rim foi avaliado utilizando a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato salino (PBS) gelado (pH 7.4) em hidroxitolueno butilado (BHT) (concentração final 0,2%). As amostras (0,5 mL) foram misturadas 1:1 com o mesmo volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e aquecidas a 96°C, por 30 min. As amostras foram lidas a 535 nm no leitor

SpectraMax Plus (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em níveis de malondialdeído (MDA,  $\epsilon=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). (170)

### **3.11. Catalase**

Este teste consiste em medir a diminuição da absorbância no comprimento de onda a 240 nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Para preparação da amostra, 100 mg de tecido (córtex renal) foi homogenizado em 1 mL de tampão fosfato de potássio (KPE), centrifugado à 4°C, por 10 min, a 600 g. O sobrenadante foi retirado e a concentração de proteína dosada. Para a realização deste ensaio, foi preparado um mix composto por 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) a 50mM (pH 7,4) e 1,6 mL de peróxido de hidrogênio (0,3 M). Foi utilizada uma placa ultravioleta (UV), sendo colocado em cada poço 3,0  $\mu\text{l}$  de amostra e 97  $\mu\text{l}$  do mix, obtendo um volume final de 100  $\mu\text{l}$  para cada poço. A leitura foi realizada em leitor de ELISA, durante 60 segundos ( $\Delta t = 30$  segundos), no comprimento de onda 240 nm (171). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

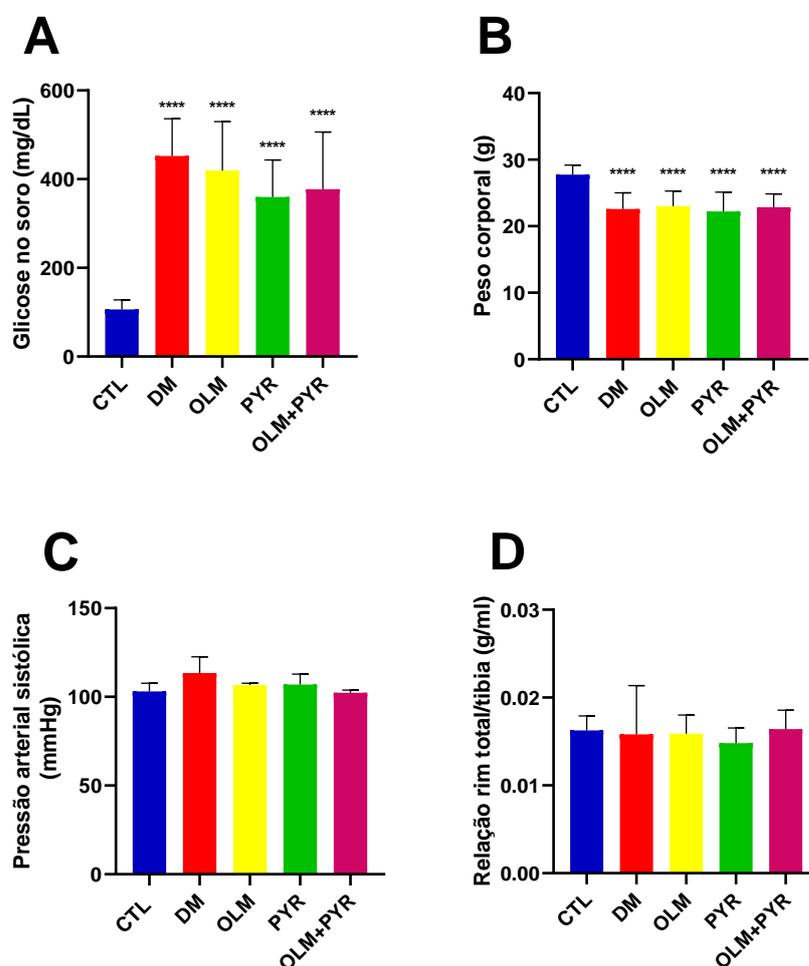
### **3.12. Análise estatística**

Os dados foram expressos em média e desvio padrão (DP). As análises entre grupos foram feitas utilizando ANOVA de um fator. O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi utilizado, e para dados que não seguiram a distribuição normal, a comparação entre grupos foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para teste paramétricos, o teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. Os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Foi considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

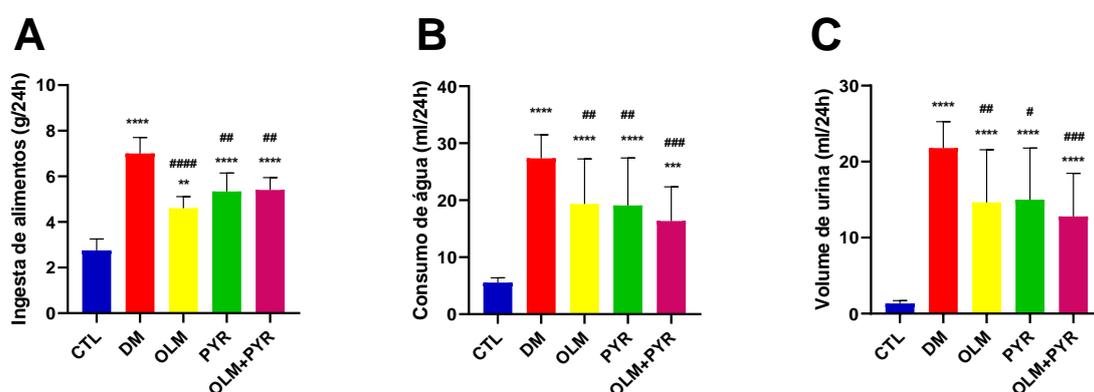
### 4.1. Metabolismo e hemodinâmica

Os níveis de glicose no sangue em jejum foram maiores no grupo DM quando comparado ao grupo CTL, e nenhum dos tratamentos estudados apresentou melhora nesse parâmetro (Fig. 4.16A). Camundongos do grupo DM apresentaram uma perda de peso quando comparado ao CTL, alteração essa que não foi prevenida por nenhum dos tratamentos avaliados (Fig. 4.16B). A pressão arterial sistólica e o peso do rim/tíbia não foram diferentes entre os grupos analisados (Fig. 4.16C e 4.16D, respectivamente).



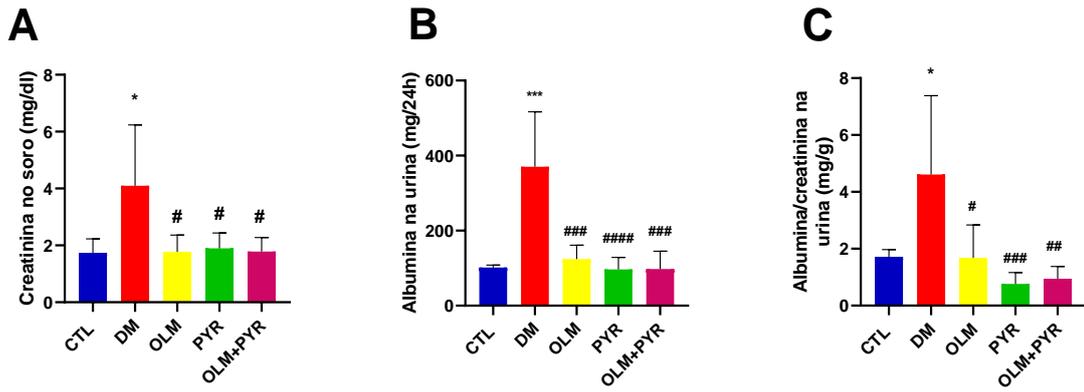
**Figura 4.16:** Valores de glicose no sangue em jejum (A), peso corporal (B), pressão arterial sistólica (C) e peso do rim/tíbia (D) de camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vc CTL.

A ingestão de alimentos foi significativamente aumentada em camundongos diabéticos quando comparados com camundongos não diabético (Fig. 4.17A), caracterizando polifagia. Nos grupos tratados, houve uma diminuição significativa de ingesta quando comparado aos animais DM (Fig. 4.17A). Os animais com DM apresentaram polidipsia, evidenciado pelo aumento de consumo hídrico e o tratamento com OLM, PIR ou OLM+PIR foram capazes de prevenir parcialmente essa alteração (Fig. 4.17B). A excreção de urina foi significativamente aumentada no grupo DM, indicando poliúria e prevenido parcialmente por todos os esquemas de tratamentos propostos (Fig. 4.17C)



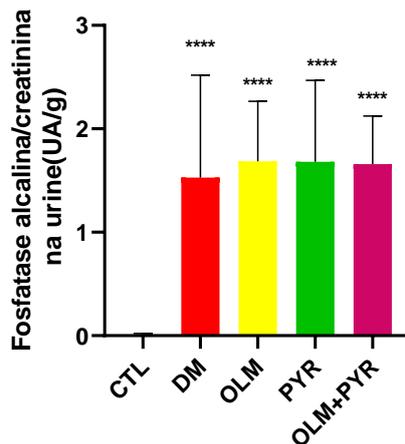
**Figura 4.17:** Parâmetros metabólicos: ingesta de alimentos (A), consumo de água (B) e volume de urina (C) em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vs CTL, ####  $P < 0,001$ , ##  $P < 0,01$  e #  $P < 0,5$ , vs DM.

Para avaliar a função renal foi analisado os parâmetros de concentração creatinina no soro, albuminúria e ACR em urina de 24 horas. Os camundongos diabéticos apresentam um aumento da concentração de creatinina no soro (Fig. 4.18A), albuminúria (Fig. 4.18B) e ACR (Fig. 4.18C) quando comparados com camundongos não diabéticos. Após o tratamento com OLM, PIR ou OLM+PIR, houve uma diminuição significativa de creatinina no soro (Fig. 4.18A), da albuminúria (Fig. 4.18B) e da ACR (Fig. 4.18C) quando comparado aos animais DM.



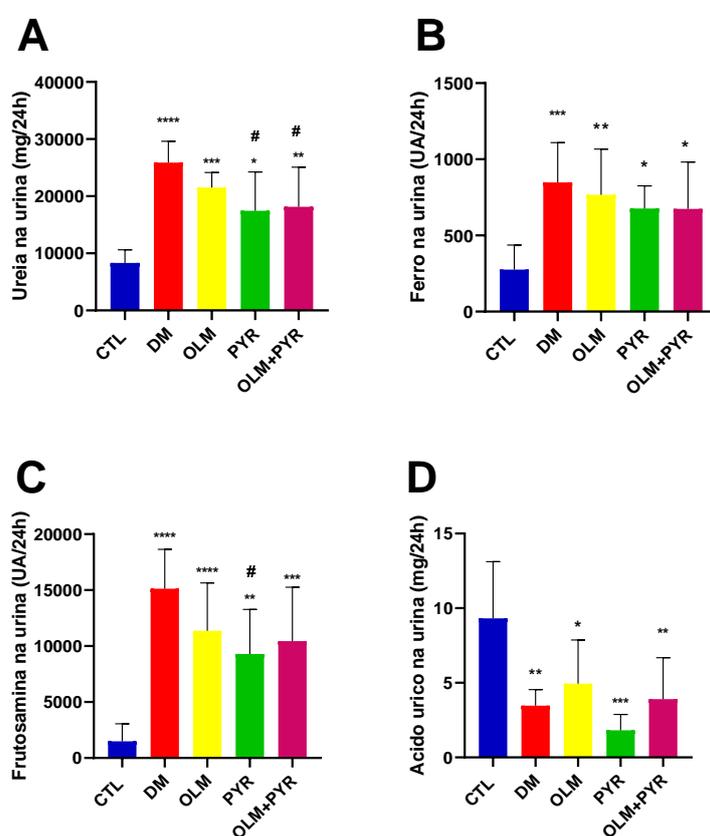
**Figura 4.18:** Parâmetros de função glomerular renal creatinina no soro (A), albumina na urina (B) e relação albumina/creatinina (C) em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). \*\* $P < 0,01$ , \* $p < 0,5$  vs CTL, ###  $P < 0,001$ , ##  $P < 0,01$  e #  $P < 0,5$  vs DM.

Para avaliar a função tubular determinamos a relação fosfatase alcalina/creatinina. Camundongos diabéticos exibiram aumento da relação fosfatase alcalina/creatinina na urina 24 horas (Fig.4.19), alteração essa que não foi prevenida pelos tratamentos avaliados.



**Figura 4.19:** Parâmetro de função tubular fosfatase alcalina/creatinina em urina 24h em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vs CTL.

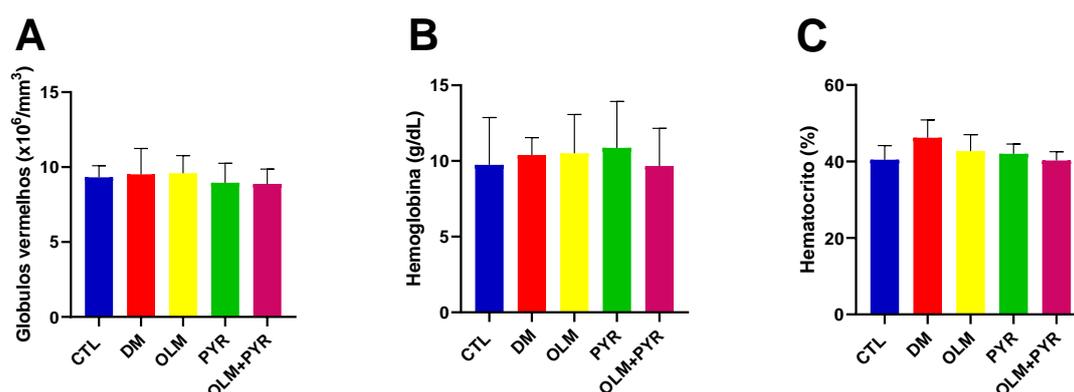
A concentração de uréia, ferro, frutossamina e ácido úrico foram avaliados na urina 24 horas. A concentração ureia na urina também avalia o funcionamento do ducto coletor medular no rim. Em relação ao grupo CTL, animais diabéticos apresentaram aumento de uréia na urina, o que foi modulado apenas pelos tratamentos que continham a piridoxamina (Fig. 4.20A). O ferro na urina 24 horas do grupo diabético foi significativamente elevado quando comparado com o controle não diabético e os tratamentos com piridoxamina ou olmesartana ou combinado não preveniu esse aumento (Fig. 4.20B). A frutossamina na urina 24 horas do grupo diabético estava significativamente elevada no grupo DM, e nos grupos tratados com OLM, e OLM+PYR, enquanto que foi parcialmente diminuído no grupo PYR (Fig. 4.20C). O ácido úrico na urina 24 horas dos grupos DM e grupos tratados foi significativamente diminuído em relação ao CTL (Fig. 4.20D).



**Figura 4.20:** Valores dos metabólitos uréia (A), ferro (B), frutossamina (C) e ácido úrico (D) em urina 24h em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). Todos os tratamentos e veículos foram feitos durante 16 semanas. \*\*\*\*  $P < 0,0001$  \*\*\* $P < 0,001$  \*\* $P < 0,01$  vs CTL, #  $P < 0,5$  vs DM.

## 4.2. Eritrograma

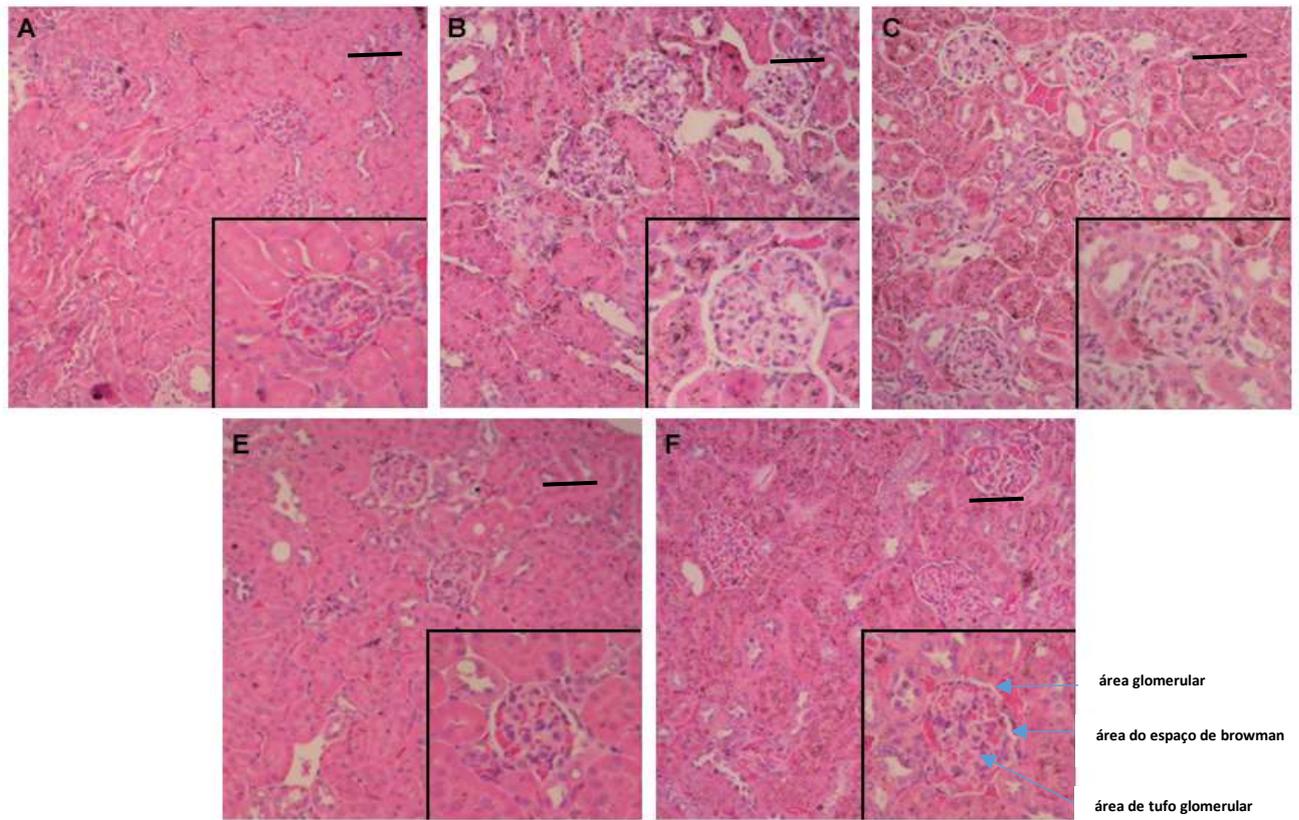
Para averiguar possível quadro de anemia a análise do eritrograma foi realizada, determinando no soro a quantidade de glóbulos vermelhos, a concentração de hemoglobina e hematócrito. Todos os parâmetros avaliados apresentaram resultados semelhantes entre os grupos estudados (Fig. 4.21A-C).



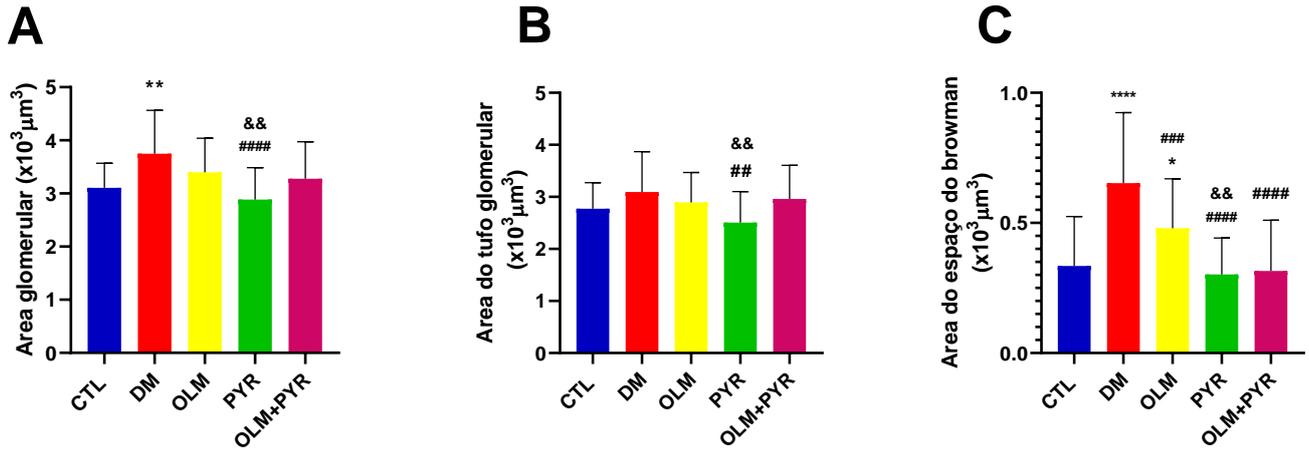
**Figura 4.21:** Valores da série vermelha, glóbulos vermelhos (A), hemoglobina (B) e hematócrito (C) em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR).

## 4.3. Morfologia renal

Nas análises histológicas do rim, observou-se que a área da superfície glomerular foi significativamente aumentada em camundongos diabéticos em comparação com camundongos CTL (Fig. 4.22 e Fig. 4.23A). A área glomerular também esteve aumentada nos grupos tratados com OLM e OLM+PYR, entretanto no grupo PYR se apresentou menor do que o grupo DM e do que o grupo OLM (Fig. 4.22 e 4.23A). O mesmo padrão foi observado para a área do tufo glomerular (Fig. 4.22 e 4.23B). O grupo DM mostrou aumento significativo do espaço de Bowman quando comparado com camundongos CTL e o tratamento com olmesartana apresentou proteção parcial, enquanto os grupos que receberam PYR apresentaram reduções a nível do CTL (Fig. 4.22 e 4.23C).



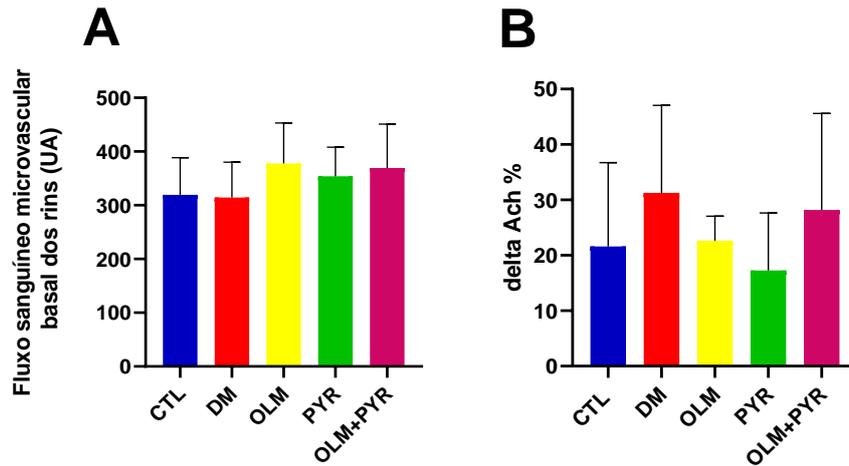
**Figura 4.22:** Parâmetros histológicos do rim (área glomerular, área do espaço de browman e área de tufo glomerular) corado em HE. Animais controle (A), com diabetes (B), tratados com olmesartana (C), tratados com piridoxamina (D) e tratados com olmesartana e piridoxamina (E). Barra de escala = 50  $\mu$ m (40X)



**Figura 4.23:** Parâmetros histológicos do rim incluindo a área glomerular (A), área de tufo glomerular (B) e área do espaço de Bowman (C) em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). Todos os tratamentos e veículos foram feitos durante 16 semanas. \* vs CTL; # vs DM e & vs OLM \*\*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01 vs CTL, ##### P<0,001 ### P<0,001 ## P<0,01 vs DM e && P<0,01 vs OLM.

#### 4.4. Fluxo sanguíneo renal

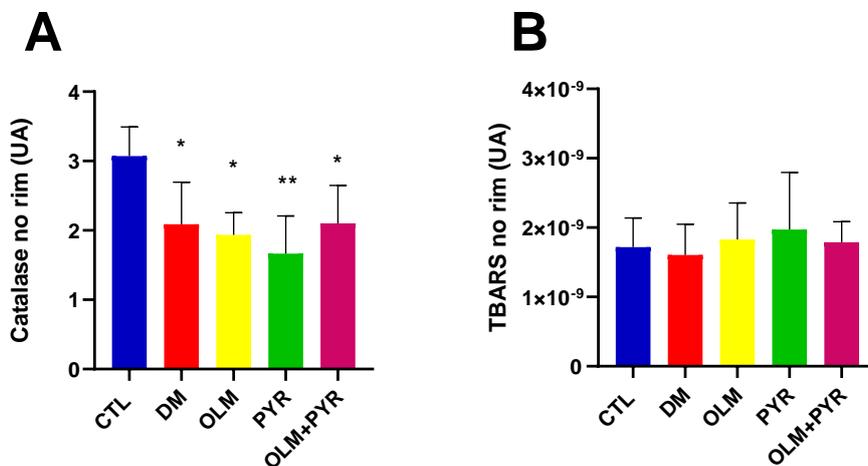
Não houve diferença entre o fluxo microvascular renal basal e nem em resposta a acetilcolina (ACh) entre os grupos avaliados (Fig. 4.24A e B).



**Figura 4.24:** Valores do fluxo sanguíneo microvascular (A) e variação do fluxo em resposta à acetilcolina (B) em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR).

#### 4.5. Estresse oxidativo

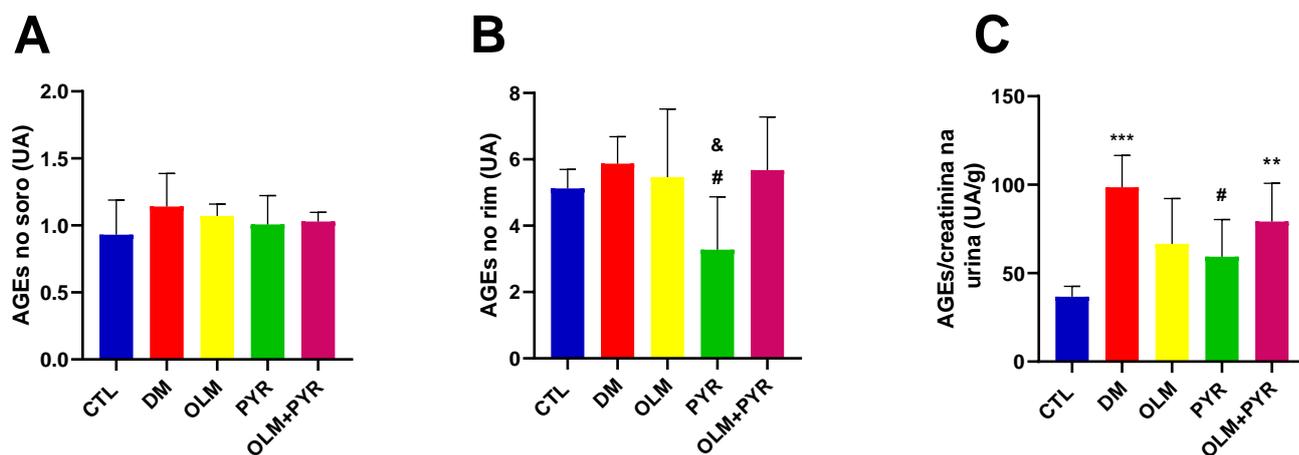
A avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, como a enzima antioxidante catalase e a peroxidação lipídica por TBARS foram realizadas no córtex renal. Animais DM, com ou sem tratamentos, apresentaram redução nos níveis de atividade da catalase (Fig. 4.25A). Em relação a peroxidação lipídica não houve diferença entre os grupos (Fig. 4.25B).



**Figura 4.25:** Valores da atividade da catalase (A) e TBARS (B) na área cortical do rim em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). \* $p < 0,5$  vs CTL..

#### 4.6. Produtos finais de glicação avançada

O nível dos AGEs no soro foi similar entre os grupos avaliados (Fig. 4.26A). Na urina, os níveis dos AGEs se apresentaram diminuídos no grupo PYR, quando comparados ao grupo DM e OLM (Fig. 4.26B). Na figura 4.26C está demonstrada a avaliação dos níveis dos AGEs na urina corrigidos pelos níveis de creatinina, onde é possível observar que houve um aumento no grupo DM e OLM+PYR em comparação com o CTL, efeito esse que foi prevenido pelo tratamento com PYR (Fig. 4.26C).



**Figura 4.26:** Níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs) no soro (A), no rim (B) e relação AGE/creatinina na urina (C) em camundongos controle não diabéticos (CTL), camundongos diabéticos tratado com veículo (DM), camundongos diabéticos tratados com olmesartana (OLM), camundongos diabéticos tratados com piridoxamina (PYR) e camundongos diabéticos tratados com olmesartana e piridoxamina (OLM+PYR). \* vs CTL; # vs DM e & vs OLM. \*\*\* $P < 0,001$  vs CTL, #  $P < 0,5$  vs DM e &  $P < 0,5$  vs OLM.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que camundongos C57BL/6 que receberam administração de STZ desenvolveram diabetes tipo 1 com doença renal, caracterizado pela presença de creatinina aumentada, albuminúria e ACR elevada. Além disso, estudamos os efeitos do tratamento isolado com piridoxamina ou olmesartana e em conjunto para o tratamento da ND (172,173). A discussão do presente trabalho será dividida em dois blocos, no primeiro bloco discutiremos as alterações observadas em decorrência do quadro de diabetes nos animais e no segundo bloco discutiremos os dados relacionados aos tratamentos propostos.

Em relação ao modelo de diabetes, observamos hiperglicemia e diminuição de peso. Sabe-se que a STZ é uma droga que destrói as células beta pancreáticas levando a uma deficiência na produção de insulina para posteriormente causar uma hiperglicemia e perda de peso, características de um quadro de DM1 (174). A falta de insulina leva à diminuição da utilização periférica da glicose e acúmulo de lipídios devido a falta da atividade dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT-4), que são dependentes de insulina e encontrados principalmente nas células musculares (esqueléticas, cardíacas) e adipócitos do tecido adiposo (175). Os transportadores de glicose não dependentes de insulina, como o SGLT e o GLUT-2, transportam glicose para o interior das células à favor do gradiente e se encontram em células tubulares, pâncreas e fígado (176–178). A falta de insulina, além de causar a hiperglicemia e perda de peso, provoca a poliúria (urina frequente), o aumento da ingestão hídrica e a polifagia, reações controladas pelo hipotálamo, através do sistema nervoso autônomo (179,180), e que foram observadas no nosso modelo experimental de diabetes induzido com STZ (180).

O aumento da pressão arterial sistólica (PAS) foi observada em modelos de camundongos deficientes em HIF-1 $\alpha$  e tratados com injeção de STZ (181), entretanto em nosso estudo observamos que os animais com diabetes apresentaram PAS similar aos animais controle, o que também já foi observado em outros estudos (181,182). No estudo de Gurley et al.. (2006) foi demonstrado que algumas cepas de camundongos, incluindo a C57BL/6 apresentaram resistência ao desenvolvimento de hipertensão arterial induzido por STZ, e discutem que isso pode ter ocorrido por conta de uma excessiva diurese e consequente diminuição de volemia (183), o que também pode explicar o resultado encontrado em nosso presente estudo.

Os animais diabéticos apresentaram aumento de marcadores bioquímicos incluindo a creatinina no soro, albumina, ACR, fosfatase alcalina, frutossamina, uréia e ferro na urina, conforme já demonstrado na literatura (184–189). De forma interessante a fosfatase alcalina tem

sido atualmente descrita como um fator de risco independente para disfunção renal na diabetes (190,191)

Em relação à ureia, é consenso que níveis mais elevados de ureia estão associados a diminuição da sensibilidade à insulina, afetando a secreção da insulina, e estão associados a um risco aumentado de diabetes (192,193). A ureia é um produto final do catabolismo proteico do fígado, com massa molecular de 60 KDa. A ureia é filtrada pelo glomérulo e em seguida é reabsorvida passivamente nos túbulos proximal e distal no trânsito através do ducto coletor medular interno do rim (194,195). A maior permeabilidade da ureia ocorre no ducto coletor da medula e a permeabilidade é diminuída no túbulo proximal (194). Estudos de D'Apolito et al. (2009) sugerem que adipócitos cultivados e tratados com ureia (em concentrações relevantes para a doença) exibiram sensibilidade à insulina diminuída (196). Em um modelo de rato de insuficiência renal induzida cirurgicamente, os ratos urêmicos exibiram resistência à insulina e intolerância à glicose (197). Observações de Koppe et al. (2016) e Thomas et al. (2015) sugerem que a secreção defeituosa de insulina na doença renal crônica (DRC) é mecanicamente causada por níveis elevados de ureia circulante, uma condição que se manifesta em estágios avançados da doença (198). O principal mecanismo de entrega de ureia ao interstício medular interno é mediada pelas proteínas transportadoras de ureia UT-A1 na membrana plasmática apical e UT-A3 na membrana basolateral (199). Camundongos nocauteados para transportadores de ureia UT-A1 e UT-A3, não apresentaram ureia na urina, demonstrando que estes transportadores de ureia desempenham um papel importante na concentração urinária de ureia (200). Em ratos tratados com STZ que desenvolvem DM1, foi mostrado que o aumento na excreção de ureia (201) pode estar relacionado a atividade aumentada da proteína UT-A1 na medula renal (202). A atividade aumentada da proteína UT-A1 na medula interna do rim de rato diabético (203) e em ratos tratados com STZ que desenvolvem DM1 apresentam relação com uma diurese osmótica característica, além do aumento na excreção de ureia (204). A ureia causa a hiperosmolaridade, que por sua vez, induz a expressão gênica de fatores de transcrição como Egr-1 (205), ao mesmo tempo em que pode levar a doença renal crônica na ND (206).

Encontramos alta concentração de ferro na urina de camundongos diabéticos. O ferro desempenha um papel importante na manutenção da homeostase fisiológica (no transporte de oxigênio e nas reações enzimáticas). Megalin medeia a recaptção de ferro filtrado pelo glomérulo nos túbulos proximais pelo sistema endo-lisossomal em células epiteliais tubulares proximais (PTECs) (207). O excesso de ferro pode levar a danos teciduais por meio da reação de fenton, que resulta na criação de radicais hidroxila de peróxido de hidrogênio catalisado por ferro (208). A ferroapoptose é um novo tipo de morte celular programada e é desencadeada pelo

acúmulo excessivo de hidroperóxidos lipídicos. A ferroapoptose na ND causa distúrbios inflamatório, implicados na progressão da doença renal (209,210). Em pacientes com diabetes a excreção urinária de ferro estava acima do limite superior do normal (211), além disso, a relação Fe/UFe (ferro urinário) foi menor na DM1 do que nos outros grupos, indicando maior excreção de ferro (212). Em camundongos diabéticos induzidos por STZ, a hiperglicemia aumenta o acúmulo de ferro e a senescência celular nas células do túbulo proximal, o que por sua vez causa a infiltração de macrófagos (213). A hemoglobina livre de células, o heme e o ferro, que são liberados dos glóbulos vermelhos quando lisados, induzem a ativação das respostas imunes inatas e das vias inflamatórias que afetam as funções celulares e orgânicas. Esses efeitos são limitados por fatores de proteção, como haptoglobina, hemopexina e apotransferrina, que eliminam, respectivamente, a hemoglobina livre, heme e o ferro (214). A diminuição da haptoglobina (Hb2) está associada ao aumento da deposição de ferro (215), que também afeta os receptores da vitamina D (VDR) nos túbulos proximais, na ND (216).

Em nosso modelo também encontramos uma diminuição de ácido úrico na urina de diabéticos. O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas e é reabsorvido e excretado em grande parte pelos rins (217). Cerca de 90% do ácido úrico é reabsorvido pelo túbulo contorcido proximal pelos transportadores de urato 1 (URAT1) e transportador de glicose 9 (GLUT9) (218,219). A concentração de AU na urina está principalmente associada a um desequilíbrio entre a produção e excreção desse metabólito (220). Xantina oxidase (XOD) catalisa a oxidação de hipoxantina e xantina em AU (221), que tem sido um dos alvos terapêuticos de drogas redutoras de urato, como o alopurinol (AP). No sangue, o AU é o primeiro filtrado através dos glomérulos no rim, seguido por 90% sendo reabsorvido através dos túbulos convolutos proximais via URAT1 (222,223) e transportador basolateral de glicose 9 (GLUT9) (224). O rim contribui com 75% da excreção de UA, e 90% dos casos de hiperuricemia são causados pela excreção reduzida de urato em vez de produção endógena excessiva. O ácido úrico pode atuar dentro da célula como pró-oxidante e um ambiente extracelular se comporta como antioxidante (225). No entanto, a relação entre diabetes mellitus e hiperuricemia ainda é motivo de controvérsia. Embora vários estudos tenham relatado hiperuricemia como um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus, especialmente no contexto de resistência à insulina, outros sugeriram que pacientes com diabetes diagnosticado recentemente tendem a ter ácido úrico sérico mais baixo do que os pré-diabéticos ou normoglicêmicos (226–229). Hipouricemia foi observada em ratos com diabetes induzidos por dieta rica em gordura e STZ (230).

Em relação a frutossamina, sabe-se que esta é uma cetoamina formada pela glicação de proteínas plasmáticas, principalmente albumina, mas também imunoglobulinas e outras proteínas (231). Nas células tubulares, a reabsorção de glicose pelo cotransportador sódio glicose leva ao aumento de glicose nas células tubulares, levando a formação de frutossamina. Existe uma via para a remoção da frutossamina e prevenção da formação de AGEs, catalisada pela frutossamina-3-quinase (FN3K) (232). A FN3K é uma enzima intracelular expressa em tecidos mais propensos à glicação, como coração, nervos e rins (233). O aumento de frutossamina na urina pode ser observada em decorrência do aumento de produção, por aumento de glicação em decorrência da hiperglicemia, ou então por defeitos na depuração de frutossamina. A diminuição da atividade ou falta da atividade da FN3K pode ocorrer por disfunção das mitocôndrias (234,235). A inativação genética de FN3K em camundongos leva a aumentos marcantes na glicação de proteínas e na excreção urinária de frutose- $\epsilon$ -lisina (236). RNAs de FN3K foram detectados especialmente elevados em tecidos suscetíveis a complicações diabéticas, como rins, coração, nervos do sistema periférico e central (237). FN3K é encontrado em maior concentração em rim humanos, de ratos e camundongos quando comparado com outros (238). Em condições em que a medição de HbA1c não é confiável a frutossamina é um biomarcador glicêmico alternativo recomendado (239) e o valor da frutossamina no soro refletem a glicemia média nas últimas 2-3 semanas (240). A frutossamina e a albumina glicada estão fortemente associadas ao diabetes e suas complicações microvasculares e complementam a utilidade prognóstica da HbA1c (241) e são fatores de risco para mortalidade e morbidade em pacientes em hemodiálise (242).

Observamos também diminuição de catalase nos animais com diabetes quando comparados com os animais controle. A catalase é uma importante enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e desempenha um papel nos mecanismos de defesa antioxidante celular. A enzima está localizada na matriz de peroxissomos em células de mamíferos. O estresse oxidativo intrarrenal desempenha um papel crítico no início e progressão da doença renal diabética, em decorrência da superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS) (243,244). Em nosso estudo, é possível que a diminuição da atividade da catalase esteja associada a uma sobrecarga de atividade demandada por excesso de depuração de radicais oxidativos. Sabe-se que a deficiência de catalase acelera a lesão renal diabética por meio da disfunção peroxissomal (245–247). Foi reportado que a deficiência de catalase contribui para o aumento da lesão túbulo-intersticial e fibrose em um modelo murino (248,249). Associações dos polimorfismos do gene da catalase foram associadas à prevalência e incidência de ND e ESRD em pacientes com DM1 (250).

De forma interessante, os animais com diabetes apresentaram um aumento significativo de excreção dos AGEs na urina. Estudos clínicos em pacientes com diabetes demonstram uma forte correlação entre o acúmulo de AGEs e gravidade das complicações renais em pacientes com DM1 (251). Os AGEs contribuem potencialmente para diversos fenômenos, incluindo (a) alteração da matriz extracelular (MEC); (b) alteração célula-matriz, (c) matriz-matriz; (d) aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, (e) ativação de NADPH oxidase; (f) disfunção mitocondrial, (g) indução de citocinas e fatores de crescimento, incluindo TGF- $\beta$ 1, CTGF, VEGF, IGF-1, PDGF TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e ativação de vias celulares (via PKC-MAPK, via da tirosina quinase e NF- $\kappa$ B) (252). Os AGEs contribuem significativamente para as complicações microvasculares do diabetes (253) e sua síntese e a excreção renal em diabéticos refletem a insuficiência renal (254). Foi demonstrado que os níveis de CML urinária foram positivamente associados à obesidade e marcadores de resistência à insulina, enquanto os níveis urinários de MG-H1 foram associados com doenças cardiovasculares (255). Concentrações urinárias de pentosidina e pirralina foram significativamente maiores nos pacientes com DM1 do que nos controles saudáveis (256). Na ND a formação de AGEs no rim contribuí na alteração da estrutura morfológica e funcional das células do néfron (257). Nas células podocitárias, os AGEs inibem a expressão de neuropilina-1, um receptor transmembrana envolvido na adesão celular com a membrana baso-glomerular (MBG). AGEs exercem efeitos pró-apoptóticos e pró-inflamatórios em podócitos, através da ativação mediada por CXCL9 da via JAK2/STAT3 (258). A via AGEs-RAGE ativa a tradução do sinal NF- $\kappa$ B, aumenta a expressão de moléculas inflamatórias, fibróticas e reduz a proteção contra estresse oxidativo, via inibição da oxido nítrico sintase (259). Nas células mesangias, a ativação da via AGE-RAGE induz a produção de vários componentes da matriz extracelular como colágeno IV e fibronectina. Nas células do epitélio fenestrado, a via AGEs-RAGE, via ativação de, de NF- $\kappa$ B, induzindo a expressão e síntese de ICAM, VCAM, VEGF e seletina (260). Dessa forma, a via AGE-RAGE tem papel importante na ND, e diminuir seus efeitos deletérios é de suma importância para o tratamento dessa doença.

Histologicamente, demonstramos que houve aumento de área glomerular e do espaço de Bowman, alterações estruturais clássicas da disfunção renal na diabetes (261–263).

O tratamento com inibidores do SRAA, como os iECA e os BRAs (264)(265) têm sido usados para o tratamento da ND, e seu efeito renoprotetor é atribuído à capacidade de normalizar a hiperfiltração glomerular (266). Além da ação favorável na hipertensão arterial sistêmica e na hemodinâmica renal, os BRAs podem bloquear os efeitos não hemodinâmicos, pró-fibróticos, promotores de crescimento, diminuindo o estresse oxidativo renal e preservando a estrutura glomerular (267). O irbesartan inibe também a formação de cristais de oxalato de cálcio no rim

de ratos diabéticos (268). O losartan, outro bloqueador do receptor AT1, reduz a albuminúria em pacientes com DM2 (269).

Evidências atuais mostram que o papel do olmesartana no controle da PA é uma estratégia importante para diminuir o risco de eventos e mortalidade cardiovascular (270) (Graças às suas propriedades auxiliares, a olmesartana reduz o risco de proteinúria e insuficiência cardíaca crônica. Entre os BRAs, a olmesartana atinge um controle da PA mais homogêneo e sustentado ao longo de 24 horas (132). A introdução da olmesartana na prática clínica ofereceu, a época, uma oportunidade terapêutica significativa, como monoterapia ou em combinação, para categorias específicas de pacientes, incluindo idosos, diabéticos e pacientes com síndrome metabólica. Nesses pacientes, a maior estabilidade da PA em todo o período de 24 horas alcançada com a olmesartana pode fornecer uma contribuição importante para prevenir o efeito contra acidente vascular encefálico e eventos cardiovasculares (129).

O tratamento com a olmesartana atenua a microalbuminúria e proteinúria e diminuiu o declínio da função renal em DM2 (271). O nosso estudo corrobora com dados da literatura, uma vez que o tratamento com olmesartana ofereceu melhora no quadro de polidipsia, polifagia, poliúria, marcadores bioquímicos de disfunção renal, assim como em parâmetros histológicos. No presente estudo, os animais diabéticos tratados com 16 semanas com olmesartana apresentaram melhora nos níveis de creatinina sérica, excreção de albumina na urina e ACR, entretanto não apresentou alteração em outros parâmetros incluindo fosfatase alcalina, uréia, ferro, frutossamina e ácido úrico.

Em relação a creatinina, a diminuição da função renal interfere na capacidade dos rins de eliminar a creatinina, aumentando sua concentração à medida que a TFG diminui. Em nosso estudo, níveis de creatinina sérica diminuíram significativamente com tratamento por olmesartana. A. Agrawal et al. (2016) demonstraram que o telmisartan, outro antagonista de Ang II via ligação ao receptor AT1, também reduziu significativamente os níveis de creatinina e uréia (272). Em outro estudo, dose altas de candesartan em camundongos db/db foi capaz de diminuir a creatinina plasmática e a albuminúria persistente (273). Em um estudo clínico multicêntrico, randomizado e controlado por placebo em pacientes com DM2, a olmesartana diminuiu a creatinina sérica (271).

A magnitude da albuminúria influencia diretamente na taxa de deterioração da função renal e, portanto, sua redução satisfatória é considerada o alvo primário para o tratamento da ND (274) (275). Ao final de 16 semanas de tratamento com a olmesartana, a albuminúria diminuiu em relação aos animais com diabetes. Em um estudo com camundongos diabéticos db/db ou induzidos por STZ, uma redução semelhante foi relatada após o tratamento com olmesartana

(276) (135). No ensaio clínico ROADMAP, pacientes com DM2 tratados com olmesartana apresentaram prevenção e/ou retardo do desenvolvimento de microalbuminúria (274). Em relação aos efeitos protetores renais, a albumina urinária tendeu a diminuir no grupo olmesartana, conforme observado no estudo de Mizushige et al. (2016.) (277). É geralmente aceito que a modulação do SRAA em doenças diabéticas por iECA ou BRAs confere proteção renal e reduz a albuminúria independente ou além do controle da pressão arterial (278).

A avaliação da ACR urinária é importante para detecção precoce de problemas renais em indivíduos com diabetes. Em nosso estudo, o aumento da ACR foi controlado pelo tratamento com olmesartana. Resultados similares foram encontrados em camundongos db/db tratados com OLM (276) (279). Pela nossa avaliação, efeitos secundários do OLM sobre os níveis dos metabólitos na urina como fosfatase alcalina, uréia, ferro, frutossamina e ácido úrico ainda não foram descritos na literatura.

Com relação ao efeito isolado da piridoxamina na DM1, no presente estudo observamos que houve uma melhora significativa na maioria dos parâmetros alterados pela doença, a saber 13 dos 17 parâmetros alterados foram afetados positivamente pela PYR. A PYR tem a capacidade de inibir a formação de AGEs, como carboximetil-lisina e metilglicoxal, diminuindo a formação espécies reativas de carbonila, espécies reativas de oxigênio e nitrotirosina (280). Além disso, a piridoxamina reduz a creatinina plasmática, a albuminúria e a taxa de albumina/creatinina na urina, protegendo a função renal (281). A piridoxamina reduz também a hipertrofia renal, expansão mesangial, perda de podócitos, aumento de triglicédeos, colesterol total, LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol (282). No presente estudo, mostramos que os animais diabéticos tratados com 16 semanas com piridoxamina apresentaram melhora nos parâmetros de ingesta alimentar, ingesta hídrica, volume urinário, creatinina sérica, excreção de albumina na urina, ACR, AGEs no tecido renal, AGEs na urina, ureia na urina, e nos parâmetros morfológicos incluindo área glomerular, área do tuffo e área do espaço de Bowman. No entanto, não houve alteração nos níveis de fosfatase alcalina, ferro, frutossamina e ácido úrico no grupo tratado com PYR.

Em ensaios pré-clínicos com ratos diabéticos induzidos por STZ, a piridoxamina diminuiu as concentrações de albumina urinária e creatinina plasmática (157). Em camundongos machos de uma linhagem de camundongos com DM1 que superexpressa ON sintase induzível (iNOS) em células  $\beta$  pancreáticas, o tratamento com PYR por 16 semanas diminuiu a creatinina sérica e a ACR (283). Em camundongos db/db, o tratamento com PYR por 20 semanas apresentou redução da ACR (284). A patologia renal induzida por dieta hiperlipídica e com alto teor de frutose se correlacionou com o declínio da função renal, conforme mostrado pelo aumento da ACR, o

que foi significativamente reduzida pela administração de piridoxamina (149). Em um estudo clínico em fase 2 com pacientes com DM1 e DM2 com ND foi observado um efeito na creatinina sérica que tendeu a diminuir com a PYR ( $p = 0,049$ ), assim como os níveis séricos de AGEs, CML e CEL (152). Em estudos com piridoxamina (PYR-206 e PYR 205/207), estes compostos reduziram a mudança da linha de base na creatinina sérica e a excreção urinária de TGF- $\beta$ 1 após 6 meses de tratamento em pacientes com doença renal crônica (152). Foi relatado que a administração de tiamina reduz a albuminúria de pacientes com DRC (285). No ensaio clínico ACTION, no qual foi utilizado aminoguanidina, um agente anti-glicante, em 690 indivíduos com nefropatia manifesta foi observada redução de proteinúria e melhora na TFG (286). Ao contrário, o ensaio clínico *Aminoguanidine Clinical Trial in Overt Diabetic Nephropathy* (ACTION II) em pacientes DRC foi interrompido porque aminoguanidina não foi eficaz, causando efeitos colaterais adicionais, como anemia, disfunção hepática e deficiência de vitamina B6. Quanto a benfotiamina, administrada em pacientes com DRC, a albuminúria não diferiu do grupo de placebo (287). A eficácia pré-clínica da piridoxamina na diminuição de AGES no tecido renal foi comprovada em modelos animais de diabetes onde a piridoxamina diminuiu o AGES no rim como CML e CEL (157,288,289). Em outro estudo pré-clínico de camundongos com dieta high-fat após 12 semanas a piridoxamina diminuiu os níveis de expressão local dos AGEs carboximetilisina/carboxietilisina (CML/CEL). Análise de imunohistoquímica demonstraram um paralelismo entre a superprodução de AGEs e o aumento da expressão do receptor de AGE-RAGE no rim de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (149). Em nosso estudo, é possível que a diminuição de excreção de AGEs na urina nos animais tratados com piridoxamina tenha se dado pela diminuição de produção de AGEs ou mesmo pela melhora da função renal (290,291).

Em relação aos nossos achados morfológicos, a PYR foi capaz de reverter todos os danos histopatológicos observados no modelo de DM. Em ratos diabéticos, a PYR inibiu significativamente o aumento do volume glomerular e do tufo, e nenhuma diferença foi observada no volume mesangial (157,283). Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica exibiram um grau severo de alterações morfológicas renais, prevenido pela administração de PYR, incluindo degeneração vacuolar, perda completa da integridade da borda em escova e danos tubulares (149).

Em relação ao tratamento conjunto com PYR e OLM mostramos que houve melhora na polifagia, polidipsia e poliúria, quando comparado com animais diabéticos sem tratamento, entretando não houve diferença quando comparado com os tratamentos isolados. Parâmetros bioquímicos como creatinina no soro, albumina na urina, ACR também melhoraram em relação

aos animais diabéticos, mas não em relação aos tratamentos isolados. Em relação à excreção de uréia, apenas os grupos com tratamento com PYR, isolado ou em conjunto, apresentaram melhora quando comparados ao grupo DM. Assim como os tratamentos isolados, o tratamento conjunto com PYR e OLM foi capaz de melhorar o parâmetro histológico relacionado ao aumento de área de Bowman. De forma curiosa o tratamento conjunto com PYR e OLM não influenciou a excreção de AGEs na urina, o que ocorreu apenas com o tratamento com PYR. Em número de parâmetros afetados positivamente pelo tratamento conjunto, somou-se 8 parâmetros, em detrimento de 13 parâmetros melhorados pelo tratamento apenas com PYR, e 7 melhorados apenas com OLM. Esses dados nos levam a concluir que o tratamento combinado não ofereceu efeitos benéficos adicionais quando comparado aos tratamentos isolados, e que o tratamento que mais ofereceu benefícios foi o tratamento isolado com PYR.

Tratamento conjunto com moduladores do SRAA e PYR já foram propostos em outros estudos, entretanto é a primeira vez que PYR foi associada ao OLM. Em camundongos db/db, um modelo de diabetes tipo II, o tratamento combinado com piridoxamina e enalapril diminuiu a progressão da ND (292), diminuindo a creatinina e a ACR na urina, diminuiu a concentração dos AGEs no soro, diminuiu o volume glomerular e área mesangial (293). Em outro tratamento combinatório utilizando valsartan, outro inibidor de AT1, junto com FPS-ZM1, um inibidor de RAGE, os autores demonstraram diminuição de marcadores inflamatórios MCP-1, CXCL2, NF-Kb e de macrófagos, além de aumento da expressão de marcadores podocitários incluindo a nefrina e sinaptopodina. Em um estudo em que o tratamento com piridoxamina e valsartan atenuou parcialmente alterações induzidas pela infusão de AGEs ou pela infusão de AngII, os autores defendem que a modulação metabólica e hemodinâmica pode apresentar um efeito sinérgico no tratamento da disfunção renal (294). Entretanto, nós não observamos tal efeito em nosso estudo. Em outro estudo utilizando ratos diabéticos espontaneamente hipertensos (SHR) induzidos a diabetes com STZ randomizados para tratamento com o iECA, perindopril ou inibidor da formação de AGE, aminoguanidina, foi mostrado que a diabetes estava associada a um aumento considerável na taxa de excreção de albumina. Tanto a aminoguanidina quanto o perindopril retardaram o aumento da albuminúria, que foi completamente anulado pela terapia combinada. A glomeruloesclerose e o dano tubulointersticial foram reduzidos por ambas as monoterapias com renoproteção adicional proporcionada pela terapia combinada em ambos os casos. A terapia combinada também foi associada a uma restauração superior na depleção da proteína nefrina induzida por diabetes em comparação com as monoterapias. A expressão de TGFβ1 conforme avaliada por hibridização *in situ* foi aumentada em ratos diabéticos e reduzida por perindopril e aminoguanidina (295). Efeitos sinérgicos do telmisartan e da

piridoxamina no dano renal precoce em SHR sugerem que o uso combinado de telmisartan e piridoxamina é superior ao uso único de qualquer uma das drogas na renoproteção, o que pode resultar do alívio do estresse oxidativo e da redução da ativação de NF-κBp65 e p-ERK1 / 2 (296). Entretanto, no nosso estudo, o tratamento combinado de olmesartana e PYR não ofereceu efeitos adicionais que justificassem seu uso conjunto no manejo da ND.

## **6. CONCLUSÃO**

Com os resultados do presente estudo concluímos que camundongos C57BL/6 que receberam administração de STZ desenvolveram um modelo de diabetes do tipo 1 com nefropatia diabética. O tratamento combinado não ofereceu efeitos benéficos adicionais quando comparado aos tratamentos isolados e o tratamento que mais ofereceu benefícios foi o tratamento isolado com PYR. Sendo assim, o tratamento combinado com olmesartana e PYR não é uma alternativa eficiente para o manejo da nefropatia diabética.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2019 Dec;127(S 01):S1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31860923>
2. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2019 Nov;157:107843. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31518657>
3. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J* [Internet]. 2016 Feb;92(1084):63–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26621825>
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2010 Jan;33 Suppl 1:S62-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042775>
5. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2018;38(1):e1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29282247>
6. Redondo MJ, Hagopian WA, Oram R, Steck AK, Vehik K, Weedon M, et al. The clinical consequences of heterogeneity within and between different diabetes types. *Diabetologia* [Internet]. 2020;63(10):2040–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32894314>
7. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* [Internet]. 2011 Jan;91(1):79–118. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248163>
8. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2018;391(10138):2449–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29916386>
9. Paschou SA, Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocr Connect* [Internet]. 2018 Jan;7(1):R38–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191919>
10. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2001 Jul 21;358(9277):221–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476858>
11. Flannick J, Mercader JM, Fuchsberger C, Udler MS, Mahajan A, Wessel J, et al. Exome sequencing of 20,791 cases of type 2 diabetes and 24,440 controls. *Nature* [Internet]. 2019;570(7759):71–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31118516>
12. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2015;1:15019. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189025>
13. Pearson ER. Type 2 diabetes: a multifaceted disease. *Diabetologia* [Internet]. 2019;62(7):1107–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31161345>
14. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2011 Jan;34 Suppl 1:S62-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193628>
15. Alfadhli EM. Gestational diabetes mellitus. *Saudi Med J* [Internet]. 2015 Apr;36(4):399–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25828275>
16. Coustan DR. Gestational diabetes mellitus. *Clin Chem* [Internet]. 2013 Sep;59(9):1310–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536513>

17. Hattersley AT, Patel KA. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2017;60(5):769–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28314945>
18. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am* [Internet]. 2015 Jan;99(1):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25456640>
19. Anik A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 Mar;28(3–4):251–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25581748>
20. Ewald N, Kaufmann C, Raspe A, Kloer HU, Bretzel RG, Hardt PD. Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c). *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2012 May;28(4):338–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22121010>
21. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, et al. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *lancet Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016;1(3):226–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28404095>
22. Woodmansey C, McGovern AP, McCullough KA, Whyte MB, Munro NM, Correa AC, et al. Incidence, Demographics, and Clinical Characteristics of Diabetes of the Exocrine Pancreas (Type 3c): A Retrospective Cohort Study. *Diabetes Care* [Internet]. 2017;40(11):1486–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860126>
23. Pandit MK, Burke J, Gustafson AB, Minocha A, Peiris AN. Drug-induced disorders of glucose tolerance. *Ann Intern Med* [Internet]. 1993 Apr 1;118(7):529–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8442624>
24. O'Byrne S, Feely J. Effects of drugs on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetics (Part II). *Drugs* [Internet]. 1990 Aug;40(2):203–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2226212>
25. International Diabetes Foundation: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html> acedido em novembro de 201. No Title.
26. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2009 Jan;32 Suppl 1:S62–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118289>
27. <https://www.diabetes.org.uk/guide-to-diabetes/life-with-diabetes> DU. No Title.
28. Qi C, Mao X, Zhang Z, Wu H. Classification and Differential Diagnosis of Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* [Internet]. 2017;2017:8637138. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316995>
29. Lim AK. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* [Internet]. 2014;7:361–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342915>
30. Reutens AT. Epidemiology of diabetic kidney disease. *Med Clin North Am* [Internet]. 2013 Jan;97(1):1–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290726>
31. Raile K, Galler A, Hofer S, Herbst A, Dunstheimer D, Busch P, et al. Diabetic Nephropathy in 27,805 Children, Adolescents, and Adults With Type 1 Diabetes: Effect of diabetes duration, A1C, hypertension, dyslipidemia, diabetes onset, and sex. *Diabetes Care* [Internet]. 2007 Oct 1;30(10):2523–8. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc07-0282>
32. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* [Internet]. 2005 Jan 1;28(1):164–76. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.28.1.164>
33. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2018;117(8):662–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.007>

34. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of Diabetic kidney disease. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2333–40.
35. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017 Dec 7;12(12):2032–45. Available from: <https://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.11491116>
36. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2013 Feb;124(3):139–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075333>
37. Faria JBL De, Renal LDF, Nefrologia D De. Atualização em fisiologia e fisiopatologia : Patogênese da nefropatia diabética. 2001;23(2):121–9.
38. Xiao W, Wang R-S, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2018 Jan 20;28(3):251–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28648096>
39. Yan L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Anim Model Exp Med* [Internet]. 2018 Mar;1(1):7–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ame2.12001>
40. Tilton RG, Chang K, Pugliese G, Eades DM, Province MA, Sherman WR, et al. Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes* [Internet]. 1989 Oct;38(10):1258–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2507378>
41. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FYT, Sourris KC, et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- $\alpha$ -dependent pathway. *Diabetes* [Internet]. 2008 Feb;57(2):460–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959934>
42. Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, et al. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Nov 25;280(47):39616–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135519>
43. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2005 May;67(5):1890–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840036>
44. de Queiroz RM, Oliveira IA, Piva B, Bouchuid Catão F, da Costa Rodrigues B, da Costa Pascoal A, et al. Hexosamine Biosynthetic Pathway and Glycosylation Regulate Cell Migration in Melanoma Cells. *Front Oncol* [Internet]. 2019;9:116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30891426>
45. James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, et al. Flux Through the Hexosamine Pathway Is a Determinant of Nuclear Factor B- Dependent Promoter Activation. *Diabetes* [Internet]. 2002 Apr 1;51(4):1146–56. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.51.4.1146>
46. Du X-L, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2000 Oct 24;97(22):12222–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.22.12222>
47. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2000 Sep;58:S13–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815474174>
48. Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Wolfert MA, Wells L, Boons G-J, et al. Morphological changes in diabetic kidney are associated with increased O-GlcNAcylation of cytoskeletal proteins including  $\alpha$ -actinin 4. *Clin Proteomics* [Internet]. 2011 Sep 21;8(1):15. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933451>

49. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* [Internet]. 1991 Sep 19;325(12):836–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1875967>
50. Palimeri S, Palioura E, Diamanti-Kandarakis E. Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: Recommendations for dietary management. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2015;8:415–26.
51. Kehm R, Rückriemen J, Weber D, Deubel S, Grune T, Höhn A. Endogenous advanced glycation end products in pancreatic islets after short-term carbohydrate intervention in obese, diabetes-prone mice. *Nutr Diabetes* [Internet]. 2019;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41387-019-0077-x>
52. Aragno M, Mastrocola R. Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: Emerging mechanisms of disease. *Nutrients*. 2017;9(4):1–16.
53. Mallipattu SK, Uribarri J. Advanced glycation end product accumulation: a new enemy to target in chronic kidney disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. 2014 Nov;23(6):547–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25160075>
54. Wang X, Desai K, Clausen JEST, Wu L. Increased methylglyoxal and advanced glycation end products in kidney from spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int* [Internet]. 2004 Dec;66(6):2315–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815503360>
55. Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, et al. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metab* [Internet]. 2018;28(3):337–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30184484>
56. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Nov 22;91(24):11704–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7972128>
57. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* [Internet]. 2003 Apr;162(4):1123–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651605>
58. Uesugi N, Sakata N, Nangaku M, Abe M, Horiuchi S, Hisano S, et al. Possible mechanism for medial smooth muscle cell injury in diabetic nephropathy: glycooxidation-mediated local complement activation. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2004 Aug;44(2):224–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264180>
59. Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, et al. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Nov 6;98(23):13330–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687636>
60. Rudberg S, Rasmussen LM, Bangstad HJ, Osterby R. Influence of insertion/deletion polymorphism in the ACE-I gene on the progression of diabetic glomerulopathy in type 1 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* [Internet]. 2000 Apr;23(4):544–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10857950>
61. Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2013 Apr;58(4):259–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313806>
62. Fioretto P, Stehouwer CD, Mauer M, Chiesura-Corona M, Brocco E, Carraro A, et al. Heterogeneous nature of microalbuminuria in NIDDM: studies of endothelial function and renal structure. *Diabetologia* [Internet]. 1998 Feb;41(2):233–6. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498659>
63. Bangstad H-J, Seljeflot I, Berg TJ, Hanssen KF. Renal tubulointerstitial expansion is associated with endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 2009;69(1):138–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846477>
  64. Shibata R, Ueda S, Yamagishi S-I, Kaida Y, Matsumoto Y, Fukami K, et al. Involvement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in tubulointerstitial ischaemia in the early phase of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2009 Apr;24(4):1162–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015171>
  65. Temm C, Dominguez JH. Microcirculation: nexus of comorbidities in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2007 Aug;293(2):F486-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494088>
  66. Nakagawa T, Tanabe K, Croker BP, Johnson RJ, Grant MB, Kosugi T, et al. Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2011 Jan;7(1):36–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21045790>
  67. Johnson DW, Jones GRD, Mathew TH, Ludlow MJ, Chadban SJ, Usherwood T, et al. Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement. *Med J Aust* [Internet]. 2012 Aug 20;197(4):224–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900872>
  68. Sharma SG, Bomback AS, Radhakrishnan J, Herlitz LC, Stokes MB, Markowitz GS, et al. The modern spectrum of renal biopsy findings in patients with diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013 Oct;8(10):1718–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886566>
  69. Papadopoulou-Marketou N, Kanaka-Gantenbein C, Marketos N, Chrousos GP, Papassotiriou I. Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2017;54(5):326–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28956668>
  70. Martínez-Castelao A, Navarro-González JF, Górriz JL, de Alvaro F. The Concept and the Epidemiology of Diabetic Nephropathy Have Changed in Recent Years. *J Clin Med* [Internet]. 2015 May 28;4(6):1207–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26239554>
  71. Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* [Internet]. 2011;170:1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659752>
  72. Biosci M. HHS Public Access. 2016;8–20.
  73. T.M.Guyton and J.E.Hall. *Tratado de fisiologia medica*. 2017th ed. Elsevier, editor. 2017.
  74. Pallone TL, Edwards A, Mattson DL. Renal medullary circulation. *Compr Physiol* [Internet]. 2012 Jan;2(1):97–140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728972>
  75. Zafrani L, Payen D, Azoulay E, Ince C. The microcirculation of the septic kidney. *Semin Nephrol* [Internet]. 2015 Jan;35(1):75–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795501>
  76. Minami T, Aird WC. Endothelial cell gene regulation. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2005 Jul;15(5):174–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16165014>
  77. Verma SK, Molitoris BA. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Semin Nephrol* [Internet]. 2015 Jan;35(1):96–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795503>
  78. Rops AL, van der Vlag J, Jacobs CW, Dijkman HB, Lensen JF, Wijnhoven TJ, et al. Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines. *Kidney Int* [Internet]. 2004 Dec;66(6):2193–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569308>
  79. Redfors B, Bragadottir G, Sellgren J, Swärd K, Ricksten S-E. Acute renal failure is NOT

- an “acute renal success”--a clinical study on the renal oxygen supply/demand relationship in acute kidney injury. *Crit Care Med* [Internet]. 2010 Aug;38(8):1695–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512036>
80. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med* (Maywood) [Internet]. 2008 Jan;233(1):4–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156300>
  81. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* [Internet]. 2001 Feb 2;88(2):E14-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157681>
  82. Kelly R, Ruane-O’Hora T, Noble MIM, Drake-Holland AJ, Snow HM. Differential inhibition by hyperglycaemia of shear stress- but not acetylcholine-mediated dilatation in the iliac artery of the anaesthetized pig. *J Physiol* [Internet]. 2006 May 15;573(Pt 1):133–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543269>
  83. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* [Internet]. 2003 Nov;11(11):1278–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627747>
  84. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev* [Internet]. 2001 Feb;22(1):36–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159815>
  85. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol* [Internet]. 1993 Oct;265(4 Pt 2):F477-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238377>
  86. Cherney DZI, Miller JA, Scholey JW, Nasrallah R, Hébert RL, Dekker MG, et al. Renal hyperfiltration is a determinant of endothelial function responses to cyclooxygenase 2 inhibition in type 1 diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2010 Jun;33(6):1344–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332349>
  87. Hadi HAR, Suwaidi J AI. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* [Internet]. 2007;3(6):853–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200806>
  88. Cheng H, Harris R. Renal Endothelial Dysfunction in Diabetic Nephropathy. *Cardiovasc Hematol Disord Targets*. 2014;14(1):22–33.
  89. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirososou M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 1201–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130040>
  90. Wu C, Lu H, Cassis LA, Daugherty A. Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review. *N Am J Med Sci* (Boston) [Internet]. 2011 Oct 1;4(4):183–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389749>
  91. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* [Internet]. 1990 Oct;70(4):1067–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2217555>
  92. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2007 Jan;292(1):C82-97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870827>
  93. Morizane S, Mitani F, Ozawa K, Ito K, Matsushashi T, Katsumata Y, et al. Biphasic time course of the changes in aldosterone biosynthesis under high-salt conditions in Dahl salt-sensitive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012 May;32(5):1194–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383697>
  94. Usberti M, Federico S, Di Minno G, Ungaro B, Ardillo G, Pecoraro C, et al. Effects of angiotensin II on plasma ADH, prostaglandin synthesis, and water excretion in normal

- humans. *Am J Physiol* [Internet]. 1985 Feb;248(2 Pt 2):F254-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3881995>
95. de Almeida LF, Coimbra TM. When Less or More Isn't Enough: Renal Maldevelopment Arising From Disequilibrium in the Renin-Angiotensin System. *Front Pediatr* [Internet]. 2019 Jul 17;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2019.00296/full>
  96. Takezako T, Unal H, Karnik SS, Node K. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: Focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased agonism. *Pharmacol Res* [Internet]. 2017 Sep;123:40–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28648738>
  97. Garland SL. Are GPCRs still a source of new targets? *J Biomol Screen* [Internet]. 2013 Oct;18(9):947–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945874>
  98. Ladino M, Hernandez Schulman I. Renovascular and renoprotective properties of telmisartan: clinical utility. *Int J Nephrol Renovasc Dis* [Internet]. 2010;3:33–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694926>
  99. Crowley SD, Coffman TM. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* [Internet]. 2012 May 15;318(9):1049–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410251>
  100. Kaschina E, Namsolleck P, Unger T. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Res* [Internet]. 2017 Nov;125:39–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661817305418>
  101. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* [Internet]. 1993;329(14):977–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366922>
  102. Carel JC, Hay F, Coutant R, Rodrigue D, Chaussain JL. Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment of girls with constitutional short stature and normal pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1996 Sep;81(9):3318–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784090>
  103. Ko GJ, Kang YS, Han SY, Lee MH, Song HK, Han KH, et al. Pioglitazone attenuates diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2008 Sep;23(9):2750–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388116>
  104. Clautice-Engle T, Jeffrey RB, Li KC, Barth RA. Power Doppler imaging of focal lesions of the gastrointestinal tract: comparison with conventional color Doppler imaging. *J Ultrasound Med* [Internet]. 1996 Jan;15(1):63–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8667486>
  105. Bakris GL, Ruilope LM, McMorn SO, Weston WM, Heise MA, Freed MI, et al. Rosiglitazone reduces microalbuminuria and blood pressure independently of glycemia in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. *J Hypertens* [Internet]. 2006 Oct;24(10):2047–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16957566>
  106. Koderá R, Shikata K, Takatsuka T, Oda K, Miyamoto S, Kajitani N, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates early renal injury through its anti-inflammatory action in a rat model of type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014 Jan 17;443(3):828–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24342619>
  107. Mori H, Okada Y, Arao T, Tanaka Y. Sitagliptin improves albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* [Internet]. 2014 May 4;5(3):313–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843780>
  108. Fujita H, Taniai H, Murayama H, Ohshiro H, Hayashi H, Sato S, et al. DPP-4 inhibition with alogliptin on top of angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates albuminuria

- via up-regulation of SDF-1 $\alpha$  in type 2 diabetic patients with incipient nephropathy. *Endocr J* [Internet]. 2014;61(2):159–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225429>
109. Cherney DZI, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A, et al. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation* [Internet]. 2014 Feb 4;129(5):587–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24334175>
  110. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* [Internet]. 1998 Sep;352(9131):837–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673698070196>
  111. Quiroga B, Arroyo D, de Arriba G. Present and future in the treatment of diabetic kidney disease. *J Diabetes Res* [Internet]. 2015;2015:801348. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945357>
  112. Viberti G, Wheeldon NM, MicroAlbuminuria Reduction With VALsartan (MARVAL) Study Investigators. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation* [Internet]. 2002 Aug 6;106(6):672–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163426>
  113. Bakris GL, Weir MR, Shanifar S, Zhang Z, Douglas J, van Dijk DJ, et al. Effects of blood pressure level on progression of diabetic nephropathy: results from the RENAAL study. *Arch Intern Med* [Internet]. 2003 Jul 14;163(13):1555–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860578>
  114. Normatizações C De, Markman B, Carlos A, Sousa S, Felice A, Issa C, et al. Diretrizes Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020 Diretrizes. 2021;116(3):516–658.
  115. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int* [Internet]. 2006 Dec;70(11):1914–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985515>
  116. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, Boomsma F, Rossing P, Tarnow L, et al. Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2005 Dec;68(6):2829–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316360>
  117. Bakris GL, Weir MR, DeQuattro V, McMahon FG. Effects of an ACE inhibitor/calcium antagonist combination on proteinuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 1998 Oct;54(4):1283–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767545>
  118. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HAW, Livingstone SJ, et al. Effects of atorvastatin on kidney outcomes and cardiovascular disease in patients with diabetes: an analysis from the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS). *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2009 Nov;54(5):810–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540640>
  119. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* [Internet]. 2001 Jul 25;286(4):421–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466120>
  120. Parving H-H, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK. Aliskiren Combined with Losartan in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Jun 5;358(23):2433–46. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0708379>
  121. Sasser JM, Sullivan JC, Hobbs JL, Yamamoto T, Pollock DM, Carmines PK, et al. Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2007 Jan;18(1):143–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167119>
  122. Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, Degenhardt TP, Schotzinger RJ, McGill JB. Effects

- of Pyridoxamine in Combined Phase 2 Studies of Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes and Overt Nephropathy. *Am J Nephrol* [Internet]. 2007;27(6):605–14. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/108104>
123. Sanajou D, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Aslani S. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2018 Aug;833:158–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299918303194>
  124. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, et al. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Jul 28;365(4):327–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699484>
  125. Ciszewicz M, Polubinska A, Antoniewicz A, Suminska-Jasinska K, Breborowicz A. Sulodexide suppresses inflammation in human endothelial cells and prevents glucose cytotoxicity. *Transl Res* [Internet]. 2009 Mar;153(3):118–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19218094>
  126. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Sep 20;345(12):851–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565517>
  127. Eua D. Doença renal do diabetes. *Soc Bras Diabetes* [Internet]. 2015;29–33. Available from: [www.kidney.org](http://www.kidney.org)
  128. Bloomgarden ZT. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2005;28(3):745–51.
  129. Omboni S, Volpe M. Angiotensin Receptor Blockers Versus Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors for the Treatment of Arterial Hypertension and the Role of Olmesartan. *Adv Ther* [Internet]. 2019;36(2):278–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30591990>
  130. Andersen S, Tarnow L, Rossing P, Hansen B V, Parving HH. Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2000 Feb;57(2):601–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652037>
  131. Sonkodi S. Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II blockers. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2003 Jul 1;18(90005):21v – 23. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfg1037>
  132. Omboni S, Volpe M. Management of arterial hypertension with angiotensin receptor blockers: Current evidence and the role of olmesartan. *Cardiovasc Ther* [Internet]. 2018 Dec;36(6):e12471. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30358114>
  133. Al-Majed AA, Bakheit AHH, Abdel Aziz HA, Al-Jallal AAM. Olmesartan. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* [Internet]. 42:241–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28431778>
  134. Lu J, Wang H-W, Ahmad M, Keshtkar-Jahromi M, Blaustein MP, Hamlyn JM, et al. Central and peripheral slow-pressor mechanisms contributing to Angiotensin II-salt hypertension in rats. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2018;114(2):233–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126194>
  135. Si X, Li P, Zhang Y, Zhang Y, Lv W, Qi D. Renoprotective effects of olmesartan medoxomil on diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed reports* [Internet]. 2014 Jan;2(1):24–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649063>
  136. Lakshmanan AP, Thandavarayan RA, Watanabe K, Sari FR, Meilei H, Giridharan V V, et al. Modulation of AT-1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012 Jan 2;348(1):104–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827824>
  137. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of

- losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Sep 20;345(12):861–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565518>
138. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* [Internet]. 2007 Apr;369(9568):1208–19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607602426>
  139. Lewko B, Maryn A, Latawiec E, Daca A, Rybczynska A. Angiotensin II Modulates Podocyte Glucose Transport. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018;9:418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30087656>
  140. Mavroedi V, Petrakis I, Stylianou K, Katsarou T, Giannakakis K, Perakis K, et al. Losartan affects glomerular AKT and mTOR phosphorylation in an experimental model of type 1 diabetic nephropathy. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2013 Jun;61(6):433–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456824>
  141. Ono M, Fukuda M, Miura T, Mizuno M, Kato Y, Sato R, et al. Predictors of proteinuria reduction by monotherapy with an angiotensin receptor blocker, olmesartan. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* [Internet]. 2012 Jun 14;13(2):239–43. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1470320311434817>
  142. Chan GCW, Tang SCW. Diabetic nephropathy: landmark clinical trials and tribulations. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2016 Mar;31(3):359–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637638>
  143. Donate-Correa J, Tagua VG, Ferri C, Martín-Núñez E, Hernández-Carballo C, Ureña-Torres P, et al. Pentoxifylline for Renal Protection in Diabetic Kidney Disease. A Model of Old Drugs for New Horizons. *J Clin Med* [Internet]. 2019 Feb 27;8(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30818852>
  144. Zhang X, Zhang H, Ma Y, Che W, Hamblin MR. Management of Hypertension Using Olmesartan Alone or in Combination. *Cardiol Ther* [Internet]. 2017 Jun;6(1):13–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28258390>
  145. Parving H-H, Brenner BM, McMurray JJ V, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE): rationale and study design. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2009 May;24(5):1663–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145003>
  146. Quan A. Fetopathy associated with exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Early Hum Dev* [Internet]. 2006 Jan;82(1):23–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427219>
  147. Prasa D, Hoffmann-Walbeck P, Barth S, Stedtler U, Ceschi A, Färber E, et al. Angiotensin II antagonists - an assessment of their acute toxicity. *Clin Toxicol (Phila)* [Internet]. 2013 Jun;51(5):429–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23692319>
  148. Wang Y, Li Y, Yang Z, Wang Z, Chang J, Zhang T, et al. Pyridoxamine Treatment of HK-2 Human Proximal Tubular Epithelial Cells Reduces Oxidative Stress and the Inhibition of Autophagy Induced by High Glucose Levels. *Med Sci Monit* [Internet]. 2019 Feb 25;25:1480–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30799433>
  149. Chiazza F, Cento AS, Collotta D, Nigro D, Rosa G, Baratta F, et al. Protective Effects of Pyridoxamine Supplementation in the Early Stages of Diet-Induced Kidney Dysfunction. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017;2017:2682861. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29214163>
  150. Chetyrkin S V, Zhang W, Hudson BG, Serianni AS, Voziyan PA. Pyridoxamine protects proteins from functional damage by 3-deoxyglucosone: mechanism of action of pyridoxamine. *Biochemistry* [Internet]. 2008 Jan 22;47(3):997–1006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18161948>
  151. Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, et al. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits

- conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Nov 21;278(47):46616–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975371>
152. Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, Degenhardt TP, Schotzinger RJ, McGill JB. Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol* [Internet]. 2007;27(6):605–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823506>
  153. Elseweidy MM, Elswefy SE, Younis NN, Zaghloul MS. Pyridoxamine, an inhibitor of protein glycation, in relation to microalbuminuria and proinflammatory cytokines in experimental diabetic nephropathy. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2013 Aug 1;238(8):881–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970406>
  154. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2005 Aug;62(15):1671–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905958>
  155. Chen JLT, Francis J. Pyridoxamine, Advanced Glycation Inhibition, and Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2012 Jan;23(1):6–8. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2011111097>
  156. Skrypnik NI, Voziyan P, Yang H, de Caestecker CR, Theberge M-C, Drouin M, et al. Pyridoxamine reduces postinjury fibrosis and improves functional recovery after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2016;311(2):F268-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27194713>
  157. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int* [Internet]. 2002 Mar;61(3):939–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849448>
  158. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine: the many virtues of a maillard reaction inhibitor. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2005 Jun;1043:807–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037308>
  159. Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A, Biemel KM, Lederer MO, Padayatti PS. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: Characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys*. 2002;402(1):110–9.
  160. Jain SK, Lim G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2001 Feb 1;30(3):232–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165869>
  161. Ramis R, Ortega-Castro J, Caballero C, Casasnovas R, Cerrillo A, Vilanova B, et al. How Does Pyridoxamine Inhibit the Formation of Advanced Glycation End Products? The Role of Its Primary Antioxidant Activity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2019 Sep 1;8(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31480509>
  162. Abouzed TK, Munesue S, Harashima A, Masuo Y, Kato Y, Khailo K, et al. Preventive Effect of Salicylate and Pyridoxamine on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016;2016:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/1786789/>
  163. Eritrograma H. VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA VCM 311 - Patologia Clínica Veterinária. :3–6.
  164. Mottard N, Berkowitz DE, Santhanam L. Assessing Renal Microvascular Reactivity by Laser Speckle-Contrast Imaging in Angiotensin-II-Treated Mice. *Int J Nephrol Renovasc Dis* [Internet]. 2020;13:45–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32273746>
  165. Hamzaoui M, Djerada Z, Brunel V, Mulder P, Richard V, Bellien J, et al. 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj

- mice. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 30;10(1):1524. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-58393-w>
166. Rangan GK, Tesch GH. Quantification of renal pathology by image analysis. *Nephrology (Carlton)* [Internet]. 2007 Dec;12(6):553–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17995580>
  167. Nakayama H, Mitsuhashi T, Kuwajima S, Aoki S, Kuroda Y, Itoh T, et al. Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1993;42(2):345–50.
  168. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism* [Internet]. 1998 Nov;47(11):1348–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826211>
  169. Suehiro A, Uchida K, Nakanishi M, Wakabayashi I. Measurement of urinary advanced glycation end-products (AGEs) using a fluorescence assay for metabolic syndrome-related screening tests. *Diabetes Metab Syndr* [Internet]. 10(1 Suppl 1):S110-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26626334>
  170. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186(C):421–31.
  171. Aebi H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105(C):121–6.
  172. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2006;290(1):214–22.
  173. Jiao Y, Jiang H, Lu H, Yang Y, Zhang Y, Zhang K, et al. Deficiency of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  promoted progression of diabetic nephropathy with hypertension. *Exp Ther Med*. 2018;16(4):3658–62.
  174. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (methods in renal research). *Nephrology*. 2007;12(3):261–6.
  175. Chadt A, Al-Hasani H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2020;472(9):1273–98.
  176. Dominguez JH, Camp K, Maianu L, Feister H, Garvey WT. Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1994;266(2 35-2).
  177. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 2010;62(5):315–33.
  178. Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev* [Internet]. 2016 Mar 19;8(1):5–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-015-0186-2>
  179. Kahanovitz L, Sluss PM, Russell SJ. Type 1 diabetes-a clinical perspective. *Point Care*. 2017;16(1):37–40.
  180. Riyahi F, Mousavi SH, Riyahi S. Effect of Moderate Swimming Exercise on Hyperglycaemia , Polyphagia , Polydipsia and Weight Loss in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 2016;14(2):51–5.
  181. Jiao Y, Jiang H, Lu H, Yang Y, Zhang Y, Zhang K, et al. Deficiency of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  promoted progression of diabetic nephropathy with hypertension. *Exp Ther Med* [Internet]. 2018 Oct;16(4):3658–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30233722>
  182. Uil M, Scantlebery AML, Butter LM, Larsen PWB, de Boer OJ, Leemans JC, et al. Combining streptozotocin and unilateral nephrectomy is an effective method for inducing experimental diabetic nephropathy in the “resistant” C57Bl/6J mouse strain. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):5542. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615804>
  183. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic

- background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2006 Jan;290(1):F214–22. Available from:  
<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00204.2005>
184. Yang Y-Y, Shi L-X, Li J-H, Yao L-Y, Xiang D-X. Piperazine ferulate ameliorates the development of diabetic nephropathy by regulating endothelial nitric oxide synthase. *Mol Med Rep* [Internet]. 2019 Mar;19(3):2245–53. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30664213>
  185. Bai X, Li X, Tian J, Xu L, Wan J, Liu Y. A new model of diabetic nephropathy in C57BL/6 mice challenged with advanced oxidation protein products. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018;118:71–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29462715>
  186. De Carvalho JAM, Piva SJ, Hausen BS, Bochi G V, Kaefer M, Coelho AC, et al. Assessment of urinary  $\gamma$ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011 Jul 15;412(15–16):1407–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527256>
  187. Raghu G, Jakhotia S, Yadagiri Reddy P, Anil Kumar P, Bhanuprakash Reddy G. Ellagic acid inhibits non-enzymatic glycation and prevents proteinuria in diabetic rats. *Food Funct* [Internet]. 2016;7(3):1574–83. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5FO01372K>
  188. Zhou Q, Guo W, Jia Y, Xu J. Comparison of Chromium and Iron Distribution in Serum and Urine among Healthy People and Prediabetes and Diabetes Patients. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019;2019:3801639. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30915353>
  189. Chen Y, Zhao Z, Li Y, Yang Y, Li L, Jiang Y, et al. Baicalein alleviates hyperuricemia by promoting uric acid excretion and inhibiting xanthine oxidase. *Phytomedicine* [Internet]. 2021 Jan;80:153374. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711320302051>
  190. Sciacqua A, Tripepi G, Perticone M, Cassano V, Fiorentino T V., Pititto GN, et al. Alkaline phosphatase affects renal function in never-treated hypertensive patients: effect modification by age. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–7.
  191. Zhao L, Li L, Ren H, Zou Y, Zhang R, Wang S, et al. Association between serum alkaline phosphatase and renal outcome in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail* [Internet]. 2020;42(1):818–28. Available from:  
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2020.1804402>
  192. Xie Y, Bowe B, Li T, Xian H, Yan Y, Al-Aly Z. Higher blood urea nitrogen is associated with increased risk of incident diabetes mellitus. *Kidney Int* [Internet]. 2018 Mar;93(3):741–52. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253817306762>
  193. D’Apolito M, Du X, Zong H, Catucci A, Maiuri L, Trivisano T, et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jan 4;120(1):203–13. Available from:  
<http://www.jci.org/articles/view/37672>
  194. Klein JD, Blount MA, Sands JM. Urea transport in the kidney. *Compr Physiol*. 2011;1(2):699–729.
  195. Gallucci E, Micelli S, Lippe C. Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Arch Physiol Biochem*. 1971;79(5):881–7.
  196. D’Apolito M, Du X, Zong H, Catucci A, Maiuri L, Trivisano T, et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jan;120(1):203–13. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955654>
  197. D’Apolito M, Du X, Pisanelli D, Pettoello-Mantovani M, Campanozzi A, Giacco F, et al. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. *Atherosclerosis* [Internet]. 2015 Apr;239(2):393–400. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25682038>
198. Thomas SS, Zhang L, Mitch WE. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic kidney disease. *Kidney Int* [Internet]. 2015 Dec;88(6):1233–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26444029>
  199. Sands JM, Blount MA, Klein JD. Regulation of renal urea transport by vasopressin. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2011;122:82–92.
  200. Fenton RA, Chou CL, Stewart GS, Smith CP, Knepper MA. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7469–74.
  201. Brooks DP, Nutting DF, Crofton JT, Share L. Vasopressin in rats with genetic and streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* [Internet]. 1989 Jan;38(1):54–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2909412>
  202. Klein JD, Blount MA, Sands JM. Molecular mechanisms of urea transport in health and disease. *Pflugers Arch* [Internet]. 2012 Dec;464(6):561–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007461>
  203. Klein JD, Blount MA, Sands JM. Molecular mechanisms of urea transport in health and disease. *Pflugers Arch*. 2012;464(6):561–72.
  204. Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM. The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38275–80.
  205. Cohen DM, Gullans SR. Urea induces Egr-1 and c-fos expression in renal epithelial cells. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1993;264(4 33-4):593–600.
  206. Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B, Roncal-Jimenez C, Lanaspa MA, Ishimoto T, Nakagawa T, et al. Hyperosmolarity drives hypertension and CKD-water and salt revisited. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(7):415–20.
  207. Nakatani S, Nakatani A, Ishimura E, Toi N, Tsuda A, Mori K, et al. Urinary iron excretion is associated with urinary full-length megalin and renal oxidative stress in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(2):458–70.
  208. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2004;117(3):285–97.
  209. Tang S, Xiao X. Ferroptosis and kidney diseases. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 2020;52(3):497–503. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02335-7>
  210. Wang Y, Bi R, Quan F, Cao Q, Lin Y, Yue C, et al. Ferroptosis involves in renal tubular cell death in diabetic nephropathy. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2020;888(September):173574. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173574>
  211. Howard RL, Buddington B, Alfrey AC. Urinary albumin, transferrin and iron excretion in diabetic patients. *Kidney Int* [Internet]. 1991;40(5):923–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1991.295>
  212. Zhou Q, Guo W, Jia Y, Xu J. Comparison of chromium and iron distribution in serum and urine among healthy people and prediabetes and diabetes patients. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
  213. Morita T, Nakano D, Kitada K, Morimoto S, Hitomi H, Kobori H, et al. HHS Public Access. 2015;85–91.
  214. Van Avondt K, Nur E, Zeerleder S. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2019;15(11):671–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-019-0181-0>
  215. Costacou T, Orchard TJ, Moon CH, Bae KT, Fried L, Evans RW. Is Magnetic Resonance Imaging Detection of Kidney Iron Deposition Increased in Haptoglobin 2-2 Genotype Carriers with Type 1 Diabetes? *Antioxidants Redox Signal*. 2018;29(8):735–41.
  216. Dahan I, Thawho N, Farber E, Nakhoul N, Asleh R, Levy AP, et al. The Iron-Klotho-VDR

- Axis Is a Major Determinant of Proximal Convolved Tubule Injury in Haptoglobin 2-2 Genotype Diabetic Nephropathy Patients and Mice. *J Diabetes Res*. 2018;2018.
217. Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2008;392(1–2):1–7.
  218. Bobulescu IA, Moe OW. Renal Transport of Uric Acid: Evolving Concepts and Uncertainties. *Adv Chronic Kidney Dis* [Internet]. 2012;19(6):358–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ackd.2012.07.009>
  219. Lipkowitz MS. Regulation of uric acid excretion by the kidney. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14(2):179–88.
  220. Li X, Yan Z, Tian J, Zhang X, Han H, Ye F. Urate Transporter URAT1 in Hyperuricemia: New Insights from Hyperuricemic Models. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2019 Nov;49(6):756–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31882426>
  221. Yan J, Zhang G, Hu Y, Ma Y. Effect of luteolin on xanthine oxidase: inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation. *Food Chem* [Internet]. 2013 Dec 15;141(4):3766–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993547>
  222. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* [Internet]. 2002 May 23;417(6887):447–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12024214>
  223. Li D, Zhao J, Li S, Zhang Q. Discovery of xanthine oxidase inhibitors from a complex mixture using an online, restricted-access material coupled with column-switching liquid chromatography with a diode-array detection system. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2014 Mar;406(7):1975–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510210>
  224. Preitner F, Bonny O, Laverriere A, Rotman S, Firsov D, Da Costa A, et al. Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Sep 8;106(36):15501–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904411106>
  225. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2008;27(6–7):608–19.
  226. Dalbeth N, Phipps-Green A, Frampton C, Neogi T, Taylor WJ, Merriman TR. Relationship between serum urate concentration and clinically evident incident gout: an individual participant data analysis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2018;77(7):1048–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29463518>
  227. Bhole V, Choi JWJ, Kim SW, de Vera M, Choi H. Serum uric acid levels and the risk of type 2 diabetes: a prospective study. *Am J Med* [Internet]. 2010 Oct;123(10):957–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920699>
  228. Cook DG, Shaper AG, Thelle DS, Whitehead TP. Serum uric acid, serum glucose and diabetes: relationships in a population study. *Postgrad Med J* [Internet]. 1986 Nov;62(733):1001–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3628142>
  229. Erdberg A, Boner G, van Dyk DJ, Carel R. Urine Uric Acid Excretion in Patients with Insulin-Dependent Diabetes mellitus. *Nephron* [Internet]. 1992;60(2):134–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/186728>
  230. Silveas RR, Pereira ENGDS, Flores EEI, Estado V, Reis PA, Silva IJD, et al. Combined therapy with metformin and insulin attenuates systemic and hepatic alterations in a model of high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes. *Int J Exp Pathol*. 2016;97(3).
  231. Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diabetes Sci Technol*. 2015;9(2):169–76.
  232. Szwergold BS, Howell S, Beisswenger PJ. Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo. *Diabetes* [Internet].

- 2001 Sep;50(9):2139–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522682>
233. Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, Maász A, Cseh J, et al. A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene is associated with HbA1c Levels and the onset of type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2010 Mar;118(3):209–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834870>
  234. Lee SE, Jang JE, Kim HS, Jung MK, Ko MS, Kim M-O, et al. Mesenchymal stem cells prevent the progression of diabetic nephropathy by improving mitochondrial function in tubular epithelial cells. *Exp Mol Med* [Internet]. 2019 Jul 9;51(7):1–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/s12276-019-0268-5>
  235. Pascal SMA, Veiga-da-Cunha M, Gilon P, Van Schaftingen E, Jonas JC. Effects of fructosamine-3-kinase deficiency on function and survival of mouse pancreatic islets after prolonged culture in high glucose or ribose concentrations. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2010 Mar;298(3):E586–96. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00503.2009>
  236. Veiga-Da-Cunha M, Jacquemin P, Delpierre G, Godfraind C, Théate I, Vertommen D, et al. Increased protein glycation in fructosamine 3-kinase-deficient mice. *Biochem J*. 2006;399(2):257–64.
  237. Conner JR, Beisswenger PJ, Szwegold BS. Some clues as to the regulation, expression, function, and distribution of fructosamine-3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:824–36.
  238. Delplanque J, Delpierre G, Opperdoes FR, Van Schaftingen E. Tissue distribution and evolution of fructosamine 3-kinase and fructosamine 3-kinase-related protein. *J Biol Chem*. 2004;279(45):46606–13.
  239. Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diabetes Sci Technol* [Internet]. 2015 Mar;9(2):169–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591856>
  240. Parrinello CM, Selvin E. Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycemic markers in diabetes diagnosis, prognosis, and management. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2014;14(11):548. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249070>
  241. Selvin E, Rawlings AM, Grams M, Klein R, Sharrett AR, Steffes M, et al. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complications: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2014 Apr;2(4):279–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703046>
  242. Shafi T, Sozio SM, Plantinga LC, Jaar BG, Kim ET, Parekh RS, et al. Serum fructosamine and glycated albumin and risk of mortality and clinical outcomes in hemodialysis patients. *Diabetes Care* [Internet]. 2013 Jun;36(6):1522–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250799>
  243. Jha JC, Banal C, Chow BSM, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2016;25(12):657–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26906673>
  244. Jha JC, Banal C, Chow BSM, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxidants Redox Signal*. 2016;25(12):657–84.
  245. Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho YS, et al. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes*. 2012;61(3):728–38.
  246. Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho Y-S, et al. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes* [Internet]. 2012 Mar;61(3):728–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315314>
  247. Kobayashi M, Sugiyama H, Wang DH, Toda N, Maeshima Y, Yamasaki Y, et al. Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal

- fibrosis in mice. *Kidney Int.* 2005;68(3):1018–31.
248. Sunami R, Sugiyama H, Wang D-H, Kobayashi M, Maeshima Y, Yamasaki Y, et al. Acatalasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis and exacerbates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2004 Jun;286(6):F1030-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722014>
  249. Sunami R, Sugiyama H, Wang D, Kobayashi M, Maeshima Y, Yamasaki Y, et al. Acatalasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis and exacerbates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. 2004;2–5.
  250. Spence RA, Moorehead RJ, Maginn P, Gibbons JR, McIlrath EM. Posterior mediastinal thyroid: the role of CT scanning. *J R Coll Surg Edinb* [Internet]. 1985 Aug;30(4):224–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4057136>
  251. Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* [Internet]. 1995 Jul;44(7):824–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789650>
  252. Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther* [Internet]. 12(6):562–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280650>
  253. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications. *Clin Chem* [Internet]. 1986 Oct;32(10 Suppl):B37-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3530538>
  254. Zilin S, Naifeng L, Bicheng L, Jiping W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2001 Nov;313(1–2):69–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694241>
  255. Baye E, Mark AB, Poulsen MW, Andersen JM, Dragsted LO, Bügel SG, et al. Associations between Urinary Advanced Glycation End Products and Cardiometabolic Parameters in Metabolically Healthy Obese Women. *J Clin Med* [Internet]. 2019 Jul 10;8(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31295874>
  256. Tsukahara H, Sekine K, Uchiyama M, Kawakami H, Hata I, Todoroki Y, et al. Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Res* [Internet]. 2003 Sep;54(3):419–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761359>
  257. Daniel E Shumer, Natalie J Nokoff NPS. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(12):139–48.
  258. Yu J, Wu H, Liu ZY, Zhu Q, Shan C, Zhang KQ. Advanced glycation end products induce the apoptosis of and inflammation in mouse podocytes through CXCL9-mediated JAK2/STAT3 pathway activation. *Int J Mol Med.* 2017;40(4):1185–93.
  259. Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, Pete J, Tikellis C, Thallas-Bonke V, et al. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: Implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9):2484–94.
  260. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2001;280(5 43-5).
  261. Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal Fibrosis and Glomerulosclerosis in a New Mouse Model of Diabetic Nephropathy and Its Regression by Bone Morphogenic Protein-7 and Advanced Glycation End Product Inhibitors. *Diabetes* [Internet]. 2007 Jul 1;56(7):1825–33. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db06-1226>

262. Gomes IBS, Porto ML, Santos MCLFS, Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, et al. The protective effects of oral low-dose quercetin on diabetic nephropathy in hypercholesterolemic mice. *Front Physiol* [Internet]. 2015 Sep 2;6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2015.00247/abstract>
263. Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu J, Rodriguez A, et al. Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:44492. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28281693>
264. Ruggenti P, Cravedi P, Remuzzi G. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2010;6(6):319–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2010.58>
265. Hou FF, Zhang X, Zhang GH, Xie D, Chen PY, Zhang WR, et al. Efficacy and Safety of Benazepril for Advanced Chronic Renal Insufficiency. *N Engl J Med*. 2006;354(2):131–40.
266. Zatz R, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(17):5963–7.
267. Ribeiro AB. Prevention of Cardiovascular Outcomes and Renal Protection in Diabetic Nephropathy and Proteinuria. 2006;50:327–33.
268. Cao L-H, Chen Q, Chen J, Chen W-M. Irbesartan inhibits the formation of calcium oxalate stones in the kidney of diabetic rats. *Int J Clin Exp Med*. 2018;11(3):1726–33.
269. Makhloogh A, Kashi Z, Akha O, Zaboli E, Yazdanicharati J. Effect of spironolactone on diabetic nephropathy compared to the combination of spironolactone and losartan. *Nephrourol Mon*. 2014;6(1):1–6.
270. Omboni S, Volpe M. Management of arterial hypertension with angiotensin receptor blockers: Current evidence and the role of olmesartan. *Cardiovasc Ther* [Internet]. 2018 Dec 13;36(6):e12471. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1755-5922.12471>
271. Imai E, Chan JCN, Ito S, Yamasaki T, Kobayashi F, Haneda M, et al. Effects of olmesartan on renal and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes with overt nephropathy: a multicentre, randomised, placebo-controlled study. *Diabetologia* [Internet]. 2011 Dec;54(12):2978–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993710>
272. Agrawal A, Kamila S, Reddy S, Lilly J, Mariyala MS. Effect of telmisartan on kidney function in patients with chronic kidney disease: an observational study. *J drug Assess* [Internet]. 2016;5(1):24–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27994942>
273. Callera GE, Antunes TT, Correa JW, Moorman D, Gutsol A, He Y, et al. Differential renal effects of candesartan at high and ultra-high doses in diabetic mice-potential role of the ACE2/AT2R/Mas axis. *Biosci Rep* [Internet]. 2016;36(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612496>
274. Chatzikyrkou C, Menne J. Update on the ROADMAP clinical trial report: olmesartan for the prevention or delay of microalbuminuria development in type 2 diabetes. *Expert Rev Cardiovasc Ther* [Internet]. 2012 Sep;10(9):1087–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23098143>
275. Haller H, Viberti GC, Mimran A, Remuzzi G, Rabelink AJ, Ritz E, et al. Preventing microalbuminuria in patients with diabetes: rationale and design of the Randomised Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention (ROADMAP) study. *J Hypertens* [Internet]. 2006 Feb;24(2):403–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508590>
276. Gu J, Yang M, Qi N, Mei S, Chen J, Song S, et al. Olmesartan Prevents Microalbuminuria in db/db Diabetic Mice Through Inhibition of Angiotensin II/p38/SIRT1-Induced Podocyte Apoptosis. *Kidney Blood Press Res* [Internet]. 2016;41(6):848–64. Available from:

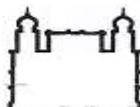
<https://www.karger.com/Article/FullText/452588>

277. Mizushige T, Kobori H, Hitomi H, Nishijima Y, Tomoda F, Morimoto S, et al. Urinary Angiotensinogen Could Be a Prognostic Marker of the Renoprotection of Olmesartan in Metabolic Syndrome Patients. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Oct 27;17(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27801805>
278. Zhang M-Z, Wang S, Yang S, Yang H, Fan X, Takahashi T, et al. Role of blood pressure and the renin-angiotensin system in development of diabetic nephropathy (DN) in eNOS-/- db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2012 Feb 15;302(4):F433-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114203>
279. Mori H, Yamamoto H, Ukai H, Yuasa S, Nakajima K, Mikawa T, et al. Comparison of effects of angiotensin II receptor blocker on morning home blood pressure and cardiorenal protection between morning administration and evening administration in hypertensive patients: the COMPATIBLE study. *Hypertens Res* [Internet]. 2013 Mar;36(3):202–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23013888>
280. Tanimoto M, Gohda T, Kaneko S, Hagiwara S, Murakoshi M, Aoki T, et al. Effect of pyridoxamine (K-163), an inhibitor of advanced glycation end products, on type 2 diabetic nephropathy in KK-Ay/Ta mice. *Metabolism*. 2007;56(2):160–7.
281. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int*. 2002;61(3):939–50.
282. Brattström L, Stavenow L, Galvard H, Nilsson-Ehle P, Berntorp E, Jerntorp P, et al. Pyridoxine reduces cholesterol and low-density lipoprotein and increases antithrombin III activity in 80-year-old men with low plasma pyridoxal 5-phosphate. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 1990 Dec;50(8):873–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2084825>
283. Abouzed TK, Munesue S, Harashima A, Masuo Y, Kato Y, Khailo K, et al. Preventive Effect of Salicylate and Pyridoxamine on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016;2016:1786789. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28042580>
284. Zhao X, Chen Y, Tan X, Zhang L, Zhang H, Li Z, et al. Advanced glycation end-products suppress autophagic flux in podocytes by activating mammalian target of rapamycin and inhibiting nuclear translocation of transcription factor EB. *J Pathol* [Internet]. 2018;245(2):235–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29570219>
285. Rabbani N, Alam SS, Riaz S, Larkin JR, Akhtar MW, Shafi T, et al. High-dose thiamine therapy for patients with type 2 diabetes and microalbuminuria: a randomised, double-blind placebo-controlled pilot study. *Diabetologia* [Internet]. 2009 Feb;52(2):208–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057893>
286. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* [Internet]. 24(1):32–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685005>
287. Alkhalaf A, Klooster A, van Oeveren W, Achenbach U, Kleefstra N, Slingerland RJ, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on benfotiamine treatment in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* [Internet]. 2010 Jul;33(7):1598–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413516>
288. Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* [Internet]. 2007 Jul;56(7):1825–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456853>
289. Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int* [Internet]. 2003 Jun;63(6):2123–33. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753299>
290. Ozer A, Altuntas CZ, Izgi K, Bicer F, Hultgren SJ, Liu G, et al. Advanced glycation end products facilitate bacterial adherence in urinary tract infection in diabetic mice. *Pathog Dis* [Internet]. 2015 Jul;73(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25986378>
  291. Metz TO, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2003 Nov;419(1):41–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986103004260>
  292. Zheng F, Zeng YJ, Plati AR, Elliot SJ, Berho M, Potier M, et al. Combined AGE inhibition and ACEi decreases the progression of established diabetic nephropathy in B6 db/db mice. *Kidney Int* [Internet]. 2006;70(3):507–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5001578>
  293. Zheng F, Zeng YJ, Plati AR, Elliot SJ, Berho M, Potier M, et al. Combined AGE inhibition and ACEi decreases the progression of established diabetic nephropathy in B6 db/db mice. *Kidney Int*. 2006;70(3):507–14.
  294. Thomas MC, Tikellis C, Burns WM, Bialkowski K, Cao Z, Coughlan MT, et al. Interactions between renin angiotensin system and advanced glycation in the kidney. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005 Oct;16(10):2976–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107577>
  295. Davis BJ, Forbes JM, Thomas MC, Jerums G, Burns WC, Kawachi H, et al. Superior renoprotective effects of combination therapy with ACE and AGE inhibition in the diabetic spontaneously hypertensive rat. *Diabetologia* [Internet]. 2004 Jan;47(1):89–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647892>
  296. Zhu P, Lin H, Sun C, Lin F, Yu H, Zhuo X, et al. Synergistic effects of telmisartan and pyridoxamine on early renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med Rep* [Internet]. 2012 Mar;5(3):655–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22200727>

## ANEXO

### Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



#### LICENÇA ADITIVA

**L-012/2018- A1**

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à solicitação da pesquisadora, **ANISSA DALIRY** responsável pela licença (L-012/2018), do protocolo (CEUA/IOC-011/2018), intitulado "Estudo dos mecanismos de geração de lesão hepática após dieta hiperlipídica", que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação.

Está licença aditiva apenas altera a linhagem dos animais já licenciados, sem incremento do número total de animais.

#### **Camundongo (*M. musculus*), da linhagem**

C57BL/6 - 480 animais machos de 4-8 semanas

**Observação:** Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 05 de fevereiro de 2019.

*Cecilia J. G. de Almeida*  
Cecilia Jacques Gonçalves de Almeida  
Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo  
Fundação Oswaldo Cruz

*Cecilia* Jacques G. de Almeida  
Coordenadora da CEUA - IOC  
IOC - FIOCRUZ  
Mat. SUAPE: 1535407-9