

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PAULA COMUNE PENNACCHI

**MODULAÇÃO DA ENZIMA INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASE
PELOS AGE_s (PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS**

Alfenas/MG

2011

PAULA COMUNE PENNACCHI

**MODULAÇÃO DA ENZIMA INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASE
PELOS AGE_s (PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela
Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Fisiologia.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues

Alfenas/MG

2011

PAULA COMUNE PENNACCHI

**MODULAÇÃO DA ENZIMA INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASE
PELOS AGE_s (PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em:

Prof.:

Instituição:

Assinatura:

Prof.:

Instituição:

Assinatura:

Prof.:

Instituição:

Assinatura:

Aos meus pais,
Vocês são o motivo de tudo isso,
São a força que me manteve em pé, meu alicerce e meu porto,
Sem vocês nada disso teria sentido,
Pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos,
Por acreditarem em mim quando eu mesma não podia,
Minha eterna gratidão,
O amor de vocês me fez maior.

Ao meu amor,
À minha maior surpresa,
Por tornar meus dias tão melhores,
Por me fazer rir, por sempre me lembrar que havia algo mais,
Por me ouvir, por me aconselhar, por se empolgar, por me apoiar sempre.
Por buscar em mim o meu melhor, e doar de si o seu melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas, à Sociedade Brasileira de Fisiologia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas por me acolher e me oferecer tamanho crescimento acadêmico e pessoal.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro que tornou possível esse projeto bem como minha dedicação exclusiva à pesquisa.

A todos os professores que me guiaram, contribuindo para minha formação.

Aos secretários do programa, Marcus, Tiago e Antonieta, que sempre me orientaram da melhor forma possível com grande disponibilidade e boa vontade.

À Eliana, que nos apoiou desde o início, que suportou nossa bagunça, que nos consolou tantas vezes e ajudou nas horas em que mais precisamos.

Aos alunos de Iniciação Científica, a ajuda de vocês foi fundamental.

À Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula pela imensa disponibilidade, por querer fazer dar certo.

À Profa. Dra. Maísa Ribeiro Brigagão e ao laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG pela parceria na realização dos experimentos.

Ao laboratório de Histologia da UNIFAL-MG e ao Prof. Dr. Tomás Henrique Araújo pela co-orientação neste trabalho, pela orientação desde minha Iniciação Científica e por abrir tantas portas para meu crescimento acadêmico.

Ao laboratório e professores do Departamento de Fisiologia da UNIFAL-MG por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Aos funcionários do Biotério da UNIFAL-MG pela dedicação no cuidado dos nossos animais, fundamental ao sucesso dos procedimentos.

À Profa. Dra. Ana Campa, Sabrina, Silene e Melissa que abriram as portas do laboratório de Bioquímica Clínica (FCF-USP) ao nosso projeto. Muito obrigada pelas inúmeras análises, orientações e conselhos.

À Profa. Dra. Noemi Nozome Taniwaki e ao Setor de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, por toda atenção e carinho com que sempre me receberam.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes da UNESP-Bauru-SP por se mostrar solidário e dividir conosco suas experiências.

Aos meus irmãos, sempre empolgados e curiosos, me incentivando e me ouvindo pacientemente, mesmo quando não entendiam nada do que eu falava.

Aos membros da banca avaliadora, pela grande disposição em participar e contribuir para finalização dessa dissertação.

À Cláudia, minha colega e amiga, que demonstrou ao longo destes dois anos o verdadeiro significado de companheirismo. Que dividiu comigo bons e maus momentos, com quem aprendi tudo e sem a qual jamais teria conseguido. Cláudia, levo comigo algo muito mais importante que um título, levo sua amizade, foi uma honra trabalhar com você.

Finalmente agradeço à minha querida orientadora, Maria Rita Rodrigues. Muito obrigada por confiar à mim este projeto, por acreditar no meu potencial e me fazer crescer. Obrigada por me ensinar muito além da teoria e abrir um novo horizonte para mim.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O *diabetes mellitus* (DM) em longo prazo pode levar a diversos problemas entre eles a insuficiência renal, cegueira, alterações vasculares e neurológicas. Entre as teorias que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais responsáveis pelas complicações observadas no DM, a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) é considerada uma das mais importantes. Sabe-se também que nas doenças cardiovasculares, uma das principais complicações do diabetes, ocorre um aumento das quinureninas, produtos de oxidação do triptofano, numa reação catalisada pela enzima Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO). Neste trabalho avaliamos a influência dos AGEs sobre a modulação da enzima IDO no estado diabético e seu impacto nos principais marcadores de risco cardíaco. Foi utilizado um modelo experimental de diabetes induzido pela injeção *i.p.* de aloxano em ratos Wistar que foram divididos em 6 grupos (n=8 por grupo): Diabético Ativado (DA), Diabético Não Ativado (DNA), Diabético Ativado tratado com aminoguanidina (DAAG), Diabético Não Ativado tratado com AG (DNAAG), Controle Ativado (CA) e Controle Não Ativado (CNA). A aminoguanidina (AG) é um conhecido inibidor da formação de AGEs e foi administrada por gavagem por 50 dias após a instalação do DM. A formação de quinureninas reflete a atividade de IDO e foi medida em macrófagos peritoneais e homogenato de cérebro, por HPLC. A expressão de IDO foi avaliada por Dot blot, imunofluorescência e imunocitoquímica. Os principais marcadores de risco cardíaco (colesterol total e suas frações e PCR-US) foram determinados através de kits comerciais. Além disso, foi avaliado também o perfil glicêmico e renal destes animais, uma vez que os AGEs são nefrotóxicos. Como esperado, no estado diabético houve um aumento de 2,9 vezes na formação dos AGEs, em relação aos animais controle e a aminoguanidina inibiu cerca de 35% da formação destes produtos. Observamos um aumento na atividade e expressão de IDO em macrófagos e homogenato de cérebro de ratos diabéticos em relação ao controle. O aumento visto em macrófagos foi mais evidente quando estas células foram ativadas pelo LPS, mimetizando uma situação de infecção. Este aumento ocorreu de forma independente da concentração dos AGEs, uma vez que não houve diferença entre os grupos tratados e não tratados pela AG. Da mesma forma observada para a modulação da IDO, o tratamento com a AG não alterou os perfis glicêmico, lipídico e renal no nosso modelo experimental. Nossos resultados demonstram que o estado hiperglicêmico eleva os níveis de IDO. Estes achados sugerem que IDO pode vir a se tornar um marcador da morbidade do diabetes e potencial alvo em novas estratégias terapêuticas para o DM.

Palavras chave: Diabetes Mellitus. Produtos Finais de Glicação Avançada. Indolamina-Pirrol 2,3 dioxigenase.

ABSTRACT

The diabetes mellitus (DM) is a chronic disease that is known to cause several long-term complications such as renal insufficiency, blindness, vascular and neurological changes. There are some theories trying to explain how chronic hyperglycemia may lead to cellular and tissue impairments and the Advanced Glycation End-Products (AGE) theory is one of the most important. Cardiovascular disease is one of the diabetes mellitus long-term complications and in this case it was observed an increased serum concentration of kynurenine, an indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) catalyzed tryptophan oxidation product. In this study we evaluated the IDO modulation by AGEs in diabetic rats and the impact of this modulation in cardiac risk markers. For diabetes model, Wistar rats were treated with intraperitoneal (*i.p.*) injection of aloxane. It was evaluated 6 different groups (n=8): Activated diabetic (DA), Non Activated diabetic (DNA), Activated diabetic treated with aminoguanidine (DAAG), Non activated diabetic treated with aminoguanidine (DNAAG), Activated control (CA) and Non activated control (CAN). Aminoguanidine (AG) is a known AGEs formation inhibitor and it was administrated by gavage during 50 days after the DM was installed. Kynurenine formation is a measure of IDO activity and it was evaluated, by HPLC, in peritoneal macrophages and brain homogenates. The IDO protein expression was analyzed by Dot Blot, Immunofluorescence and immunocytochemistry. The main cardiac risk markers (total cholesterol and fractions and PCR-US) were determined by commercial kits. The glycemic and renal profile were also evaluated since AGEs are known to be nephrotoxic. As expected, we observed an increase in AGEs by 2,9 times when compared with the control and the aminoguanidine compound inhibited 35% of these products. There was an increase in the IDO expression and activity in macrophages and brain homogenates in diabetic rats when compared with control. This rise was more evident when the animals were treated with LPS, mimicking an infection. The difference of IDO activity and expression was not due to the AGEs concentration since we did not observe difference between the AG treated and non-treated groups. The same way observed by IDO modulation, the AG treatment did not alter the glycemic, lipidic and renal profiles in this experimental model. These results showed that the hyperglycemic state increase IDO levels. These findings suggest that IDO might be a morbid diabetes marker and a potential target of new therapeutic strategies of DM.

Key words: Diabetes Mellitus. Advanced Glycation End Products. Indoleamine-pyrol 2,3 dioxygenase.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Pesos Finais	39
Gráfico 2 - Glicemia	41
Gráfico 3 - Hemoglobina glicada	42
Gráfico 4 - Frutosamina	44
Gráfico 5 - Fluorescência dos AGEs no soro.....	45
Gráfico 6 - Fluorescência dos AGEs nos rins	46
Gráfico 7 - Uréia	48
Gráfico 8 - Creatinina.....	49
Gráfico 9 - Colesterol total	52
Gráfico 10 - Colesterol HDL.....	52
Gráfico 11 - Colesterol Não-HDL.....	53
Gráfico 12 - Triglicérides.....	54
Gráfico 13 - PCR-US	55
Gráfico 14 - Atividade de IDO - Macrófagos	56
Gráfico 15 - Atividade de IDO - Cérebro.....	57
Gráfico 16 - Expressão de IDO - <i>Dot blot</i>	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama Esquemático da Via das Quinureninas	25
Figura 2 - Corte Histológico da Zona Medular Renal dos Animais Experimentais.....	49
A) Glomérulo de animal diabético +AG.....	49
B) Glomérulo de animal diabético.....	49
C) Glomérulo de animal controle	49
Figura 3 - Expressão de IDO: Ativação por LPS em animais controle	58
A) Imunocitoquímica de Animal Controle.....	58
B) Imunocitoquímica de Animal Controle Ativado.....	58
C) Imunofluorescência de Animal controle	58
D) Imunofluorescência de Animal controle Ativado	58
Figura 4 - Expressão de IDO: ativação por LPS em animais diabéticos	59
A) Imunocitoquímica de Animal diabético.....	59
B) Imunocitoquímica de Animal diabético ativado	59
C) Imunofluorescência de Animal diabético.....	59
D) Imunofluorescência de Animal diabético ativado	59
Figura 5 - Expressão de IDO: Animais Controle x Animais Diabéticos sem LPS	60
A) Imunocitoquímica de Animal controle	60
B) Imunocitoquímica de Animal diabético.....	60
C) Imunofluorescência de Animal controle	60
D) Imunofluorescência de Animal diabético.....	60
Figura 6 - Expressão de IDO: animais controle x animais diabéticos com LPS	61
A) Imunocitoquímica de Animal controle ativado.....	61
B) Imunocitoquímica de Animal diabético Ativado.....	61
C) Imunofluorescência de Animal controle Ativado	61

D) Imunofluorescência de Animal diabético Ativado.....	61
Figura 7 - Expressão de IDO: Animais Diabéticos x Animais Diabéticos +AG	62
A) Imunofluorescência de Animal Diabético AG ativado.....	62
B) Imunofluorescência de Animal diabético AG.....	62
C) Imunofluorescência de Animal diabético Ativado.....	62
D) Imunofluorescência de Animal diabético.....	62
Figura 8 - Esquema da Marcação de IDO nos Macrófagos.....	63
Figura 9 - Expressão de IDO por <i>Dot blot</i>	64

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- 1 MT** – 1-metiltryptofano
- 3-DG** – 3-deoxiglicosona
- AFGP** – 1-alkil-2-formil-3,4 diglicosil pirrol
- AG** – Aminoguanidina
- AGE-R1, R2 e R3** – Receptores para AGEs
- AGEs** – Produtos Finais de Glicação Avançada
- AIDS** – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- APC** – Células apresentadoras de antígenos
- CD36** – Receptor para AGEs
- CEL** – Carboxietilisina
- CML** – Carboximetilisina
- DAB** – Diamnibenzidina
- DAD** – Detector de arranjos de diodos
- DAPI** – Dihidrocloreto de 4',6-diamino-2-feilindole
- DM** – Diabetes Mellitus
- DM1**- Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2** – Diabetes Mellitus tipo 2
- DNA** – cido desoxiribonucléico
- DOLD** - Dímero de lisina derivado da 3-deoxiglicosona
- FFI** – 2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol
- FITC** – Fluoresceína isotiocianato
- GO** – Glioxal
- GOLD** – Dímero de lisina derivado do glioxal
- Hb A1c** – Hemoglobina glicada
- HDL** – Lipopoliprotenas de alta densidade
- HPLC** – Cromatografia Líquida de alta performance
- IDO** – Indolamina 2,3 dioxigenase
- IDO1 e 2** – Genes codificantes da enzima IDO
- IL-1** – Interleucina 1
- INF** – Intrferon
- LADA** – Diabetes autoimune latente

LDL – Lipopoliproteína de baixa densidade
LPS – Lipopolissacarídeo de membrana
MGG – Método de coloração May-Grumwald-Giemsa
MgO – Metilglioxal
MOLD – Dímero de lisina derivado do metilglioxal
NF- κ B – Fator nuclear ativador das células B
NFK – *N*-formil-quinurenina
NOD – Camundongos diabéticos não obesos
NOS – Óxido nítrico sintase
PBS – Tampão fosfato salino
PCR-US – Proteína C reativa ultra-sensível
PGN – Tampão fosfato contendo 0,25% de gelatina e 0,1% de azida sódica
PMN – Polimorfonuclear
PPD – Parafenileno-diamino
QUIN – Quinurenina
RAGE – Receptor para AGEs
T – Triptofano
TNF- α – Fator α de necrose tumoral
VCAM-1 – Molécula de adesão vascular
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	DIABETES MELLITUS	18
1.2	PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs).....	20
1.3	INDOLAMINA 2,3- DIOXIGENASE (IDO).....	24
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	29
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
3.2	INDUÇÃO DO DIABETES E TRATAMENTO PARA INIBIÇÃO DE AGEs.....	30
3.3	ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS	30
3.4	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	30
3.5	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DA CAVIDADE INTRAPERITONEAL	31
3.6	CONTAGEM DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	31
3.7	DETERMINAÇÃO DA GLICUSÚRIA/GLICEMIA	31
3.8	DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLICADA	32
3.9	AVALIAÇÃO DOS AGEs	32
3.10	DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	32
3.11	DOSAGEM DA PROTEÍNA C REATIVA ULTRA-SENSÍVEL.....	33
3.12	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE IDO	33
3.13	EXPRESSÃO DE IDO POR DOT BLOT.....	34
3.14	PREPARO DAS LÂMINAS SILANIZADAS.....	34
3.15	EXPRESSÃO DE IDO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	35
3.16	EXPRESSÃO DE IDO POR IMUNOCITOQUÍMICA	36
3.17	ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS RINS	36
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	PESO.....	38
4.2	ATIVAÇÃO DOS MACRÓFAGOS.....	39

4.3	AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÊMICO.....	40
4.3.1	<i>Glicosúria/Glicemia dos Animais</i>	41
4.3.2	<i>Hemoglobina Glicada</i>	42
4.3.3	<i>Frutosamina</i>	43
4.4	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO/INIBIÇÃO DOS AGES.....	44
4.5	AVALIAÇÃO DO DANO RENAL.....	46
4.5.1	<i>Uréia e Creatinina</i>	47
4.5.2	<i>Análise Histológica dos Rins</i>	49
4.6	AVALIAÇÃO DO RISCO CARDÍACO	51
4.6.1	<i>Colesterol Total e Lipoproteínas</i>	51
4.6.2	<i>Colesterol HDL</i>	52
4.6.3	<i>Colesterol Não-HDL</i>	52
4.6.4	<i>Triglicérides</i>	53
4.6.5	<i>Avaliação da PCR-US</i>	54
4.7	AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA ENZIMA IDO.....	55
4.7.1	<i>Avaliação da atividade de IDO</i>	56
4.7.2	<i>Efeito da ativação de macrófagos por LPS na expressão de IDO por imunomarcação</i>	58
4.7.3	<i>Efeito da ativação de macrófagos por LPS na expressão de IDO por Dot blot</i>	63
5	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é atualmente um problema importante de saúde pública mundial, devido a sua morbidade e ao alto índice de mortalidade causada principalmente por complicações em longo prazo como a insuficiência renal, doenças cardiovasculares e distúrbios neurológicos. Em 2007 havia aproximadamente 246 milhões de indivíduos com diabetes e o número tende a aumentar, podendo chegar a 370 milhões em 2030 ¹. A incidência e a prevalência do diabetes aumentam a cada ano em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento. No Brasil o DM afeta aproximadamente 7,6% da população entre 30 e 69 anos ².

A hiperglicemia persistente, característica da doença pode levar à glicação de proteínas e a auto-oxidação da glicose que tem como consequência o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, formação de produtos de glicação avançada, também chamados AGEs (do inglês, Advanced Glycated End-Products), entre outros ³.

Uma das principais causas de mortalidade em pacientes diabéticos deve-se aos problemas cardiovasculares ^{4, 5}. Já foi demonstrado anteriormente um aumento na síntese de quinurenina a partir do triptofano numa reação catalizada pela enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) na doença cardiovascular ⁶⁻⁸. Dados da literatura mostram também o envolvimento da enzima IDO na resposta imune em doenças cardíacas ^{9, 10}. Num outro trabalho, foi sugerido que uma baixa expressão da atividade de IDO em células dendríticas, parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento do diabetes ¹¹.

Desta forma, este trabalho foi proposto para verificar o efeito do estado diabético e dos AGEs sobre a enzima IDO, pelo papel ambíguo que esta enzima parece desempenhar no DM e nas complicações decorrentes desta doença. A revisão da literatura que se segue apresenta os principais tópicos que auxiliam a compreensão do nosso trabalho.

1.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é definido como uma síndrome de hiperglicemia crônica resultante da falta de produção de insulina e/ou de resistência à ação deste hormônio. A classificação do DM inclui: diabetes mellitus tipo 1 (insulino-dependente), diabetes mellitus tipo 2 (não-insulino-dependente), diabetes mellitus gestacional, diabetes mellitus associado a outras doenças ou secundário entre outros ¹².

O DM tipo 1, comumente encontrado em crianças e adolescentes, tem origem auto-imune. Variações desta categoria têm sido propostas mais recentemente. Dentre elas o diabetes auto-imune latente (LADA) cujos pacientes desenvolvem o DM tipo 1 de uma forma não clássica, a partir dos 20 anos de idade, constituindo significativa fração dos diabéticos adultos. O diabetes Tipo 1 (DM1) é forma presente em 5%-10% dos casos ¹².

O diabetes tipo 2 (DM2), ocorre em 90-95% dos pacientes com diabetes. Observa-se nestes casos uma predominância de resistência insulínica que pode estar associada tanto a uma deficiência relativa na produção de insulina pelas células β -pancreáticas, quanto a defeitos na secreção de insulina ¹².

Embora a etiologia específica da DM2 não seja totalmente conhecida, sabe-se que não ocorre a destruição auto-imune das células β -pancreáticas e que geralmente se associa a uma forte predisposição genética, cujos fatores ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, fatores ambientais também são importantes. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e cetoacidose raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos ¹³.

O DM gestacional é causado pela diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto ^{12, 13}.

O diabetes associado a outras doenças abrange variadas formas de DM, decorrentes de pré-disposição genética associada com doenças como pancreatite, hipertireoidismo ou devido ao uso de fármacos diabetogênicos. A toxicidade das

drogas diabetogênicas como, por exemplo, o aloxano, decorre de sua ação degenerativa sobre as células β -pancreáticas¹⁴.

No diabetes ocorrem alterações fisiológicas que diminuem a capacidade imunológica e a resposta inflamatória dos pacientes, aumentando a susceptibilidade às infecções¹⁵. O grau de controle glicêmico está envolvido na patogênese dessas alterações. Ocorrem disfunções nos leucócitos como anormalidades na aderência, quimiotaxia, fagocitose e destruição intracelular. Há diminuição, também, da ativação espontânea e da resposta neutrofílica, se comparadas aos indivíduos não diabéticos¹⁶. Simultaneamente, uma queda na resposta desses polimorfonucleares (PMN) a estímulos diversos pode ser responsável pela elevada incidência de infecção bacteriana em diabéticos¹⁷.

Existem teorias de que a hiperglicemia ou a presença dos produtos finais da glicação levam a um estado de persistente ativação dos PMN, o que induz a ativação espontânea de cadeia oxidativa e liberação de mieloperoxidase, elastase e outros componentes dos grânulos neutrofílicos, podendo tornar os PMN menos responsivos quando estimulados por patógenos, podendo ainda, iniciar um processo patológico, levando à injúria vascular. Alguns estudos têm demonstrado que a fagocitose pelos polimorfonucleares ocorre em níveis similares em indivíduos diabéticos e não diabéticos, porém de acordo com Wilson e Reeves, 1986, a capacidade de *killing* de *Escherichia coli* e *Candida albicans* é prejudicada pelo DM¹⁸. Há ainda estudos que afirmam que o grupo diabético é caracterizado por um dano significativo de capacidade fagocítica quando comparado com não diabéticos¹⁹.

O aumento da expressão das moléculas de adesão nos polimorfonucleares é importante na patogênese da aterosclerose, uma das mais importantes complicações do diabetes e principais causas de morbidez e mortalidade nestes pacientes^{4, 5}. Sabe-se que adultos com diabetes têm taxas de doenças do coração levando à morte cerca de 2 a 4 vezes maiores do que os adultos sem diabetes²⁰. A hiperglicemia tanto aguda quanto crônica é responsável pelo surgimento de micro e macroangiopatias e a piora do controle glicêmico leva à inflamação e ruptura das placas ateromatosas^{21, 22}. Além destas alterações o diabetes pode provocar complicações como a insuficiência renal, a cegueira e distúrbios neurológicos^{23, 24}. O controle da hiperglicemia pode reduzir o surgimento e progressão de retinopatias, nefropatias e neuropatias^{25, 26}.

1.2 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)

Os produtos finais de glicação avançada constituem uma variedade de substâncias formadas a partir de interações entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos.

Trabalhos anteriores demonstraram que os AGEs (do inglês, Advanced Glycated End Products) desempenham um importante papel no desenvolvimento das complicações do DM ³.

Neste processo, a molécula de glicose pode ligar-se a estrutura de proteínas, através de uma reação não enzimática denominada reação de *Maillard* ou glicação. Esta reação divide-se em três estágios: inicial, intermediário e final ²⁷.

No estágio inicial a glicose ou outros açúcares redutores (frutose, pentose, galactose, manose, ascorbato e xilose) reagem com radicais amina presentes em várias moléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios formando uma base de *Schiff*, instável. Esta por sua vez, passa por um rearranjo gerando uma cetoamina estável, conhecida como “Produto de Amadori” ²⁷. As principais variáveis que regulam a formação destes compostos são as concentrações de glicose, a meia vida da proteína, sua reatividade em termos de grupamentos amina livres e a permeabilidade celular à glicose. Estes produtos possuem grupos carbonilas reativos e através de ligações irreversíveis podem acumular-se em proteínas de meia vida curta e longa. A hemoglobina glicada e as frutosaminas são conhecidos exemplos de “Produtos de Amadori” ^{27, 28}.

No estágio intermediário, os produtos de Amadori passam por reações de oxidação e desidratação levando à formação de compostos contendo dicarbonilas como glioxal, metil glioxal e 3-deoxiglicosonas. Estes compostos são mais reativos que seus precursores e atuam propagando reações com grupos amina livres de proteínas. Em particular o metil glioxal, um alfa-oxaldeido, que é um dos compostos mais importantes *in vivo* tanto por sua alta reatividade como pela elevada concentração plasmática ²⁹.

No estágio final estes propagadores podem interagir com grupamentos amina e através de reações de oxidação, desidratação e ciclização, formar compostos fluorescentes, insolúveis e irreversíveis, denominados produtos finais de glicação avançada, os AGEs, que se acumulam nas proteínas e levam a lesões tissulares ²⁷.

Outro mecanismo pelo qual os AGEs podem ser formados tem sido relatado na literatura. Este envolve auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres, levando à formação de compostos carbonila mais reativos, que interagem com proteínas e formam cetoaminas altamente reativas ³.

Os AGEs mais representativos são: N^ε-carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro, N^ε-carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímero de lisina derivado do glioxal (GOLD), dímero de lisina derivado do metil glioxal (MOLD), dímero de lisina derivado da 3-deoxiglicose (DOLD), 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol (AFGP) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol) e os fluorófos pentosidina e arg-piridina ³⁰⁻³⁴.

Diversos estudos têm utilizado a mensuração de produtos de glicação no soro ou nos tecidos de diabéticos para avaliar o risco de progressão da doença. Os dois parâmetros mais utilizados são a avaliação da hemoglobina glicada (HbA1c) e das proteínas glicadas do soro ou frutossaminas ²⁷. A avaliação do controle metabólico no diabetes mellitus pode ser realizada estimando-se a extensão da exposição do organismo à glicose, através da determinação dos produtos iniciais de glicação. Os produtos intermediários de glicação que podem ser estimados no laboratório são glioxal, metil glioxal e deoxiglicosanos. Estudos demonstraram um aumento na concentração de metil glioxal nos rins, olhos e plasma de animais diabéticos quando comparados aos animais saudáveis. Este aumento ocorre de forma proporcional aos níveis glicêmicos ²⁷.

A formação dos AGEs através da hiperglicemia crônica contribui para complicações do diabetes. Eles parecem exercer importante papel na patogênese da cardiomiopatia. O aumento da formação de AGEs, associados ao colágeno, gera rigidez miocárdica seguida de fibrose já que modificam a estrutura das proteínas, principalmente do colágeno, afetando suas funções ^{35, 36}.

A caracterização estrutural dos produtos finais de glicação avançada é particularmente difícil devido a sua complexidade química, no entanto, a pentosidina e carboximetilisina (CML), já foram caracterizadas estruturalmente. Altos níveis de pentosidina têm sido observados no plasma, hemácias e urina de pacientes diabéticos. Este aumento tem sido correlacionado com a idade e duração do diabetes. Além disso, existe uma relação linear entre os níveis de pentosidina e a severidade das complicações micro e macro angiopáticas. Altos níveis de CML têm sido observados em pacientes diabéticos e associados à retinopatia e nefropatia.

Além disso, estudos recentes também indicam que a peroxidação lipídica, juntamente com a glicação, pode ser uma importante fonte de CML no diabetes e na aterosclerose ²⁷.

Os AGEs formados podem lesar as células por diferentes mecanismos, tais como formação de ligações cruzadas com macromoléculas, interação com receptores celulares específicos e glicação intracelular. A formação de ligações cruzadas com o colágeno tem sido demonstrada em pacientes diabéticos e justifica a ocorrência de várias complicações crônicas observadas no DM tais como, rigidez vascular e espessamento de membranas basais. Além disso, a glicação da molécula de colágeno pode inibir a liberação de óxido nítrico derivado do endotélio, com conseqüente vasoconstrição, redução do fluxo plasmático e isquemia tissular ³⁰⁻³⁴.

Estudo *in vivo* e *in vitro* indicam que os AGEs têm um papel essencial na patogênese da nefropatia diabética e na progressão da insuficiência renal. As complicações do envelhecimento normal, como perda da função renal, doença de Alzheimer, alterações de pele e cataratas, podem também ser mediadas pela glicação progressiva das proteínas de vida longa ³⁷.

A ligação de AGEs à molécula de colágeno pode alterar a estrutura e função biológica de macromoléculas tais como lipoproteínas, imunoglobulinas, entre outras. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ligadas ao colágeno glicado não são reconhecidas pelos receptores específicos para LDL, favorecendo sua captação por receptores inespecíficos e conseqüente formação de células espumosas. São ainda capazes de estimular a liberação de tromboxano β_2 e de induzir agregação plaquetária, além de gerar radicais livres com conseqüente aumento de lesões oxidativas ³⁴. Finalmente, estas lipoproteínas com estrutura alterada estimulam a liberação de anticorpos levando a formação de complexos imunes que se depositam nas paredes dos vasos. Todos estes mecanismos podem contribuir para a oclusão dos vasos e justificam a ocorrência de macroangiopatia no paciente diabético ³⁴.

Imunoglobulinas ligadas ao colágeno têm uma capacidade diminuída de formar complexos antígeno-anticorpo. Além disso, sabe-se que a atividade dos neutrófilos polimorfonucleares está modificada em diabéticos, devido à diminuição da quimiotaxia, aderência, fagocitose e destruição intracelular, o que diminui a capacidade imunológica e a resposta inflamatória desses pacientes ³⁸.

Dados da literatura têm demonstrado a existência de receptores celulares específicos para AGEs. Estes receptores foram identificados em diferentes células,

tais como, linfócitos T, monócitos/ macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa, neurônios, células vermelhas e mesangiais. Entre os diferentes receptores de AGEs, o receptor denominado RAGE é provavelmente a molécula mais bem caracterizada até o momento ³⁴.

Quanto à glicação intracelular, sabe-se que os AGEs formados podem interagir com nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição do DNA celular e alterar propriedades importantes para a homeostase celular ³.

Sendo assim, os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas ³. Dados da literatura têm demonstrado a participação dos AGEs em várias patologias, com destaque para o diabetes mellitus, a aterosclerose, a insuficiência renal, o processo inflamatório, a doença de Alzheimer e o processo de envelhecimento ³⁹⁻⁴¹. Além dos AGEs existem outros produtos que também têm sido correlacionados com estas doenças entre eles as quinureninas, produtos da catálise da enzima indolamina 2,3 dioxigenase ^{6-8, 42-44}.

O primeiro composto a ser extensivamente estudado *in vitro* e *in vivo* como sendo um potente inibidor da formação de AGEs foi a aminoguanidina (AG) ⁴⁵. AG tem sido amplamente testada em modelos animais. Estudos de vários investigadores demonstraram que ela retarda o desenvolvimento de complicações diabéticas, incluindo nefropatia, neuropatia e vasculopatia ⁴⁶.

A AG é uma pequena molécula de hidrazina, um composto nucleofílico que age como armadilha para reativos carbonílicos intermediários, tais como metilglioxal (MgO), glioxal (GO), e 3-deoxiglicosona (3-DG) ⁴⁷. AG inibe a formação de carboximetilisina (CML) e carboxietilisina (CEL), inibe ligações cruzadas e a fluorescência do colágeno da pele de ratos diabéticos, retardando também o desenvolvimento da nefropatia diabética ⁴⁶. Além disso, AG também demonstrou ser um potente inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) ⁴⁸.

A administração de aminoguanidina em ratos diabéticos reduz AGEs e limita alterações estruturais e funcionais nos tecidos ⁴⁵. Seu mecanismo de ação ainda é controverso. Originalmente, acreditava-se que reagisse com ceto-aminas, atualmente se sugere que reaja com os produtos da oxidação liberados, como a 3-deoxiglicosona ^{49, 50}.

1.3 INDOLAMINA 2,3- DIOXIGENASE (IDO)

A Indolamina 2,3-dioxigenase é uma heme proteína expressa intracelularmente de forma constitutiva ou induzida na placenta, pulmão, intestino delgado e grosso, cólon, baço, fígado, rim, estômago, e cérebro⁵¹. A IDO pode também ser induzida em células apresentadoras de antígenos (APC), células de linhagem mielóide (células dendríticas, monócitos, macrófagos, eosinófilos), células epiteliais, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais, e certas linhagens de células tumorais ^{11, 52-61}.

Dois genes homólogos intimamente ligados (IDO1, IDO2) localizados no cromossomo 8 em humanos e camundongos codificam a proteína IDO. Em mamíferos todos os genes de IDO estudados até hoje possuem um ou mais elementos de resposta ao interéferon (IFN) nas suas regiões promotoras ⁶²⁻⁶⁴.

A IDO inicia a degradação oxidativa do aminoácido essencial L-triptofano ao longo da via das quinureninas (metabólito produzido como resultado da degradação do triptofano para N-formilquinurenina), através da clivagem oxidativa do anel pirrólico do triptofano como demonstrado na figura 1^{65, 66}. Na via das quinureninas a IDO catalisa a oxidação do triptofano a N-formilquinurenina (NFK) que subsequêntemente é deformilada e transforma-se em L-quinurenina (QUIN). A partir deste último, uma série de compostos com potencial atividade biológica especialmente neurotóxica é formada como, por exemplo, 3-hidroxi-quinurenina e o ácido quinolínico ^{67, 68}. Estudos com anticorpos específicos para o ácido quinolínico mostram que as células do sistema imune são capazes de sintetizar e/ou estocar grandes quantidades deste metabólito ⁶⁹. A capacidade neurótóxica do ácido quinolínico *in vivo* está associada a algumas doenças neurodegenerativas e com o aparecimento de demência na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ⁷⁰.

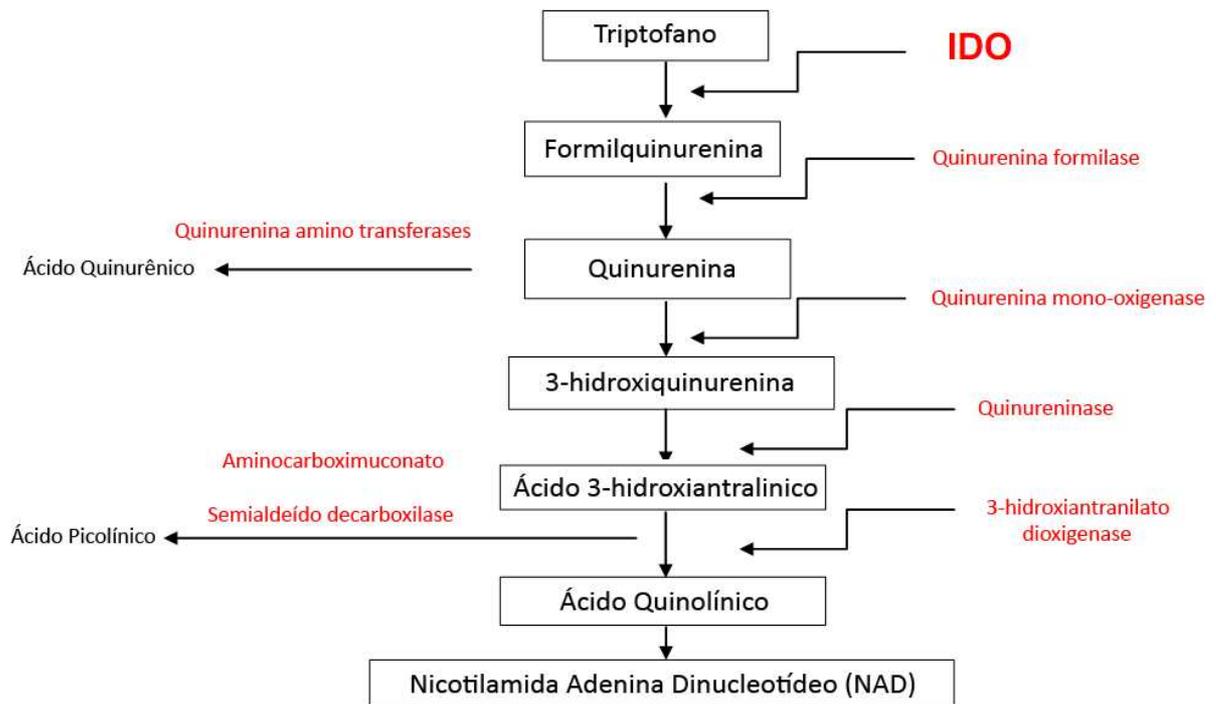


FIGURA 1 - Diagrama Esquemático da Via das Quinureninas
Fonte: Chen, Y. et al, 2009.

Sabe-se que a síntese desta enzima é fortemente induzida pela citocina pró-inflamatória IFN- γ *in vitro* e também *in vivo*. Outras citocinas (IFN- α , IL-1, TNF- α) e o lipopolissacarídeo de membrana bacteriana (LPS) também são capazes de induzir a expressão de IDO⁷¹⁻⁷⁵. Infecções celulares por agentes microbianos (por exemplo, alguns vírus e outros patógenos intracelulares) também podem induzir IDO em certos tipos celulares⁵⁷.

IDO foi originalmente reconhecida como um mecanismo de defesa do hospedeiro, por seu papel direto na resposta imune contra patógenos e agentes infecciosos já que o esgotamento celular de L-triptofano capacita o hospedeiro a inibir o crescimento de patógenos infecciosos *in vivo*. Estudos anteriores demonstraram que o efeito inibitório de IFN- γ no crescimento de patógenos intracelulares *in vitro*, tais como o *Toxoplasma gondii*, é parcialmente atribuído à depleção do triptofano utilizado para a síntese protéica do parasita, através da indução de IDO^{76, 77}. Adicionalmente, a depleção de triptofano via IDO é o mecanismo pelo qual o IFN- γ exerce seu efeito antiproliferativo *in vitro* nas células tumorais⁷⁸. A capacidade de IDO em privar células de um aminoácido essencial e promover a formação de quinureninas bioativas enfatiza sua função biológica de defesa imune inata e controle imune⁷⁸.

Entretanto, vários estudos têm sugerido um papel imunomodulador para a enzima, que pode contribuir para a indução de tolerância imunológica ⁷⁹. Munn e colegas, 1998, mostraram que IDO desempenha um papel essencial na proteção do embrião contra rejeição em modelo murino de gravidez alogênica. A inibição da atividade da IDO por seu inibidor farmacológico, 1-metil-triptofano (1MT), resultou na rejeição dos fetos mediada pelas células T ⁸⁰. Estes resultados não só propuseram uma função imunológica para IDO, mas também sugeriram um papel na geração de tolerância imunológica e regulação da resposta imune. Assim, células expressando IDO são capazes de suprimir respostas locais da célula T e promover tolerância imune sob várias condições fisiológicas e patofisiológicas de importância médica, inclusive doenças infecciosas, rejeição fetal, transplantes de órgãos, doenças neurológicas, distúrbios inflamatórios e auto-imunes e câncer ⁷¹. Esses resultados contradiziam a função original e amplamente aceita de que a IDO agiria como um mecanismo de defesa do hospedeiro. Essa dicotomia em relação à função da IDO tem atraído grande atenção para esta enzima.

Portanto, a IDO pareceu agir de uma forma dupla: 1) exercendo ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de microorganismos e estimulando a resposta imune. 2) envolvendo-se na ativação da regulação das respostas imunes e criação de tolerância imune ⁷⁹.

Autores de estudos anteriores propuseram interações da IDO com o sistema imune ⁸¹. Em seu modelo, IDO assumiu funções imunológicas estimulantes e reguladoras simultaneamente e de forma complementar. Em outras palavras, foi sugerido que o sistema imunológico, mediado pela IDO, primeiramente reagiria ao agente infeccioso a fim de inibir seu crescimento e progressão e mais tarde, numa segunda fase, o mecanismo de regulação imunológica seria ativado para proteger o hospedeiro de uma reação exacerbada induzida pelo sistema imune ⁸¹. Propõe-se tanto que a depleção de triptofano seja o principal mecanismo pelo qual a IDO exerce sua função reguladora, quanto que o real responsável seja o acúmulo de metabólitos do triptofano no microambiente ⁷⁹.

Várias teorias têm sido sugeridas para caracterizar o papel da IDO em condições normais e em doenças. A diminuição dos níveis de triptofano e aumento nas concentrações plasmáticas de quinurenina já foram descritas em pacientes com doenças cardiovasculares, renais e doenças neurodegenerativas ^{9, 10, 70}. Trabalhos anteriores demonstraram ainda que alguns dos fatores responsáveis pelo

aparecimento do diabetes são também responsáveis pelo aumento na síntese das quinureninas^{6-8, 42-44}.

Embora, o papel da IDO em doenças auto-imunes, incluindo DM1 não tenha sido ainda completamente descrito, evidências suportam a hipótese de que a IDO possa contribuir com um conjunto de mecanismos que atrasam a progressão dessas doenças restaurando a tolerância imune⁸². Estudos recentes têm demonstrado maiores sobrevivência em longo prazo e viabilidade de ilhotas singênicas expostas á fibroblastos expressando IDO em modelo animal diabético⁸³. E dados de outros estudos têm fornecido evidências encorajadoras para o tratamento do DM1 com IDO expressa por Células de Sertoli encapsuladas⁸⁴.

Demonstrou-se que durante o tratamento com inibidor de IDO, 1-metil-triptofano (1MT), a progressão do DM1 acelera⁸⁵. Também foi relatado que um defeito no catabolismo de triptofano diminui a tolerância imune em camundongos diabéticos não obesos (NOD)⁸⁶. Além disso, a expressão de IDO foi induzida quando ilhotas humanas foram tratadas com IFN- γ . Estes achados sugerem que IDO tem considerável potencial para a avaliação em novas estratégias terapêuticas para o DM.

A atividade da IDO é medida no soro através dos níveis de quinurenina em relação ao triptofano (T/QUIN) no soro ou tecidos. Vários relatos mencionaram notável aumento na taxa de sobrevida prevista em pacientes com câncer quando há uma elevada razão QUIN/T, ou seja, com alta degradação do triptofano e níveis elevados de quinureninas. Também se observa essa razão QUIN/T aumentada em pacientes com rejeição renal aguda, desde o primeiro dia após o transplante. Isto sugere que o papel antiinflamatório para a atividade de IDO supera sua capacidade de regulação das respostas de células T contra o transplante⁸⁷. Em conjunto, estes dados sugerem claramente que IDO e a sua atividade em diferentes tecidos podem ser correlacionados com as condições e os desfechos clínicos de certas doenças, como o DM1 e suas complicações.

2 OBJETIVOS

Conforme revisão de estudos anterior acima citada, propusemos os seguintes objetivos para este trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos produtos finais de glicação (AGEs) sobre parâmetros bioquímicos (glicêmico, lipídico e renal) e sobre a modulação da enzima Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) em ratos diabéticos induzido pela administração intraperitoneal de aloxano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos AGEs (através da sua inibição pela aminoguanidina), no perfil glicêmico, perfil lipídico e renal dos ratos diabéticos.
- Avaliar o efeito dos AGEs (através da sua inibição pela aminoguanidina), na atividade e expressão da enzima IDO de macrófagos peritoneais e homogenato de cérebro em ratos diabéticos.
- Avaliar o efeito da ativação celular por LPS na atividade e expressão da enzima IDO.

3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a realização das análises propostas foi seguido o seguinte protocolo experimental.

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com peso de 280 ± 50 g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno e receberam água e ração comercial *ad libitum*, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal, CEUA, UNIFAL-MG (processo nº 279/2010).

Os animais foram divididos nos grupos descritos a seguir:

- **Diabético Ativado (DA):** animais diabéticos ativados com LPS e não tratados com aminoguanidina. (n=8)
- **Diabético Não Ativado (DNA):** animais diabéticos não ativados com LPS e não tratados com aminoguanidina. (n=8)
- **Diabético + AG Ativado (DAAG):** animais diabéticos ativados com LPS e tratados com aminoguanidina. (n=8)
- **Diabético + AG Não Ativado (DNAAG):** animais diabéticos não ativados com LPS e tratados com aminoguanidina. (n=8)
- **Controle Ativado (CA):** animais não diabéticos ativados com LPS e não tratados com aminoguanidina. (n=8)
- **Controle Não Ativado (CNA):** animais não diabéticos não ativados com LPS e não tratados com aminoguanidina. (n=8)

3.2 INDUÇÃO DO DIABETES E TRATAMENTO PARA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE AGES

Para indução do diabetes, foi administrada a droga diabetogênica Aloxano em solução salina (pH 4,5) 2%, na dosagem de 150mg/kg, via intraperitoneal. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicosúria acima de 250 mg/dL. Para inibição da formação dos produtos de glicação foi administrada aos animais do grupo Diabético + AG uma solução de aminoguanidina na concentração de 0,1g/Kg em água por gavagem durante 50 dias. Os demais grupos (não tratado e controle) receberam gavagem somente de água por gavagem durante o mesmo período, a fim de serem submetidos ao mesmo estresse de manipulação.

3.3 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

A ativação e recrutamento dos macrófagos foi realizada pela administração intraperitoneal de Lipopolissacarídeo de Membrana (LPS - *E. coli*, Serotype 026:B6, Sigma®) em solução salina estéril, na dosagem de 500µg/Kg, 48 horas antes do sacrifício.

3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os animais foram anestesiados pela inalação de Éter Etílico. O sangue foi colhido por punção cardíaca, para realização do hemograma e obtenção de soro e plasma. Em seguida, submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia. Os macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem intraperitoneal com PBS estéril, após a obtenção do lavado, os rins e cérebro foram retirados para preparo dos homogenatos e análises histológicas.

3.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DA CAVIDADE INTRAPERITONEAL

Os animais foram sacrificados e tiveram a sua cavidade intraperitoneal lavada com 15 mL de PBS estéril. A suspensão de células mononucleares foi obtida por aspiração com seringa e agulha e colocada em tubo de polipropileno de fundo curvo. As células de todos os animais dos diferentes grupos experimentais foram contadas e mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

3.6 CONTAGEM DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

As células foram contadas em Câmara de *Neubauer*, foram utilizadas dezoito partes de líquido de Turk (ácido acético 3% e azul de metileno 1%) e uma parte da suspensão celular. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0.1%. Foi feita uma lâmina por animal, corada pelo método MGG modificado por Rosenfeld, para avaliação da morfologia celular.

3.7 DETERMINAÇÃO DA GLICOSÚRIA/GLICEMIA

A dosagem da glicosúria/glicemia foi realizada através do método colorimétrico pela utilização de kit comercial específico (Analisa®) e a leitura foi realizada em Bioplus® (Bio 2000). Foram coletadas amostras de urina dos animais uma vez por semana a partir da indução do diabetes para teste de glicosúria. A glicemia em jejum foi confirmada no soro dos animais logo após o sacrifício. Os animais que não apresentaram glicosúria/glicemia acima de 250 mg/dL, ou tiveram o quadro diabético revertido ao longo do experimento foram excluídos.

3.8 DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLICADA

A porcentagem da hemoglobina glicada foi avaliada por cromatografia de troca iônica por meio de kit comercial (HbA1c Analisa®) e leitura em espectrofotômetro conforme instruções do fabricante.

3.9 AVALIAÇÃO DOS AGES

Após dosagem de proteínas no soro (método do *Biureto* -kit para dosagem de Proteínas Totais, Analisa®) e no homeganato de rins (método de *Bradford*), os AGES foram quantificados pela medida da fluorescência conforme descrito por Zilin e colegas, 2001⁸⁸. As amostras de soro ou homogenato de rins (70µl) sofreram precipitação de proteínas e lipídeos pela adição de clorofórmio (330 µL) e ácido tricloroacético 0,15M/L (1,6ml) seguida de vigorosa agitação em vórtex e centrifugação a 12000g, 4°C por 15 minutos. O espectrofluorímetro foi ajustado nos comprimentos de onda de 350nm (excitação) e 440nm (emissão) com abertura de fenda de 5nm. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente em cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico utilizando-se apenas a fase aquosa. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária dividida pela concentração de proteínas (UA/mg proteína).

3.10 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As determinações de colesterol total e frações, triglicérides, uréia e creatinina, foram realizadas no soro obtido através de kits comerciais específicos para cada teste (Analisa®) em aparelho automatizado (*HumaStar 80*, *Human*®) conforme instruções do fabricante.

3.11 DOSAGEM DA PROTEÍNA C REATIVA ULTRA-SENSÍVEL

As análises da PCR-US foram realizadas por imunoturbidimetria no soro obtido através de Kit comercial específico (*Biotécnica*®) e a leitura foi realizada em Bioplus® (*Bio 2000*) conforme instruções do fabricante.

3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE IDO

Após obtenção e contagem dos macrófagos peritoneais, conforme descrito anteriormente, a atividade da enzima IDO foi avaliada através formação de quinureninas conforme ensaio descrito por Yamamoto e Hayaishi, 1967⁸⁹. Foi preparado um homogenato celular (por sonicação) e este foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm a 4°C. Montou-se reação contendo o sobrenadante do homogenato (volume correspondente a 5×10^6 células) em tampão fosfato pH 6,5 (50mM), o substrato triptofano (200 μ M), os ativadores da enzima: ascorbato (20mM) e azul de metileno (10 μ M) e catalase (100 μ g/mL) para a degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formado pela interação do ascorbato com azul de metileno. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C sob agitação. Logo após, a reação foi bloqueada pela adição de ácido tricloroacético 6% para precipitação das proteínas. Toda a NFK, primeiro produto da via das quinureninas, foi degradada à quinurenina através de um segundo banho de 15 minutos à 65°C. As amostras foram então centrifugadas a 13000g á 4°C por 15 minutos e filtradas em membrana de 0,22 μ m de poro. Reações “branco” foram montadas sem a presença da enzima (sem homogenato celular) para monitoramento de possíveis contaminações de quinurenina exógena.

A formação das quinureninas (N-formilquinurenina e quinurenina) foi monitorada por HPLC (*High-performance liquid chromatography*, modelo LC-20A-Prominence, com duplo pistão serial, degaseificador on-line, forno de coluna, auto-injetor, acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD)).

Foram Injetados 40 µL da amostra em coluna C18 e a análise foi acompanhada por 25 minutos em fluxo de fase móvel de 1 mL/min. Após a separação dos componentes da amostra, analisamos as substâncias pelos detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. A fase móvel foi composta por acetonitrila: água, em um método gradiente realizado pelas duas bombas.

Mantivemos 100% de água durante dois minutos de corrida. Aumentamos linearmente a concentração de acetonitrila atingindo 10% em 22 minutos. A partir desse tempo a concentração de ACN diminuiu linearmente à 0% até o 25º minuto. As absorbâncias foram monitoradas nos comprimentos de onda (λ) 280nm (triptofano), 325nm (*N*-formilquinurenina) e 365nm (quinurenina) simultaneamente. O limite de detecção (S/N = 3:1) foi de 244 nM e o limite de quantificação (S/N = 10:1) foi de 488 nM tanto para triptofano quanto para quinurenina. Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear na faixa analisada ($2,44 \times 10^{-4}$ – 1 mM).

O monitoramento das quinureninas por HPLC foi realizado no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (São Paulo-SP).

3.13 EXPRESSÃO DE IDO POR DOT BLOT

Amostras de proteínas dos macrófagos (100 µg) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose à vácuo por *Dot blot*. A membrana foi incubada por 2h em solução de leite em pó desnatado 5% a fim de bloquear sítios inespecíficos. Após boqueio, a membrana foi incubada em solução com anticorpo primário anti-IDO por 2h (Millipore®). As membranas foram novamente incubadas por 1h em solução contendo anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Anti-IgG, 1/16000, SIGMA®). Os *dot blots* foram revelados em solução de diaminobenzamida (DAB) e prontamente fotografados.

3.14 PREPARO DAS LÂMINAS SILANIZADAS

As lâminas foram lavadas com detergente neutro, mantidas em água corrente por 30 minutos e em água destilada por mais 30 minutos, foram então secas e então passaram por uma bateria de banhos:

- 1º) Água destilada : 15 segundos com 5 mergulhos
- 2º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 3º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 4º) Silano 4% em solução de acetona : 10 segundos
- 5º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 6º) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- 7º) Água destilada : 15 segundos.

Após a sequência de banhos as lâminas foram postas para secar em estufa (60°C) e armazenadas para o uso.

3.15 EXPRESSÃO DE IDO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A fim de avaliar a presença e localização da enzima IDO foram realizados ensaios de microscopia confocal.

As células foram coletadas em PBS, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e uma gota (20 µL) foi aplicada sobre cada lâmina silanizada. A lâmina foi mantida em câmara úmida por 45 minutos para adesão e logo após incubada com o fixador paraformaldeído comercial 4% por mais 45 minutos.

As lâminas foram então lavadas com PBS e em seguida incubadas com cloreto de amônio 50 mM em PBS por 30 minutos para torná-las permeáveis. Passado esse período as células foram bloqueadas com PGN por 40 minutos e com PGN/saponina por 45 minutos. Em seguida incubamos as lâminas com o anticorpo anti-IDO (1:100) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavamos e incubamos as lâminas com conjugado fluorescente (anti-IgG de cabra acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC)) (1:100) e DAPI para corar o DNA do núcleo das células durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, montamos as lâminas em lamínulas

contendo glicerol tamponado com pH alcalino e 0,1% de parafenileno-diamino (PPD), um inibidor do decaimento de fluorescência.

Visualizamos a fluorescência em microscopia confocal, com laser de UV (363 nm) e visível (488, 567 e 657 nm), acoplado a um computador contendo sistema de captura de imagens *Digital Sight, NIS-Element BR*®.

3.16 EXPRESSÃO DE IDO POR IMUNOCITOQUÍMICA

As células foram coletadas em tampão fosfato, centrifugadas e uma gota deixada sobre cada lâmina silanizada por 30 minutos para aderência, em câmara úmida. Posteriormente foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos.

As células aderidas foram incubadas com cloreto de amônio 50 mM em PBS por 30 minutos, com isso retirou-se os grupos aldeídos que são fluorescentes naturais. A seguir os epítomos inespecíficos foram bloqueados e as células permeabilizadas com PGN/saponina por 45 minutos, em seguida incubadas com anticorpo policlonal anti-IDO por 1 hora à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas e incubadas com anticorpo conjugado a peroxidase (goat anti-mouse IgG 1:100 espécie específico acoplado a peroxidase), foram lavadas novamente em PBS e incubadas com diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos. Em seguida realizou-se a desidratação, contracoloração dos núcleos com hematoxilina e diafanização com xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas e *Entelan*® e a imunocitoquímica pode ser visualizada por microscopia de luz em microscópio *Zeiss Axiophot*® acoplado a um computador contendo sistema de captura de imagens *Digital Sight, NIS-Element BR*®.

3.17 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS RINS

Após sacrifício retirou-se os rins dos animais, estes foram lavados em solução fisiológica, abertos longitudinalmente com bisturi e imediatamente fixados em paraformaldeído comercial 4%. O material foi aparado para isolar a área de

interesse, região medular, e mantido no fixador por 24 horas. Passado o período de fixação, o material foi desidratado em série crescente de concentrações de álcool (70, 80, 90, 95, 100%) e diafanizado (álcool-xilol 1:1, xilol) para inclusão em parafina histológica.

Foram realizados cortes de 7 μ m em micrótomo *Leica*®, os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e corados pelo método Hematoxilina-Eosina, conforme rotina do Laboratório de Histologia e Biologia Celular da UNIFAL-MG.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico acoplado a um computador pelo sistema de captura de imagens *Digital Sight, NIS-Element BR*®.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, de no mínimo três experimentos independentes feitos em duplicata. As análises foram realizadas através de comparações entre os grupo controle, diabético e diabético submetido à tratamento com AG. Os dados foram analisados por meio de testes no programa estatístico *Graph Pad Instat*® (1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a formação de AGEs no modelo experimental de diabetes induzido por aloxano e a influência destes produtos de glicação sobre alguns parâmetros bioquímicos e sobre a modulação da enzima IDO.

Para tanto, tratamos ratos Wistar pela via intraperitoneal com 150mg/kg de aloxano. Após a confirmação do DM, iniciou-se o tratamento com aminoguanidina (AG) ou água por gavagem por 50 dias. Os animais foram divididos nos grupos diabético, diabético tratado com AG e controle. Os grupos foram ativados ou não por LPS.

Para caracterizar nosso modelo experimental, avaliamos alguns parâmetros, entre eles o peso desses animais no início do experimento e no momento de sacrifício.

4.1 PESO

Como podemos observar no GRAF 1 houve um ganho de cerca de 120g nos animais animais do grupo controle, ao contrário dos grupos de ratos diabéticos tratados ou não com aminoguanidina ao longo do período experimental, que mantiveram peso similar ao que possuíam no início do experimento. A diferença no peso dos animais controle em relação aos diabéticos tratados ou não com aminoguanidina foi significativa ($p \leq 0,001$). Este resultado mostrou-se condizente a um dos quatro sintomas marcantes causados pela hiperglicemia que incluem: perda de peso, poliúria, polidipsia e polifagia⁹⁰.

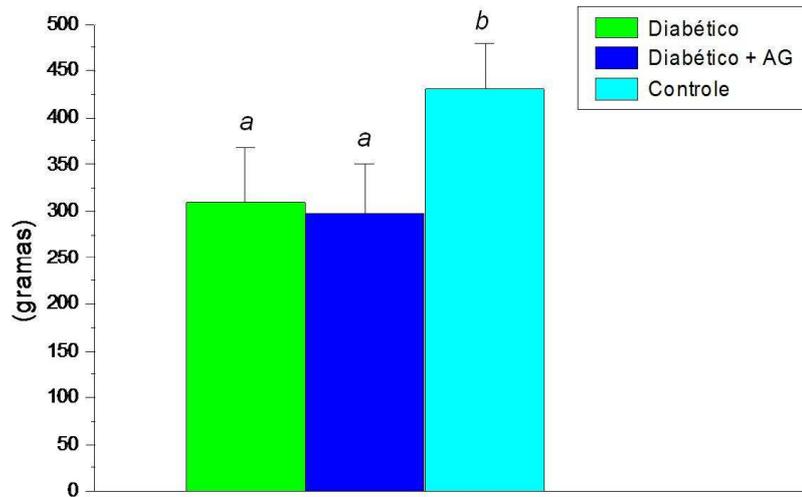


GRÁFICO 1 - Efeito do estado diabético no peso dos animais dos grupos diabético não tratado (n=35), diabético tratado com AG (n=31) e controle (n=13), ao final do experimento. Todos os animais iniciaram o experimento pesando 250 ± 50 g. Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor.

4.2 ATIVAÇÃO DOS MACRÓFAGOS

Após o tratamento com a AG, os animais dos grupos ativados foram sacrificados 48 horas após a injeção de LPS ($500 \mu\text{g}/\text{Kg}$ em solução salina) e as células do peritônio foram colhidas e o número total e diferencial das células foi determinado.

TABELA 1 - Efeito do estado diabético e do tratamento com aminoguanidina sobre o influxo celular ao peritônio em animais injetados ou não com LPS.

Macrófagos Peritoneais	
DNA	$2,20 \pm 0,42$
DNAAG	$1,50 \pm 0,56$
CNA	$1,74 \pm 0,23$
DA	$3,76 \pm 0,73$
DAAG	$3,30 \pm 0,41$
CA	$4,17 \pm 0,8$
n° de células $\times 10^6/\text{ml}$	

ns: não significativo (comparação entre DNA, DNAAG e CNA); * (comparação entre DNA e CA); *** (comparação entre DNA e CA).

Fonte: Do autor

Grupo diabético não ativado (DNA, n=8), diabético não ativado tratado com AG (DNAAG, n=8), controle não ativado (CNA, n=8), diabético ativado (DA, n=8), diabético ativado tratado com AG (DAAG, n=8) e controle ativado (CA, n=8). ns: diferença não-significativa; *($p \leq 0,05$); ***($p \leq 0,001$). Teste estatístico de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

A cavidade peritoneal abriga uma variedade de células do sistema imune sendo uma excelente fonte de fagócitos mononucleares, representadas principalmente por macrófagos e um subtipo de linfócito (linfócitos B-1)⁹¹⁻⁹³. Está ainda presente linfócitos T e linfócitos natural killer (NK) nessa cavidade⁹⁴.

Em todos os grupos estudados, a contagem diferencial mostra que a maioria das células obtidas são macrófagos.

Como podemos observar na tabela 1, há um aumento significativo do número total de células no peritônio dos animais injetados com LPS em relação aos grupos não ativados. Observamos que a ativação por LPS não foi capaz promover um aumento significativo na migração de células para o peritônio nos animais diabéticos (DNA e DA). Entre os animais diabéticos tratados com AG (DNAAG e DAAG) ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na migração celular quando houve ativação por LPS. Entre os animais controle (CNA e CA) notamos um aumento ainda mais evidente na migração de células quando o animal foi ativado pelo LPS ($p < 0,001$).

Esses dados demonstram que o recrutamento dos macrófagos pela injeção intraperitoneal de LPS foi mais efetivo nos animais controles e animais diabéticos tratados com AG do que nos animais diabéticos não tratados com AG. Esses dados corroboram com estudos anteriores, que demonstraram menor responsividade e menores taxas fagocíticas em pacientes acometidos pelo DM^{18, 19}, e nos levam a crer que o tratamento para inibição da glicação com a AG auxilia numa melhora da resposta imune inata no estado diabético.

4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÊMICO

Neste trabalho utilizamos o aloxano para induzir o DM. . A ação tóxica do aloxano sobre as células β do pâncreas envolve diferentes processos, como a

oxidação de grupamentos-SH, inibição da glicoquinase, geração de radicais livres e distúrbios na homeostase intracelular de cálcio. O aloxano produz necrose específica das células β nas ilhotas pancreáticas e induz a liberação maciça de insulina com posterior supressão das ilhotas de Langerhans ao responder a um estímulo externo da glicose. Os ratos diabéticos induzidos com aloxano apresentam sintomas idênticos aos pacientes diabéticos, pois os animais desenvolvem danos no sistema ocular, renal, cardíaco, vascular e nervoso, constituindo assim um importante modelo para o estudo de complicações agudas e crônicas do DM ⁹⁵. A fim de confirmar o estado diabético nos animais, avaliamos a glicosúria e a glicemia através do método colorimétrico.

4.3.1 Glicosúria/Glicemia dos Animais

A dosagem da glicosúria foi realizada sete dias após indução do diabetes e acompanhada semanalmente a fim de excluir animais com possível reversão do estado diabético ao longo dos dois meses de experimento. A glicemia dos animais foi confirmada no momento do sacrifício.

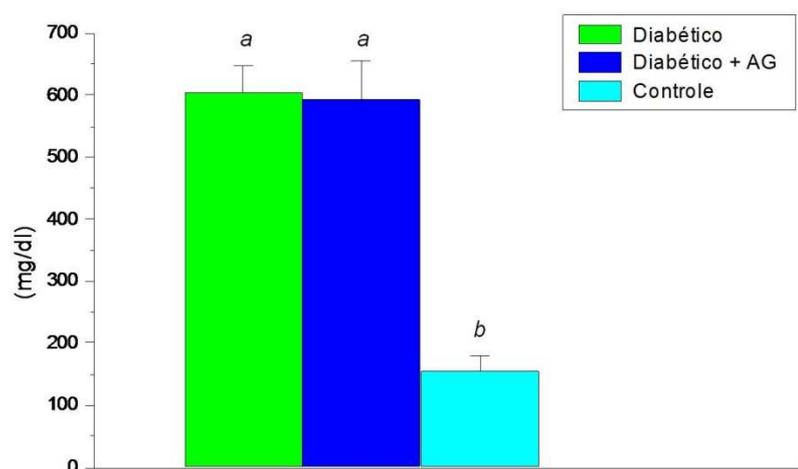


GRÁFICO 2 - Avaliação da glicemia dos animais dos grupos diabético sem tratamento (n=29), diabético tratado com AG (n=23) e controle (n=14) no momento do sacrifício. Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Quando analisada a concentração de glicose sanguínea, verificou-se um aumento significativo no grupo diabético quando comparado ao grupo controle, mostrando que a indução do diabetes pelo aloxano foi efetiva.

A aminoguanidina previne a formação dos AGEs porque contém hidrazina em sua estrutura química, a qual reage com os seguintes compostos: glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona e inibe a formação de carboximetilisina e carboxietilisina .

Nossos resultados demonstram que não houve redução da hiperglicemia após o tratamento com aminoguanidina. Entretanto observamos uma redução da glicação das proteínas avaliadas, a hemoglobina e frutossamina.

4.3.2 Hemoglobina Glicada

A formação da HbA_{1c} ocorre de forma irreversível e progressiva no eritrócito e é proporcional aos níveis glicêmicos encontrados no sangue, sendo que os valores anormais levam de 4 a 6 semanas para normalizarem-se. Por essa propriedade, a determinação da HbA_{1c} para avaliação da glicemia dos diabéticos é de grande utilidade porque avalia o real quadro glicêmico das últimas 4 a 6 semanas

A concentração de hemoglobina glicada (Hb A_{1c}) foi avaliada por cromatografia de troca iônica. Os resultados apresentam-se em porcentagem da HbA_{1c} em relação à hemoglobina total como mostrado no gráfico abaixo.

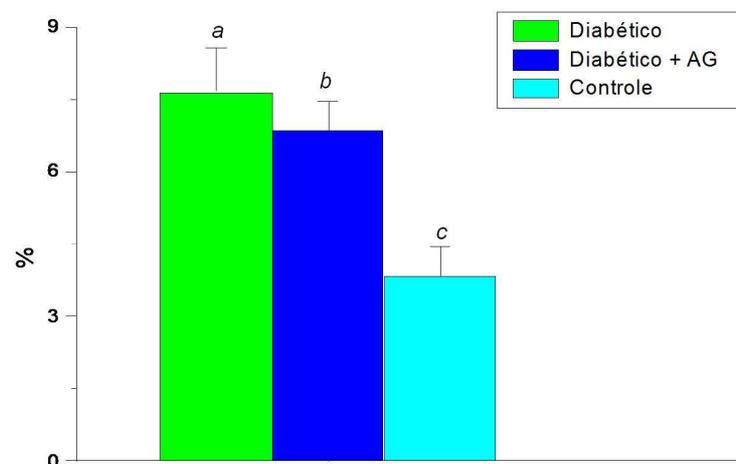


GRÁFICO 3 - Porcentagem da Hemoglobina Glicada em relação à Hemoglobina Total nos animais diabéticos sem tratamento (n=11), diabéticos tratados com AG (n=11) e controles

(n=13). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Valores de Referência:

Não Diabéticos: 4,4 a 6,7%

Diabéticos com Bom Controle: 6,7 a 7,3%

Diabéticos com Controle Regular: 7,3 a 9,1%

Diabéticos com Controle Ruim: acima de 9,1%

Pode-se observar no GRAF 3 que houve diferenças significativas entre os três grupos experimentais na porcentagens de hemoglobina glicada. Entre o grupo diabético sem tratamento e diabético tratado com AG o valor de p foi inferior a 0,05, e entre os animais controles e ambos os grupos diabéticos (tratados e não tratados com AG) o valor de p foi inferior a 0,001. Nota-se ainda que os valores de HbA_{1c} nos animais diabéticos sem tratamento se mostraram superiores ao valor de referência considerando controlado (7,3 – 9,1%), já os animais tratados com AG apresentaram valores normais ou próximos aos considerados saudáveis (6,7 – 7,3%), bem como os animais controles, não diabéticos (4,4 – 6,7%).

4.3.3 *Frutosamina*

A frutosamina refere-se ao valor médio da glicose sanguínea nas últimas 4 a 6 semanas. É o nome genérico dado á todas as proteínas séricas glicosiladas (principalmente a albumina). Seus valores normalmente são inferiores aos encontrados na análise da hemoglobina glicada.

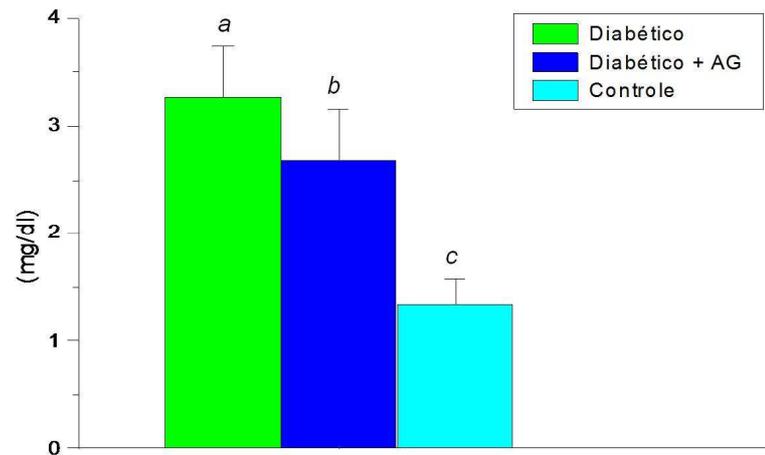


GRÁFICO 4 - Avaliação da Frutosamina nos animais dos grupos diabéticos sem tratamento (n=17), diabéticos tratados com AG (n=23) e controles (n=19). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Observa-se no gráfico 4 que o tratamento inibiu a formação das frutosaminas quando comparamos o grupo diabético tratado com AG com o grupo não submetido à tratamento ($p \leq 0,001$), e quando comparamos ambos os grupos diabéticos com o grupo controle ($p \leq 0,001$).

4.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO/INIBIÇÃO DE AGES

Há entre os AGEs compostos naturalmente fluorescentes, como por exemplo a pentosidina⁹⁶. Essa fluorescência de AGEs foi avaliada no soro e homogenato de rins através conforme descrito previamente na seção 3.9.

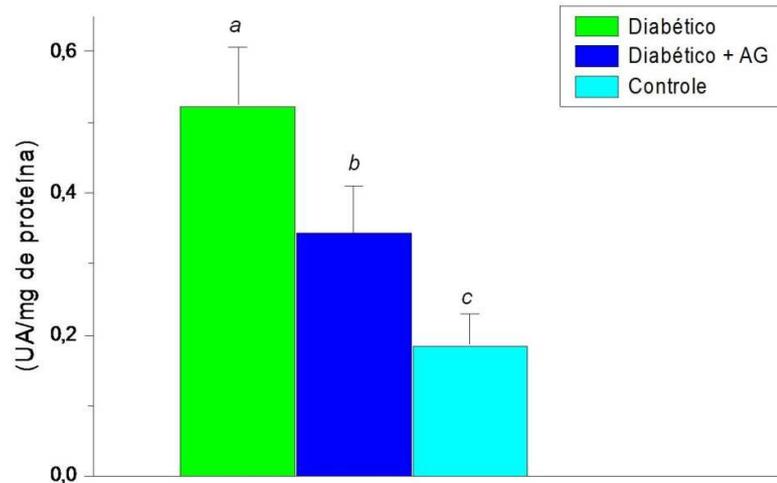


GRÁFICO 5 - Fluorescência de AGEs no Soro dos animais diabéticos sem tratamento (n=10), diabéticos tratados com AG (n=8) e controles (n=8). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Como se pode observar no GRAF 5 houve diferença significativa nos níveis de fluorescência entre os três grupos experimentais ($p \leq 0,001$), sendo que os animais diabéticos não tratados apresentaram os maiores índices de fluorescência, indicando maior concentração de AGEs. O tratamento com AG inibiu a glicação de proteínas no soro, dado esse que condiz com a análise da frutossamina apresentada anteriormente no GRAF 4. Observa-se também diferença entre o grupo diabético não submetido ao tratamento com AG e o grupo controle, não diabético ($p \leq 0,001$). Não houve, entretanto, diferenças significativas entre os grupos diabético tratado com AG e grupo controle, indicando que em animais tratados com AG os níveis de AGEs se assemelham aos níveis em animais saudáveis, comprovando a eficácia do tratamento com AG na prevenção da formação dos AGEs.

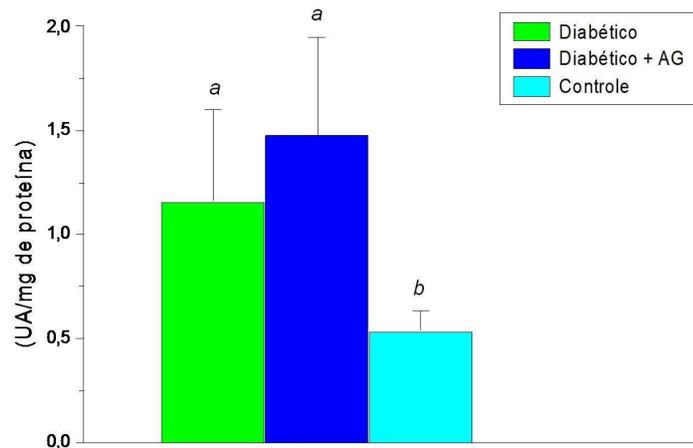


GRÁFICO 6 - Fluorescência de AGEs no Homogenato de rins dos animais diabéticos sem tratamento (n=8), diabéticos tratados com AG (n=9) e controles (n=14). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

A análise espectrofluorimétrica do homogenato de rins demonstrada no gráfico 6 não revelou diferenças significativas de fluorescência entre os animais diabéticos tratados com AG e não tratados. Comparando-se os grupos diabéticos sem tratamento com os controles nota-se que houve diferenças entre diabéticos e controles com valor de significância menor ($p \leq 0,01$), e diferenças entre diabéticos tratados com AG e controles com significância maior ($p \leq 0,001$). Esses dados contrariam a análise espectrofluorimétrica realizada no soro (gráfico 5), que pode ter ocorrido devido as propriedades nefrotóxicas da AG. Os compostos fluorescentes observados neste ensaio poderiam surgir de um processo inflamatório nos rins agravado pela AG.

Dados de literatura indicam que ratos diabéticos quando tratados com inibidores da formação de produtos finais da glicação avançada apresentam correção de disfunções ao nível de células endoteliais e redução do infiltrado celular inflamatório, implicando, assim, a via da glicação não enzimática como importante no que tange às complicações diabéticas.

4.5 AVALIAÇÃO DO DANO RENAL

A lesão renal é uma complicação crônica microvascular muito freqüente em pacientes diabéticos e em modelos animais com diabetes induzido por drogas^{97 e 98}. Estes danos têm sido associados à glicemia e concentrações de hemoglobina glicada (Hb A1C) elevadas⁹⁹. A história natural da lesão renal induzida pelo diabetes tem sido vista como uma via que segue para uma situação clínica relativamente freqüente denominada nefropatia diabética, passa por estágios intermediários e termina na insuficiência renal crônica. Ao contrário de outras doenças renais, a incidência da nefropatia diabética, como causa de insuficiência renal crônica, está em ascensão. Portanto, a detecção precoce é de grande importância para o estabelecimento de medidas preventivas com vista à melhoria da qualidade de vida e redução da mortalidade por insuficiência renal crônica em pacientes diabéticos⁹⁸.

A glicação de proteínas tem sido apontada como um dos principais mecanismos responsáveis pelas lesões glomerulares observadas na nefropatia diabética¹⁰⁰. Sendo assim, os AGEs são considerados moléculas de especial interesse para os nefrologistas, uma vez que podem ter um papel etiológico de complicações vasculares e renais associadas com o diabetes e envelhecimento¹⁰¹. Por essa razão investigamos o efeito do DM e dos AGEs nos rins.

4.5.1 Uréia e Creatinina

Sabe-se que em casos de lesão renal os níveis de uréia apresentam-se prontamente elevados, e que os níveis de creatinina elevam-se de forma progressiva ao dano mais lentamente do que ocorre com a uréia. As determinações da uréia e creatinina foram feitas no soro obtido e congelado no sacrifício através de método colorimétrico.

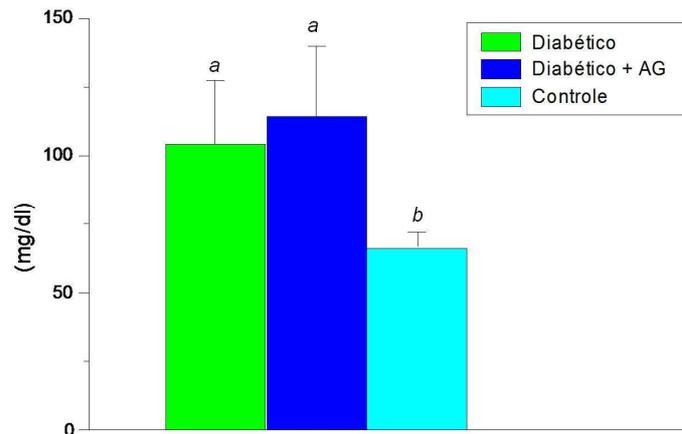


GRÁFICO 7 - Uréia dos animais diabéticos sem tratamento (n=28), diabéticos tratados com AG (n=31) e controles (n=18). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

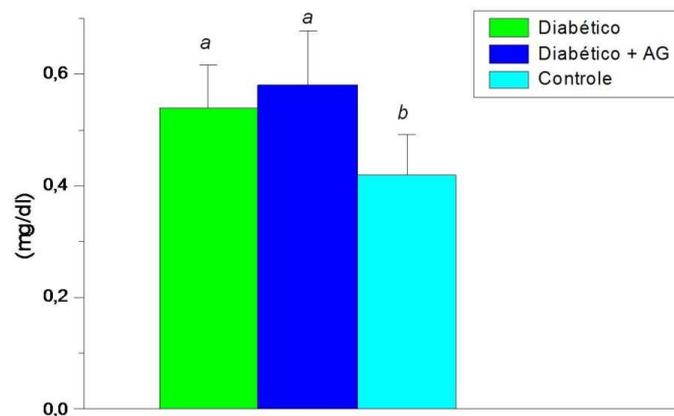


GRÁFICO 8 - Creatinina dos animais diabéticos sem tratamento (n=25), diabéticos tratados com AG (n=24) e controles (n=18). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Pode-se observar no GRAF 7 e GRAF 8 que houve diferença significativa entre os níveis de uréia e creatinina presentes no soro dos animais controles se comparados aos animais diabéticos, sendo que os animais controle apresentaram níveis de uréia e de creatinina estatisticamente diferentes e menores quando comparados a ambos os grupos diabéticos, submetidos ou não ao tratamento com AG ($p \leq 0,001$). Não houve, entretanto diferenças significativas entre os grupos diabéticos tratados e não tratados com AG. Conforme o esperado, os valores dos níveis de creatinina são condizentes aos encontrados na análise da uréia.

4.5.2 Análise Histológica dos Rins

A fim de avaliar a natureza e a magnitude do dano causado pelo estado diabético, foram confeccionadas lâminas análise histológica por microscopia óptica, conforme protocolo descrito anteriormente na seção 3.17.

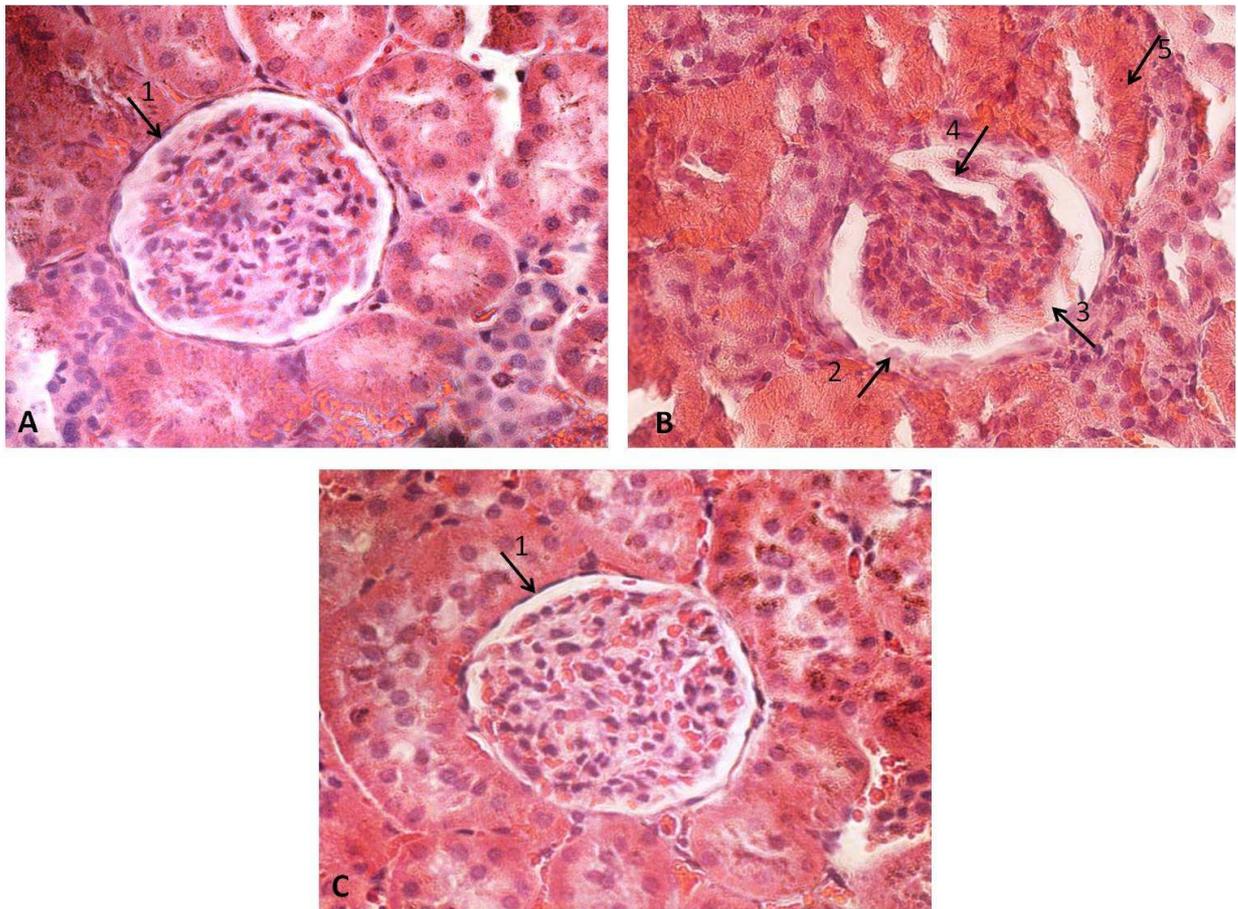


FIGURA 2 - Corte histológico da zona medular renal dos animais experimentais, em aumento de 40x, corados por Hematoxilina-Eosina. Glomérulos representativos de 10 campos por lâmina de cada animal.

- A) Glomérulo de animal diabético tratado com aminoguanidina;
- B) Glomérulo de animal diabético não submetido ao tratamento com aminoguanidina;
- C) Glomérulo de animal não diabético (controle).

Fonte: Do autor

O sistema renal é formado por um conjunto de estruturas histológicas imprescindível nos mecanismos de filtrações glomerular e tubular. O glomérulo renal é constituído primordialmente por uma rede de capilares fenestrados, sem diafragma, oriundos da arteríola aferente e pela cápsula de *Bowman* contendo dois

folhetos, visceral e parietal. Este último é formado por células epiteliais planas que limitam o espaço capsular onde se acumula o filtrado glomerular.

Aqui, nos animais diabéticos não submetidos ao tratamento (FIG 2B) observamos o espessamento do espaço de *Bowman*, com alteração na morfologia celular nesta região. Normalmente a cápsula de *Bowman* é revestida por uma camada simples de células pavimentosas (seta 1, FIG 2A e 2C), porém, nos animais diabéticos não submetidos ao tratamento foi observada a presença de mais de uma camada celular (seta 2, FIG 2B). Foi observada também, nos animais diabéticos não tratados, a presença de material amorfo no espaço de *Bowman*, que geralmente é preenchido apenas por ultrafiltrado de plasma (seta 3, FIG 2B).

Além disso, ocorreu acentuação da lobulação glomerular (aspecto de folhas de trevo) nos animais diabéticos sem tratamento, indicada pela seta 4 na figura 2B. Este aumento da lobulação é um indicativo da ocorrência de glomerulonefrite de classe 1 segundo a classificação de *Banff*^{102 e 103}. Notou-se também um aumento no tamanho dos túbulos renais mais proximais (seta 5, FIG 2B).

Estes resultados corroboram com dados da literatura que relatam a predominância de lesões secundárias ao diabetes mellitus nos glomérulos, embora os túbulos e interstício renal possam também ser acometidos⁹⁸.

Apesar de propriedades nefrotóxicas já terem sido atribuídas para a aminoguanidina, no período de tratamento (50 dias) e na dose administrada (100mg/Kg/dia) em nosso modelo experimental não observamos alterações estruturais no grupo diabético tratado com AG quando comparados ao grupo controle. Estes resultados estão condizentes com trabalhos que mostram que a administração de aminoguanidina em ratos diabéticos reduz AGEs e limita alterações estruturais e funcionais nos tecidos⁴⁵. Foi descrito ainda que a AG inibe ligações cruzadas e a fluorescência do colágeno da pele de ratos diabéticos, retardando também o desenvolvimento da nefropatia diabética⁴⁶. Neste sentido, também foi demonstrado que a aminoguanidina teve um efeito protetor contra necrose do túbulo proximal, edema intracelular, redução da cápsula de *Bowman* e diminuição da filtração glomerular¹⁰⁴.

4.6 AVALIAÇÃO DO RISCO CARDÍACO

Sabe-se que as doenças cardiovasculares constituem uma das principais causas de morte entre pacientes portadores de diabetes mellitus. Dados da literatura demonstram uma alta prevalência de dislipidemia entre pacientes diabéticos, com freqüente associação entre os níveis glicêmicos elevados e alterações no perfil lipídico. Além das alterações nas vias metabólicas em decorrência da hiperglicemia, estudos realizados em diferentes modelos experimentais têm demonstrado que os AGEs também podem contribuir significativamente para não somente para o desenvolvimento de dislipidemia como também para a ocorrência de doenças cardiovasculares. Sendo assim, a avaliação do perfil lipídico em pacientes diabéticos tem sido recomendada entre os diversos exames laboratoriais para avaliação do controle do diabetes mellitus, com vista à redução da morbidade e mortalidade em decorrência da aterosclerose ¹⁰⁵.

No presente estudo, o perfil lipídico no soro dos animais diabéticos e diabéticos tratados com aminoguanidina foi comparado com aquele observado no soro de animais não diabéticos.

4.6.1 *Colesterol Total e Lipoproteínas*

Os animais diabéticos apresentaram níveis séricos de colesterol total e colesterol HDL significativamente maiores que os animais pertencentes ao grupo controle. O tratamento com aminoguanidina não foi capaz de prevenir este aumento (GRAF 9 e GRAF 10). Neste trabalho foi avaliada também a concentração de colesterol não HDL, um parâmetro importante para a estratificação do risco cardiovascular, uma vez que fornece uma estimativa da concentração de lipoproteínas aterogênicas no soro ¹⁰⁵. Não houve diferença significativa na concentração de colesterol não HDL entre os diferentes grupos analisados (GRAF 11).

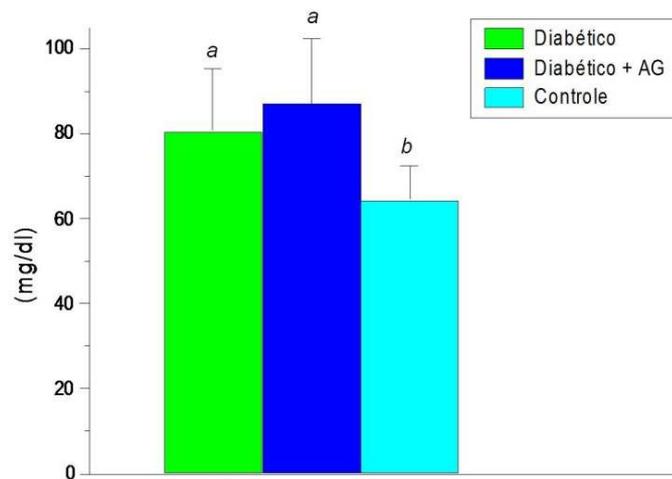


GRÁFICO 9 - Colesterol Total dos animais diabéticos sem tratamento (n=18), diabéticos tratados com AG (n=17) e controles (n=18). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa. Análise estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

4.6.2 Colesterol HDL

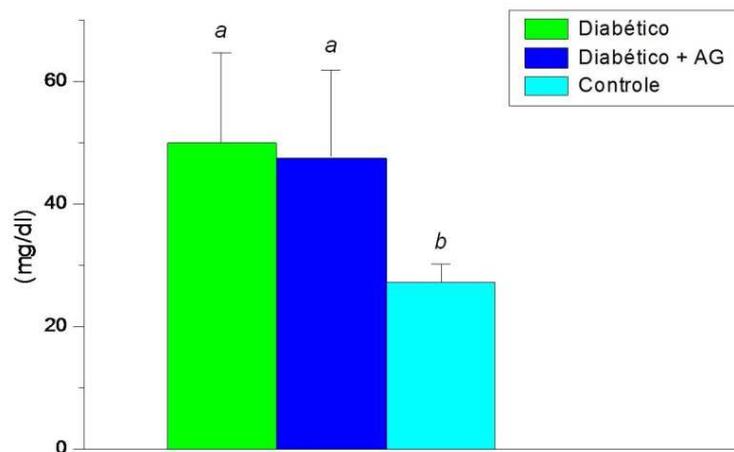


GRÁFICO 10 - HDL dos animais diabéticos sem tratamento (n=18), diabéticos tratados com AG (n=17) e controles (n=18). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa. Análise estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

4.6.3 Colesterol Não-HDL

A hipercolesterolemia em decorrência do diabetes tipo 2 tem sido associada ao aumento na concentração de lipoproteínas aterogênicas tais como, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e/ou lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Entretanto, no diabetes tipo 1, tem sido observado um aumento na concentração sérica de lipoproteína de alta densidade (HDL), que pode estar associado a concentrações elevadas ou normais das demais lipoproteínas ¹⁰⁶. Apesar dos níveis aumentados de HDL, não há redução do risco cardíaco nestes indivíduos. É importante considerar que alterações no tamanho, na composição e na estrutura das HDL podem comprometer a funcionalidade e interferir com suas propriedades antiaterogênicas ¹⁰⁷.

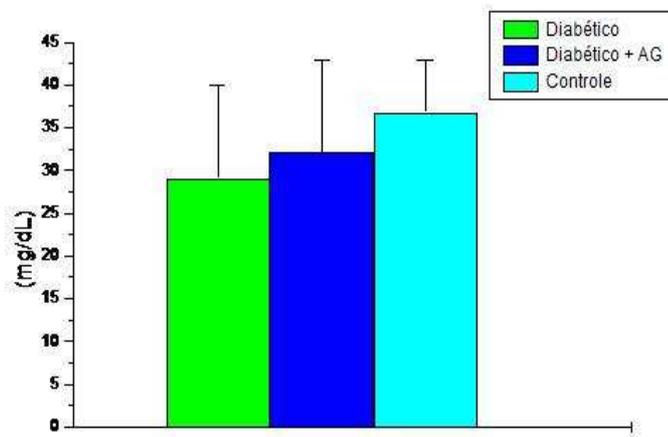


GRÁFICO 11 - Colesterol Não-HDL dos animais diabéticos sem tratamento (n=19), diabéticos tratados com AG (n=22) e controles (n=9). Análise estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

4.6.4 Triglicérides

No GRAF 12 nota-se que os níveis séricos de triglicérides aumentaram nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle, porém não houve diferença significativa entre os animais diabéticos tratados e não tratados com AG.

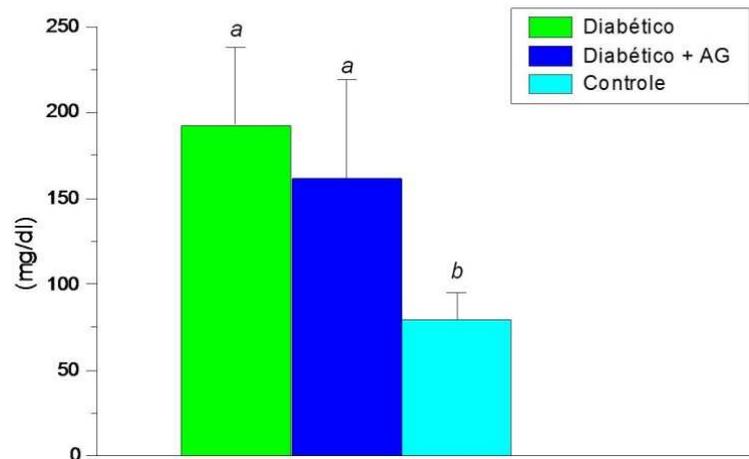


GRÁFICO 12 - Triglicérides dos animais diabéticos sem tratamento (n=18), diabéticos tratados com AG (n=17) e controles (n=18). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatisticamente significativa. Análise estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

A hipertrigliceridemia observada nos animais diabéticos pode ser atribuída não somente à hiperglicemia, que favorece o aumento na síntese de triglicérides, como também à falta de insulina, que interfere negativamente na ação da lipase lipoprotéica, levando a uma diminuição do catabolismo deste lipídeo.

Os resultados observados estão de acordo com dados da literatura e poderiam ser atribuídos ao fato de termos utilizado aloxano para indução do diabetes. Desta forma o modelo experimental adotado em nosso estudo poderia ser comparado ao diabetes tipo 1, já que o aloxano destrói as células β -pancreáticas

108

4.6.5 Avaliação da PCR-US

A Proteína C reativa ultra-sensível é um marcador de atividade inflamatória. Estudos têm demonstrado a presença da PCR ultra-sensível nos tecidos inflamados, nas artérias com aterosclerose (com placas de gordura ou ateromas em sua parede) e no músculo cardíaco (miocárdio) infartado. A PCR ultra-sensível também desempenha papel que favorece a coagulação do sangue.

As diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) sobre as dislipidemias consideram a PCR ultra-sensível elevada como um fator agravante de risco cardiovascular ¹⁰⁵.

Como se pode observar no gráfico 13 não houve diferenças significativas nos níveis de Proteína C Reativa (ultra-sensível) entre os grupos no nosso modelo experimental.

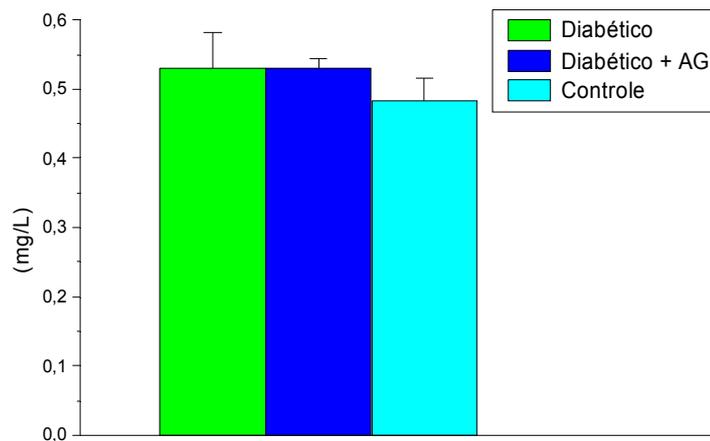


GRÁFICO 13 - Avaliação da Proteína C Reativa Ultra Sensível nos animais diabéticos sem tratamento (n=8), diabéticos tratados com AG (n=8) e controles (n=8). Análise realizada pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Ao contrário do esperado, não observamos diferença nos níveis de Proteína C Reativa (ultra-sensível), provavelmente o intervalo de tempo (cerca de 2 meses) utilizado neste trabalho foi insuficiente para promover a elevação desta proteína.

4.7 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA ENZIMA IDO

Já foi descrito anteriormente que nas doenças cardiovasculares, uma das principais complicações do diabetes, pode ocorrer um aumento das quinureninas, refletindo na atividade de IDO. Neste trabalho avaliamos a influência dos AGEs sobre a modulação da enzima IDO no estado diabético.

4.7.1 Avaliação da atividade de IDO

Como já mencionado a Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) é encontrada principalmente em células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas. Desta forma avaliamos a atividade da IDO em macrófagos peritoneais. A fim de testar a reação montada para avaliar a atividade de IDO realizamos um ensaio contendo IDO recombinante e IDO recombinante inibida por 1-Metil-triptofano (1MT) e todos os substratos necessários, conforme descrito na seção 3.12. Observamos que a reação funcionava pela grande produção de quinureninas geradas quando utilizamos IDO recombinante em substituição às amostras. Na reação montada com a enzima IDO recombinante, substratos e o inibidor da IDO (1MT) observamos menores taxas de produção de quinureninas (IDO rec. + 1MT).

- Macrófagos

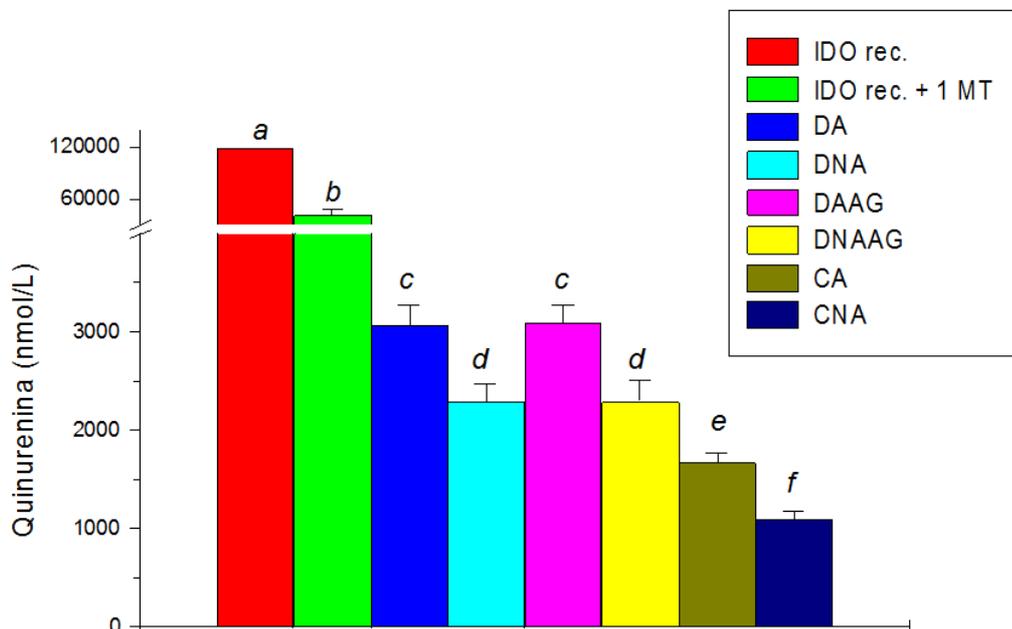


GRÁFICO 14 - Atividade de IDO recombinante (IDO rec.), IDO recombinante inibida por 1-Metil-Triptofano (IDO rec. + 1 MT), e IDO dos macrófagos peritoneais dos animais dos grupos diabético ativado (DA, n=8), diabético não ativado (DNA, n=8), diabético ativado tratado com AG (DAAG, n=8), diabético não ativado tratado com AG (DNAAG, n=8), controle ativado (CA, n=8) e controle não ativado (CNA, n=8), avaliada pela presença de quinureninas em HPLC, comparada à atividade de IDO recombinante e IDO recombinante inibida por Metil Triptofano (MT). Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

Podemos observar no GRAF 14 que houve uma maior produção de quinureninas nos macrófagos peritoneais dos animais diabéticos, tratados ou não com AG, indicando a maior atividade de IDO nos diabéticos se comparados aos animais controle. Estes dados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram um aumento no catabolismo de triptofano e aumento nas concentrações plasmáticas de quinureninas nas doenças cardiovasculares ⁷⁰.

Nota-se também que nos animais que tiveram as células peritoneais previamente ativadas por LPS a atividade de IDO foi maior em todos os grupos. Isso ocorre devido ao papel indutor de IDO exercido pelo LPS ⁷¹⁻⁷⁵.

Além dos macrófagos, a IDO está presente em grandes quantidades também no cérebro ⁵¹. Por essa razão monitoramos a formação das quinureninas no homogenato de cérebro dos animais diabéticos tratados ou não com o inibidor da formação dos AGEs, a aminoguanidina, e nos animais controles.

O gráfico 15 mostra que houve uma produção maior de quinureninas nos animais diabéticos, submetidos ou não ao tratamento com AG, se comparados aos animais controle ($p < 0,001$). Esse dado nos sugere que o estado diabético tem influência sobre a atividade de IDO de forma independente da presença dos AGEs.

- Homogenato de cérebro

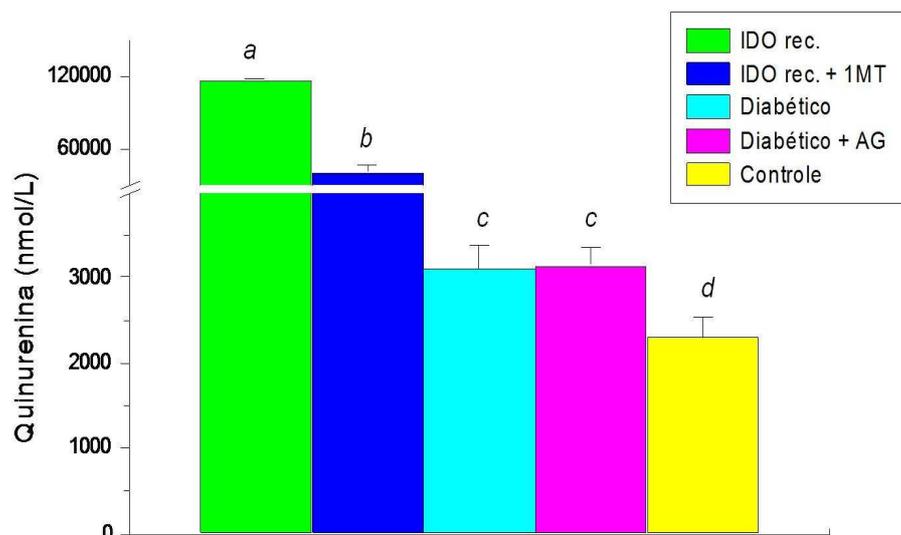


GRÁFICO 15 - Atividade de IDO no homogenato de cérebro de animais dos grupos diabético (n=8), diabético tratado com AG (n=8) e controle não diabético (n=8), avaliada pela presença de quinureninas em HPLC. Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística pelo teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações.

Fonte: Do autor

4.7.2 Efeito da ativação de macrófagos por LPS na expressão de IDO por imunomarcção

Para avaliar o a expressão de IDO nos macrófagos peritoneais realizamos testes de imunofluorescência, imunocitoquímica e *Dot blot*.

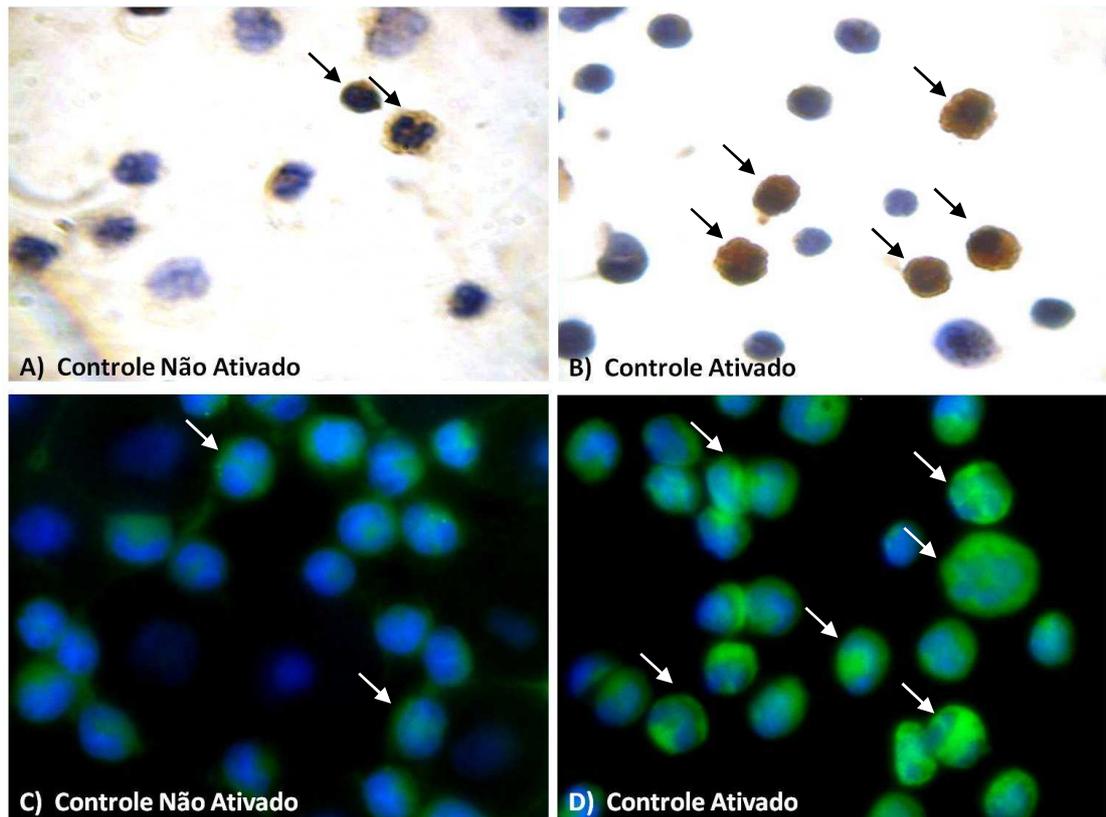


FIGURA 3 - Avaliação da ativação dos macrófagos peritoneais por LPS na expressão de IDO através de imunocitoquímica e imunofluorescência nos animais controle não diabéticos.

- A) Imunocitoquímica de macrófagos não ativados por LPS de animal controle.
- B) Imunocitoquímica de macrófagos ativados por LPS de animal controle.
- C) Imunofluorescência de macrófagos não ativados por LPS de animal controle.
- D) Imunofluorescência de macrófagos ativados por LPS de animal controle.

Fonte: Do autor

Para a imunocitoquímica de IDO foi utilizado anticorpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico conjugado à peroxidase (1:100), para a contracoloração do núcleo utilizou-se Hematoxilina. A revelação foi realizada utilizando diaminobenzidina (DAB). Aumento de 100x em imersão. Para a imunofluorescência da IDO foi utilizado anti-corpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico (1:50) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde)

para microscopia confocal. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

Na FIG 3 observamos que houve significativo aumento na expressão da enzima IDO quando os animais controles, não diabéticos, receberam prévia ativação dos macrófagos peritoneais pela injeção de LPS. A localização da IDO está indicada pelas setas e marcada em marrom nas imagens de imunocitoquímica (figuras 3A e 3B), e em verde nas imagens de imunofluorescência (figuras 3C e 3D).

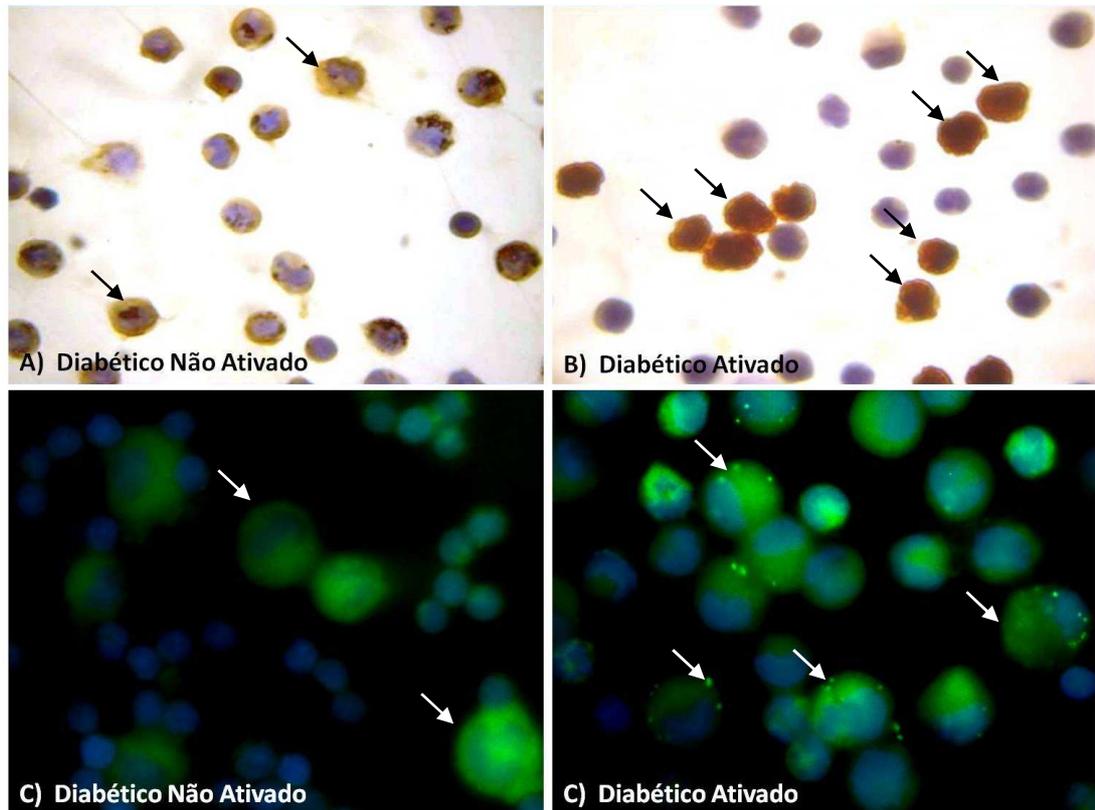


FIGURA 4 - Avaliação da ativação dos macrófagos peritoneais por LPS na expressão de IDO através de imunocitoquímica (fig 4A e 4B) e imunofluorescência (fig 4C e 4D) nos animais diabéticos.

- A) Imunocitoquímica de macrófagos não ativados por LPS de animal diabético.
- B) Imunocitoquímica de macrófagos ativados por LPS de animal diabético.
- C) Imunofluorescência de macrófagos não ativados por LPS de animal diabético.
- D) Imunofluorescência de macrófagos ativados por LPS de animal diabético.

Fonte: Do autor

Para a imunocitoquímica de IDO (marcada em marrom) foi utilizado anticorpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico conjugado à peroxidase (1:100), para a contracoloração do núcleo utilizou-se Hematoxilina (azul). A revelação foi realizada utilizando DAB. Aumento de 100x em imersão. Para a imunofluorescência da IDO foi utilizado anti-corpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico (1:50)

marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para microscopia confocal. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

Na FIG 4 nota-se aumento na expressão deIDO nos animais diabéticos ativados com LPS em relação aos animais diabéticos sem qualquer ativação. AIDO apresenta-se indicada pelas setas e marcada em marrom nas imagens de imunocitoquímica (figuras 4A e 4B), e em verde nas imagens de imunofluorescência (figuras 4C e 4D). Além disso, observamos que nos macrófagos dos animais diabéticos ativados por LPS aIDO se mostrou de forma mais pontual na periferia da célula (figura 4D).

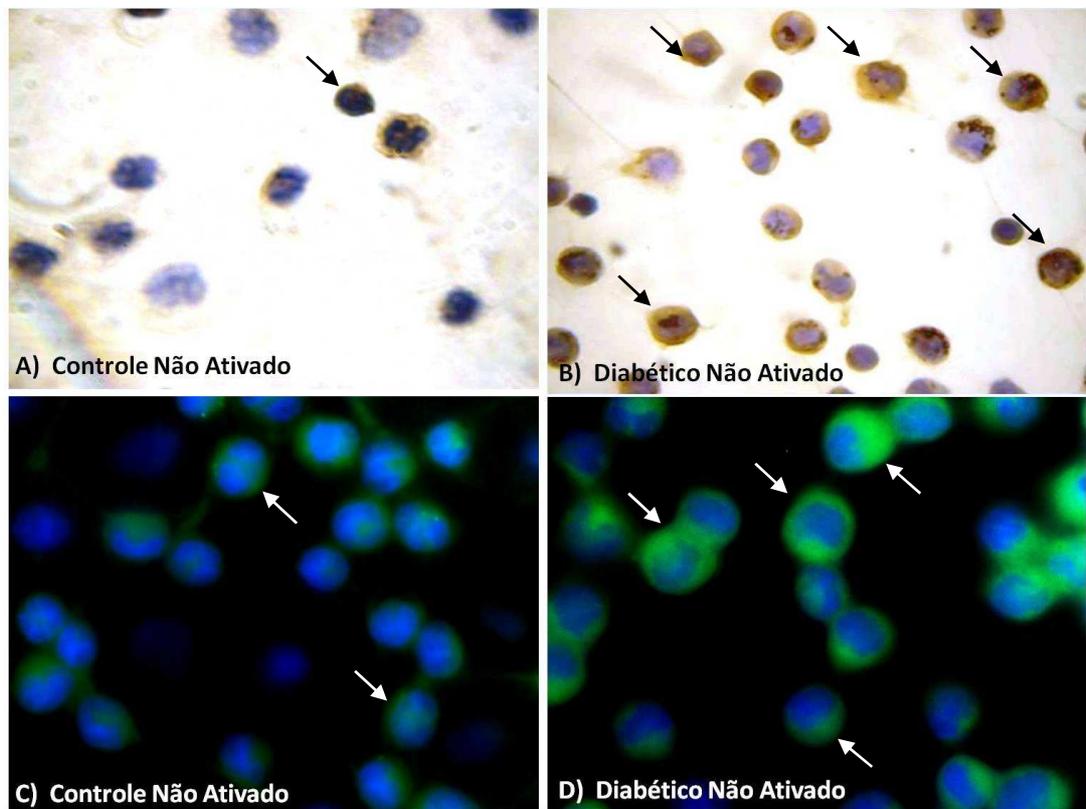


FIGURA 5 - Comparação da expressão deIDO nos estados diabético e controle não diabético, sem qualquer tipo de ativação, através de imunocitoquímica e imunofluorescência.

- A) Imunocitoquímica de macrófagos não ativados por LPS de animal controle.
- B) Imunocitoquímica de macrófagos não ativados por LPS de animal diabético.
- C) Imunofluorescência de macrófagos não ativados por LPS de animal controle.
- D) Imunofluorescência de macrófagos não ativados por LPS de animal diabético.

Fonte: Do autor

Para a imunocitoquímica deIDO (Fig 5A e 5B: marcada em marrom) foi utilizado anticorpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico conjugado à peroxidase (1:100), para a contracoloração do núcleo utilizou-se Hematoxilina (azul). A revelação foi realizada utilizando DAB. Aumento de100x em imersão.

Para a imunofluorescência da IDO (Fig 5C e 5D) foi utilizado anti-corpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico (1:50) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para microscopia confocal. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

A FIG 5 compara a expressão da IDO nos estados diabético e controle, sem ativação. Observamos que houve maior expressão de IDO nos macrófagos peritoneais dos animais diabéticos, conforme indicado pelas setas, tanto na análise por imunocitoquímica (figuras 5A e 5B) quanto pela análise por imunofluorescência (figuras 5C e 5D).

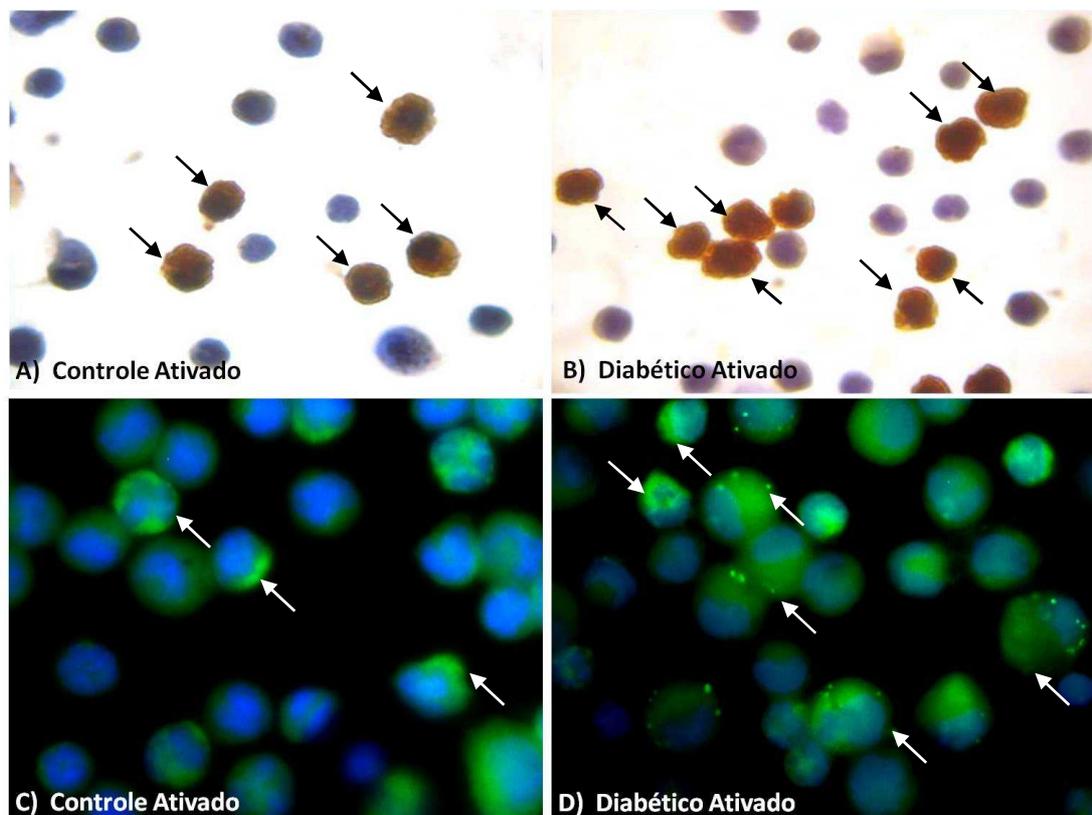


FIGURA 6 - Comparação da expressão de IDO nos estados diabético e controle não diabético, com ativação por LPS, através de imunocitoquímica e imunofluorescência.

- A) Imunocitoquímica de macrófagos ativados por LPS de animal controle.
- B) Imunocitoquímica de macrófagos ativados por LPS de animal diabético.
- C) Imunofluorescência de macrófagos ativados por LPS de animal controle.
- D) Imunofluorescência de macrófagos ativados por LPS de animal diabético.

Fonte: Do autor

Para a imunocitoquímica de IDO (marcada em marrom nas figuras 6A e 6B) foi utilizado anticorpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico conjugado à peroxidase (1:100), para a contracoloração do núcleo utilizou-se Hematoxilina (azul). A revelação foi realizada utilizando DAB. Aumento de 100x em imersão. Para a

imunofluorescência da IDO (figuras 6C e 6D) foi utilizado anti-corpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico (1:50) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde) para microscopia confocal. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

A FIG 6 mostra que houve maior expressão de IDO nos animais diabéticos do que nos animais controle, ambos ativados previamente por LPS, tanto por imunocitoquímica quanto por imunofluorescência, conforme indicados pelas setas. O padrão de distribuição pontual da IDO na periferia celular, observado nos macrófagos de animais diabéticos ativados com LPS (figura 6D) não ocorreu nos animais controle também ativados (figura 6C), indicando que esta característica se restringe ao grupo diabético ativado.

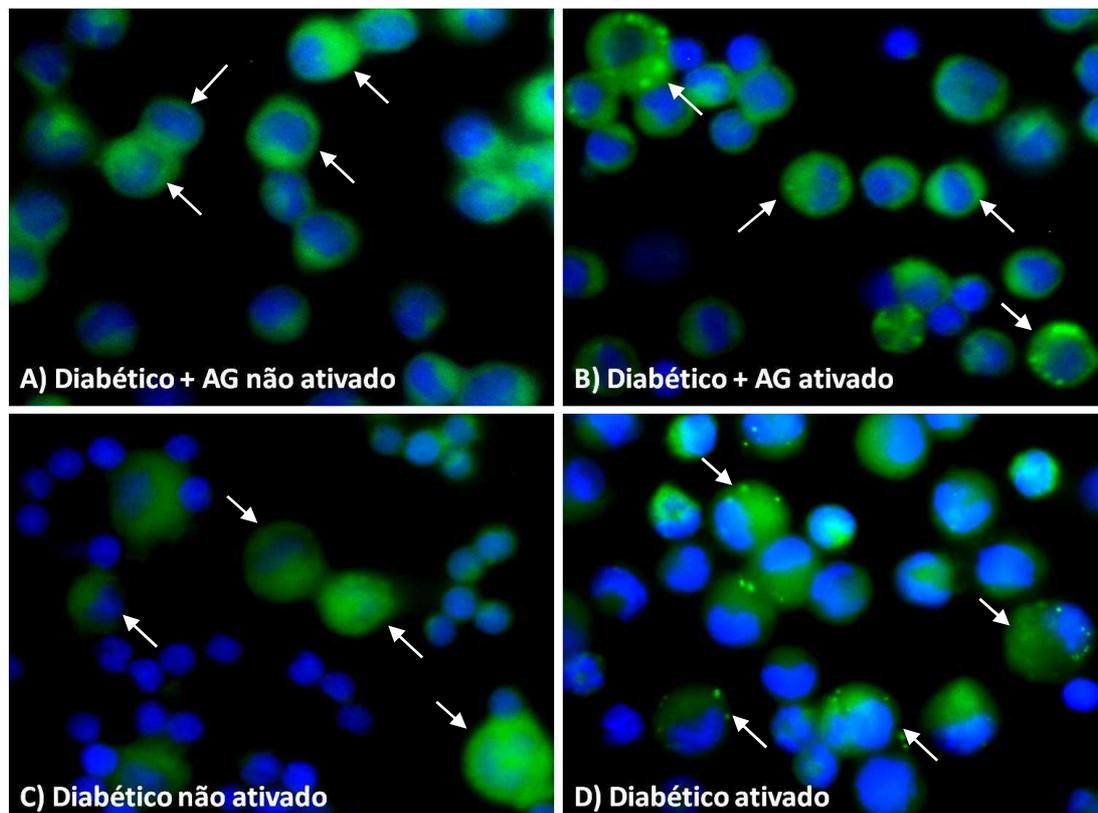


FIGURA 7 - Comparação da expressão de IDO em macrófagos de animais diabéticos tratados e não tratados com AG, ativados ou não por LPS através de imunofluorescência.

- A) Macrófagos não ativados por LPS de animal diabético tratado com AG
- B) Macrófagos ativados por LPS de animal diabético tratado com AG
- C) Macrófagos não ativados por LPS de animal diabético não tratado com AG
- D) Macrófagos ativados por LPS de animal diabético não tratado com AG

Fonte: Do autor

Para a imunodeteção da IDO foi utilizado anticorpo primário anti-IDO (1:50) e secundário específico (1:50) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde)

para microscopia confocal. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

Para avaliarmos o efeito do tratamento com a aminoguanidina sobre a expressão deIDO realizamos o ensaio de Imunofluorescência de macrófagos peritoneais de animais diabéticos tratados e não tratados com AG (FIG 7). Observamos que praticamente não houve diferença na proporção de células expressando IDO entre os grupos com e sem tratamento, porém no que diz respeito à ativação por LPS, os animais diabéticos ativados, tratados ou não, mostraram padrão mais pontual de distribuição de IDO, com preferência pela membrana celular (FIG 7B e FIG 7D), enquanto que nos animais controles a IDO apresenta-se de forma mais difusa por toda a célula (FIG 7A e FIG 7C).

Demonstramos que a localização desta enzima é diferente quando ativamos as células e esta diferença de localização pode estar relacionada com uma alteração na função celular.

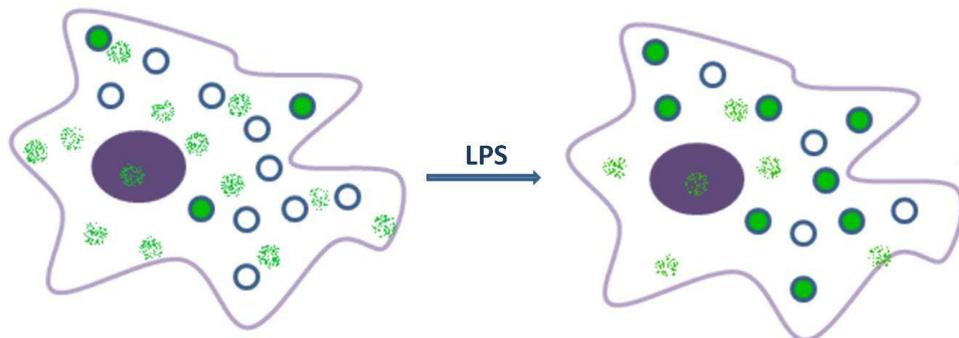


FIGURA 8 - Esquema da marcação de IDO nos macrófagos peritoneais dos animais diabéticos, tratados ou não tratados com AG, com e sem a ativação pelo LSP.

Fonte: Adaptado de OKADA, S. S. 2010.

O verde representa a marcação de IDO, os círculos representam as vesículas ou grânulos, marcados ou não pela IDO. Observa-se além de IDO dispersa no citoplasma uma maior concentração da enzima dentro de vesículas quando as células estão ativadas.

4.7.3 Efeito da ativação de macrófagos por LPS na expressão de IDO por Dot blot

Além dos ensaios de imunofluorescência e imunocitoquímica realizamos o ensaio de Dot blot para avaliar a expressão daIDO em animais diabéticos ativados ou não com LPS e comparação com animais controles não diabéticos ativados ou não com LPS.

Através de Dot blot avaliamos a expressão da enzimaIDO e observamos um aumento na expressão daIDO devido à condição diabética em relação aos animais controle, e este aumento foi mais evidente nos animais ativados pelo LPS.



FIGURA 9 - Expressão deIDO por *Dot blot* em macrófagos peritoneais de animais dos grupos controle e diabético, ativados ou não por LPS. Imagem representativa de 3 experimentos realizada em duplicata (n=8/grupo).

Fonte: Do autor

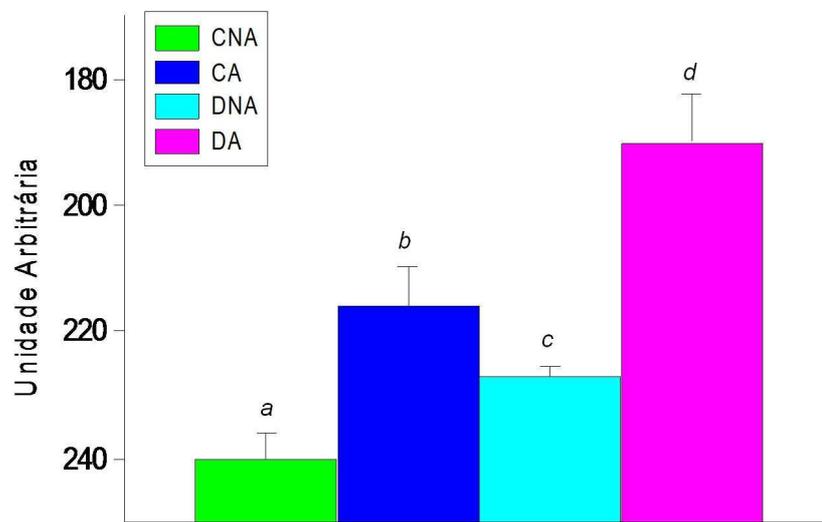


GRÁFICO 16 - Expressão deIDO por *Dot blot* em macrófagos peritoneais de animais dos grupos controle e diabético, ativados ou não por LPS. Letras minúsculas diferentes significam que houve diferença estatística.

Fonte: Do autor

Os dados da literatura ainda são controversos sobre o papel que aIDO exerce no DM. Evidências suportam a hipótese de que aIDO possa contribuir com um conjunto de mecanismos que atrasam a progressão dessas doenças restaurando

a tolerância imune⁸². Demonstrou-se que durante o tratamento com inibidor de IDO, 1-metil-triptofano (1MT), a progressão do DM1 acelera⁸⁵. Nesta mesma linha, foi demonstrado também que a inibição da IDO com 1MT aumentou significativamente a lesão renal glomerular¹¹⁰.

Estudos recentes têm demonstrado maior sobrevivência em longo prazo e viabilidade de ilhotas singênicas expostas á fibroblastos expressando IDO em modelo animal diabético⁸³. E dados de outros estudos têm fornecido evidências encorajadoras para o tratamento do DM1 com IDO expressa por *Células de Sertoli* encapsuladas⁸⁴.

Diante do exposto, nota-se que o real papel da IDO em condições normais e em condições patológicas ainda é bastante conflitante. Desta forma, novos estudos sobre a natureza exata da IDO nos mecanismos de patogenicidade do DM são necessários.

Neste trabalho, observamos um incremento da IDO na condição de hiperglicemia, principalmente quando houve a ativação pelo LPS. Desta forma, sugerimos que a IDO pode vir a se tornar um marcador em potencial da morbidade do diabetes.

5 CONCLUSÃO

- No estado diabético houve um aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), conforme esperado, em relação aos animais controle, o que validou o nosso modelo experimental.
- A aminoguanidina (AG) inibiu a formação dos AGEs.
- A ativação dos macrófagos peritoneais pelo LPS aumentou a atividade de expressão de IDO nos três grupos experimentais (diabético, diabético + AG e controle).
- Macrófagos peritoneais de ratos diabéticos apresentam maior conteúdo de IDO do que ratos controle.
- Os AGEs não tiveram influência na atividade e expressão da IDO, pois a inibição da glicação pela aminoguanidina não alterou a modulação da enzima.
- O estado diabético por si só aumentou a atividade e expressão de IDO, tanto nos macrófagos peritoneais quanto no homogenato de cérebro, porém por mecanismos independentes da concentração dos AGEs, já que não houve diferenças na modulação de IDO entre diabéticos tratados com AG e diabéticos não submetidos ao tratamento.

Estes achados sugerem que IDO tem considerável potencial para a avaliação em novas estratégias terapêuticas para o DM.

REFERÊNCIAS

- 1- YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. Oxid Med Cell Longev, Kurume, v. 3, n. 2, p. 101-108, Mar. 2010.
- 2- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Alguns dados epidemiológicos. Disponível em: <<http://www.diabetes2009.com.br/imprensa/105-diabetes-no-brasil-alguns-dados-epidemiologicos>>. Acesso em: 10 nov. 2009.
- 3- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. Arq Bras Endocrinol Metab, Maceió, v. 52, n. 6, p. 940-946, mar. 2008.
- 4- WIERUSZ-WYSOCKA, B. Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with diabetes mellitus. J Leuk Biol, Poznan, v. 42, p. 519-524, Nov. 1987.
- 5- ZOZULINSKA, D. et al. The influence of IDDM duration on superoxide anions and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear neutrophils. Diab Res Clin Pract, Poznan, v. 33, n. 3, p. 139-144, Aug. 1996.
- 6- PERTOVAARA, M. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase enzyme activity correlates with risk factors for atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. Clin Exp Immunol, Tampere, v. 148, n. 1, p. 106-111, Apr. 2007.
- 7- NIINISALO, P. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: The Health 2000 study. Scand J Clin Lab Invest, Tampere, v. 68, n. 8, p. 767-770, Nov. 2008.
- 8- WIRLEITNER, B. et al. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. Eur J Clin Invest, Innsbruck, v. 33, n. 7, p. 550-554, July, 2003.
- 9- PAWLAK, K. et al. The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. Atherosclerosis, Bialystoc, v. 204, n. 1, p. 309-314, May 2009.
- 10- PAWLAK, K. et al. Kynurenine, quinolinic acid - The new factors linked to carotid atherosclerosis in patients with end-stage renal disease. Atherosclerosis, Bialystoc, v. 204, n. 2, p. 561-566, June 2009.

- 11- GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUCCETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: Much ado about IDO. Trends Immunol., Perugia, v. 24, n. 5, p. 242–248, May 2003.
- 12- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, Tyne, v. 34, n. 1, p. 62-69, Apr. 2011.
- 13- KAVEY R.E. et al, Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science. Circulation, Bethesda, v. 114, n. 24, p. 2710-2738, Nov. 2006.
- 14- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res, Poznan, v. 50, n. 6, p. 537-546, Mar. 2001.
- 15- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. Nature, Boston, v. 444, n. 7121, p. 860-867, Dec. 2006.
- 16- KEMPF, K. et al. The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. J Mol Med, Dusseldorf, v. 85, n. 4, p. 389-396, Apr. 2006.
- 17- GRYKIEL, K. D. et al. Increased expression of polymorphonuclear neutrophil surface receptors and serum L-selectin concentration in type 1 diabetic patients. Diab Res Clin Pract, Poznan, v. 74, n. 2, p. 349, Nov. 2000.
- 18- WILSON, R. M.; REEVES, W. G. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. Clin Exp Immunol, Nottingham, v. 63, n. 2, p. 478-484, Feb. 1986.
- 19- SERLENGA, E. et al. Polymorphonuclear cellmediated phagocytosis and superoxide anion release in insulindependent diabetes mellitus. Cytobios, Cambridge, v. 74, p. 189-195, Nov. 1993.
- 20- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DO DIABETES. Estatísticas do Diabetes. Disponível em: <<http://diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics>>. Acesso em: 22 nov. 2010.
- 21- ORCHARD, T. J. et al. Type 1 diabetes and coronary artery disease. Diabetes Care, Pittsburg, v. 29, n. 11, p. 2528-2538, Nov. 2006.
- 22- MAUTNER, S. L.; LIN, F.; ROBERTS, W. C. Composition of atherosclerotic plaques in the epicardial coronary arteries in juvenile (type 1) diabetes mellitus. Am J Cardiol, Bethesda, v. 70, n. 15, p. 1264–1268, Nov. 1992.
- 23- DONAHUE, R.; ORCHARD, T. Diabetes mellitus and macrovascular complications: an epidemiological perspective. Diabetes Care, Flórida, v. 15, n. 9, p. 1141–1155, Sept. 1992.

- 24- STEWART, R.; LIOLITSA, D. Review: Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. Diabet Med, Londres, v. 16, n. 2, p. 93-112, Feb. 1999.
- 25- THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. 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, Birmigan, v. 329, n. 14, p. 977-986, Sept. 1993.
- 26- TURNER, R. C. et al. For the UKPDS Study Group. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus (UKPDS: 23). BMJ, Birmigan, v. 316, n. 7134, p. 823–833, Mar. 1998.
- 27- LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. Clin Biochem, Padova, v. 38, p. 103-115, Oct. 2004.
- 28- BOOTH, A. A. et al. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs): Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. J Biol Chem, Kansas, v. 272, p. 5430-5437, Feb. 1997.
- 29- THORNALLEY, P. J. Advanced glycation and the development of diabetic complications. Unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. Endocrinol Metab, Zurique, v. 3, p. 149-166, Nov. 1996.
- 30- IKEDA, K. et al. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. J Immunol Methods, Kunamoto, v. 215, n. 1-2, p. 95-104, June 1998.
- 31- SCHLEICHER, E. D. et al. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. Contrib Nephrol, Ohio, v.131, p.1-9, Nov. 2001.
- 32- AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation end products (AGEs): surveying AGEs chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N-carboxymethyl-lysine and N-(1-carboxyethyl) lysine-modified albumin. Biochem Journal, Colcheter, v. 364, p.1-14, May 2002.
- 33- KIKUCHI, S. et al. Glycation a sweet tempter for neuronal death. Brain Res Rev, Sapporo, v. 41, n. 2-3, p. 306-323, May 2003.
- 34- YONEKURA, H. Novel Splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and putative roles in diabetes-induced vascular injury. Biochem. J., Kanazawa, v. 370, p. 1097-1109, Mar. 2003.
- 35- BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med, Bronx, v.318, p. 1315–1321, May 1988.

- 36- NORTON, G .R.; CANDY, G.; WOODIWISS, A. J. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. Circulation, Johannesburg, v. 93, p. 1905–1912, May 1996.
- 37- RAJ, D. S. C. et al. Advanced Glycation End Products: A Nephrologist's Perspective. Am J Kidney Dis, Louisiana, v. 35, n. 3, p. 365-380, Mar 2000.
- 38- ALVES, C. A. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. Arg Bras Endocrinol Metab, Salvador, v. 51, n.7, p. 1050-1057, out. 2007.
- 39- AHMED, N. et al. Ne-(carboxyethyl) lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. Biochem Journal, Carolina do Sul, v. 324, p. 565-570, May 1997.
- 40- LI, Y. M.; DICKSON, D. W. Enhanced binding of advanced glycation end production (AGEs) by ApoE4 isofrom links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. Neurosci Lett, New York, V. 22, p. 155-158, May 1997.
- 41- PAUL, R. G.; BAYLEY, A. J. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. Int J Biochem Cell Biol, Langford, v. 28, n. 12, p. 1297-1310, Dec. 1996.
- 42- MOHIB, K. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expression promotes renal ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Renal Physiol, Ontario, v. 295, n. 1, p. 226-234, July 2008
- 43- SCHEFOLD, J. C. et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. Nephrol Dial Transplant, Berlim, v. 24, n. 6, p. 1901–1908, June 2009.
- 44- HUENGSBERG, M. et al. Serum kynurenine-to-tryptophan ratio increases with progressive disease in HIV-infected patients. Clin Chem, Birmighan, v. 44, n. 4, p. 858-862, Nov. 1998.
- 45- BROWNLEE, M. et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science, New York, v. 232, p. 1629-1632, June 1986.
- 46- BROWNLEE, M. Glycation and Diabetic Complications. Diabetes, New York, v. 43, p. 836–841, Dec. 1994.
- 47- THORNALLEY, P. J.; YUREK-GEORGE, A.; ARGIROV, O. K. Glycation and advanced glycation endproducts. Bioch Pharmacol. v. 60, p. 655–665, Aug. 2000.

- 48- CORBETT, J. A. et al. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines. Inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation. ADA. St. Louis, v. 41, p. 552–556, Nov. 1992.
- 49- LEWIS, B. S.; HARDING, J. J. The effects of aminoguanidine on the glycation (non-enzymatic glycosylation) of lens proteins. Exp Eye Res, Oxford v. 50, p. 463-467, May 1990.
- 50- HIRSCH, J.; BAINES, C. L.; FEATHER, M. S. X-ray structure of 3-amino 5 substituted triazines produced by the reaction of 3-deoxyglucose with aminoguanidine. J Carb Res, Columbia, v. 11, p. 891-901, Nov. 1992.
- 51- SUGIMOTO, H. et al. Crystal structure of human indoleamine 2, 3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. Proc Natl Acad Sci, Hyogo, v. 103, n. 8, p. 2611-2616, Dec. 2006.
- 52- YOSHIDA, R. et al. Induction of pulmonary indoleamine 2, 3-dioxygenase by interferon. Proc Natl Acad Sci, Kyoto, v. 78, n. 1, p. 129-132, Jan. 1981.
- 53- WERNER, E. R.; BITTERLICH, G.; FUCHS, D. Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon gamma. Life Sci, Innsbruck, v. 41, n. 3, p. 273-280, July 1987.
- 54- HWU, P. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol, Frederick, v. 164, n. 7, p. 3596-3699, Apr. 2000.
- 55- MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. Nature Rev Immunol, Georgia, v. 4, n. 10, p. 762–774, Oct. 2004.
- 56- TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2, 3-dioxygenase-initiated l-tryptophan metabolism. Biochem Biophys Res Commun, Aichi, v. 338, n. 1, p. 12–19, Dec. 2005.
- 57- THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Redox reactions related to indoleamine 2, 3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. Redox Report, New South Wales, v. 4, n. 5, p. 199–220, Oct. 1999.
- 58- HAYASHI, T. et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2, 3-dioxygenase. J Clin Invest, California, v. 114, n. 2, p. 270–279, July 2004.
- 59- BABAN, B. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. J Reprod Immunol, Augusta, v. 61, n. 2, p. 67–77, Apr. 2004.

- 60- BEUTELSPACHER, S. C. et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses. Am J Transplant, Londres, v. 6, n. 6, p. 1320–1330, Apr. 2006.
- 61- MOHIB, K. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase expression promotes renal ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Renal Physiol, Ontário, v. 295, n. 1, p. 226–234, May. 2008.
- 62- BALL, H. J. et al. Characterization of an indoleamine 2, 3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. Gene, Sydney, v. 396, n. 1, p. 203–213, June 2007.
- 63- BALL, H. J. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. Int J Biochem Cell Biol, Camperdown, v. 41, n. 3, p. 467–471, Mar. 2009.
- 64- METZ, R. et al. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. Cancer Res., Winewoody, v. 67, n. 15, p. 7082–7087, Aug. 2007.
- 65- OHNISHI, T. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. J Biol Chem, Kyoto, v. 252, n. 13, p. 4643-4647, July 1977.
- 66- CHEN, Y.; GUILLEMIN, G. J. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. Int J Tryptophan Res, Camperdown, v. 2, p. 1-19, Dec. 2008.
- 67- STONE, T. W. Endogenous neurotoxins from tryptophan. Toxicon, Glasgow, v. 39, n. 1, p. 61-73, Jan. 2001.
- 68- WIDNER, B. et al. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. J Neural Transm, Innsbruck, v. 107, n. 3, p. 343-353, July 2000.
- 69- MOFFETT, J. R. et al. Antibodies to quinolinic acid reveals localization in select immune cells rather than neurons or astroglia. Brain Res, Washington, v. 623, n. 2, p. 337-340, Oct. 1993.
- 70- HEYES, M.P. et al. Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. Ann Neurol, Bathesda, v. 29, n. 2, p. 202-209, Feb. 1991.
- 71- KING, N. J. C.; THOMAS, S. R. Molecules in focus: Indoleamine 2, 3-dioxygenase. Int. J. Biochem. Cell Biol., Sydney, v. 39, p. 2167-2172, May 2007.
- 72- BYRNE, G. I. et al. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. J Interferon Res, Wiscousin, v. 6, n. 4, p. 389-396, Aug. 1986.

- 73- WERNER-FELMAYER, G. et al. Induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase in human cells in vitro. Adv Exp Med Biol, Bloomington, v. 294, p. 505-509, Nov. 1991.
- 74- FUJIGAKI, S. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. Eur J Immuno, Gifu, v. 31, n. 8, p. 2313-2318, Aug. 2001.
- 75- CONNICK, J. H.; STONE, T. W. The role of kynurenines in diabetes mellitus. Medical Hypotheses, London, v.18, n. 4, p. 371-376, Dec. 1985.
- 76- PFEFFERKORN, E. R.; ECKEL, M.; REBHUN, S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. Mol Biochem Parasitol, Hanover, v. 20, n. 3, p. 215-224, Set. 1986.
- 77- BYRNE, G. I.; LEHMANN, L.K.; LANDRY, G. J. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. Infect Immun, Madson, v. 53, n. 2, p. 347-351, Aug. 1986.
- 78- OZAKI, Y.; EDELSTEIN, M.P.; DUCH, M. S. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. Proc Natl Acad Sci, Carolina do Norte, v. 85, n. 4, p. 1242-1246, Aug. 1988.
- 79- BABAN, B.; TODD, P.W.; MOZAFFARI, M. S. The potential role of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) as a predictive and therapeutic target for diabetes treatment: a mythical truth. EPMA Journal., Georgia, v. 1, p. 46-55, Nov. 2010.
- 80- MUNN, D.H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science, Athensv. 281, n. 5380, p. 1191–1193, Aug. 1998.
- 81- MÜLLER, A. et al. The missing link between indoleamine 2, 3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. J Cell Mol Med, Dusseldorf, v. 13, n. 6, p. 1125–1135, Oct. 2009.
- 82- NIINISALO, P. et al. Activation of indoleamine 2, 3-dioxygenase-induced tryptophan degradation in advanced atherosclerotic plaques: Tampere Vascular Study. Annals of Medicine, Tampere, v. 42, n. 1, p. 55-63, Feb. 2010.
- 83- JALILI, R. B. et al. Mouse pancreatic islets are resistant to indoleamine 2, 3 dioxygenase-induced general control nonderepressible-2 kinase stress pathway and maintain normal viability and function. Am J Pathol, Alberta, v. 174, n. 1, p. 196–205, Dec. 2009.
- 84- FALLARINO, F. et al. IDO mediates TLR9-driven protection from experimental autoimmune diabetes. J Immunol, Perugia, v. 183, n. 10, p. 6303–6312, Oct. 2009.

- 85- SAXENA, V. et al. The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. J. Immunol., Augusta, v. 179, n. 8, p. 5041–5053, Oct. 2007.
- 86- UENO, A. et al. Transient upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes. Diabetes, Alberta, v. 56, n. 6, p. 1686–1693, Mar. 2007.
- 87- BRANDACHER, G. et al. Non-invasive monitoring of kidney allograft rejection through IDO metabolism evaluation. Kidney Int, Innsbruck, v. 71, n. 1, p. 60–67, Nov. 2007.
- 88- ZILIN, S. et al. The determination of AGE-peptides by Flow Injection assay, a Practical Marker of Diabetic Nephropathy. Clin Chim Acta, Najing, v. 313, n. 1-2, p. 69-75, Nov. 2001.
- 89- YAMAMOTO, S.; HAYAISHII, O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. J Biol Chem, Kyoto, v. 242, n. 22, p. 5260-5266, Nov. 1967.
- 90- GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e avaliação do Controle Glicêmico. Arq Bras Endocrinol Metabol, Porto Alegre, v. 46, n. 1, p. 16-26, dez. 2002
- 91- HARDY R. R. et al. B-cell subpopulations identified by two-color fluorescence analysis. Nature, Rockefeller, v. 297, n. 5867, p. 589-591, June 1982.
- 92- HERZENBERG, L. A. et al. The LY-1 B cell lineage. Immunol Rev, v. 93, p. 81-102, Oct. 1986.
- 93- MARCOS, M. A. et al. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. Eur J Immunol, Paris, v. 19, n. 11, p. 2031-2-35, Nov. 1989.
- 94- SCHLEICHER, U.; HESSE, A.; BODGAN, C. Minute numbers of contaminating CD8+ T cells or CD11b+ CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12 IL-18-stimulated mouse macrophage populations. Blood, Erlanger, v. 105, n. 3, p. 1319-1328, Sept. 2005.
- 95- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, Hannover, v. 51, n. 2, p. 216-226, Feb. 2008.
- 96- LYONS, T. J. et al. Decrease in Skin Collagen Glycation With Improved Glycemic Control in Patients With Insulin-dependent Diabetes Mellitus. J Clin Invest, Northern Ireland, v. 87, n. 6, p. 1910-1915, June 1991.
- 97- LEVEY, A. S.; STEVENS L. A.; HOSTETTER, T. Automatic reporting of estimated glomerular filtration rate: Just waste the doctor ordered. Clin Chem, Boston, v. 52, n. 12, p. 2188-2193, Oct. 2006.

- 98- FARIA, J. B. L.; LOPES, A. C. Diabetes Melito e o rim. Trat Clin Med, São Paulo, abr. 2009.
- 99- MURUSSI, M. et al. Detecção precoce da nefropatia diabética. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 442-451, dez. 2008.
- 100- FARIA, J. B. L. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: patogênese da nefropatia diabética. J Bras Nefrol, São Paulo, v. 23, n. 2, p.121-129, mar. 2001.
- 101- MAILLARD, L. C. Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanoidines par voie methodique. C R Hebd Acad Sci Ser, Paris, v. 154, p. 1554, Aug. 1912.
- 102- SOLEZ K. et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. Kidney Int, Edmonton, v. 44, n. 2, p. 411-422, Aug. 1993.
- 103- WHITE, K. E., BILOUS, R. W. Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 2 disease. J Am Soc Nephrol, Midllesbroungh, v. 11, n. 9, p. 1667-1673, Sept. 2000.
- 104- POLAT, A. et al. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. Acta Histochem, Malatya, v. 108, n. 5, p. 365-371, Sept. 2006.
- 105- SPOSITO, A. C. (Coord.) Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol, São Paulo, v. 88, s.1, p. 2-19, abr. 2007.
- 106- KAHRI, J. et al. Regulation of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in IDDM. Diabetes, Finlândia, v.42, n. 9, p.1281-1288, Sept. 1993.
- 107- SVIRIDOV, D.; et al. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. J Atheroscler Thromb, Austrália, v. 15, n. 2, p. 52-62, Apr. 2008.
- 108- LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: Estudo clínico e laboratorial. Acta Cirúrgica Brasileira, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 2-13, abr. 2003.
- 109- OKADA, S. S. Regulação cruzada entre peroxidases e indolamina 2, 3 dioxigenase no controle da metabolização do triptofano. 2010. 165 f. Tese (doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2010.

110- WEIPING, H. et al. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates crescentic glomerulonephritis. Clin Exp Immunol, London, v. 156, p. 363–372, May 2009.