

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ROGER DE MORAES

MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS ADAPTATIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O RIM DE COELHO E AS INFLUÊNCIAS DA GLICOSE ELEVADA: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá

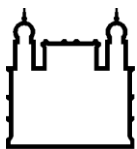
RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ROGER DE MORAES

MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS ADAPTATIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O RIM DE COELHO E AS INFLUÊNCIAS DA GLICOSE ELEVADA: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá

Aprovada em: 21/ 08 / 2008

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Dario Eluan Kalume

Prof. Dr. Antônio Cláudio Lucas da Nóbrega

Prof. Dr. Marília Brito Gomes

Rio de Janeiro, 21 de agosto de 2008

AGRADECIMENTOS

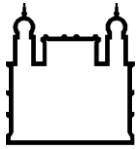
Agradeço a todos os que, na FIOCRUZ, UERJ e UFF, contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, registro meu reconhecimento ao Dr. Eduardo Tibiriçá, por mais uma vez ter me orientado de forma lúcida e competente durante todos estes anos.

Agradeço também, a todos do Laboratório de Toxinologia que, ao colaborarem para a integração da farmacologia clássica com a biologia molecular, possibilitaram a identificação dos mecanismos adaptativos associados ao treinamento físico que se encontram descritos neste trabalho.

Entre os membros do Laboratório de Farmacologia Neurocardiovascular, agradeço particularmente ao Flávio Pereira de Souza pelo companheirismo e caráter ao longo do nosso relacionamento.

Finalmente, agradeço aos meus pais pelo apoio, a Beatriz pela inspiração diária, aos meus filhos, Giovanna e Matheus, pela admiração e a todos eles pelos extremos de paciência e incentivo a mim concedido.

“Raramente se erra, quando se liga as ações extremas à vaidade, as mediócras ao costume e as mesquinhas ao medo.”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MECANISMOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS ADAPTATIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O RIM DE COELHO E AS INFLUÊNCIAS DA GLICOSE ELEVADA: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

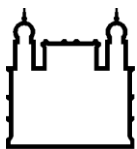
Roger de Moraes

Introdução: Encontra-se bem evidenciado que o treinamento físico é capaz de alterar a reatividade vascular do rim de coelhos, aumentando a resposta de vasodilatação dependente e independente de endotélio assim como proteger a circulação deste órgão contra a exposição aguda a níveis elevados de glicose. Á fim de identificar os mecanismos associados a estes fenômenos, o presente estudo procurou investigar, através de abordagem proteômica, as modificações na expressão de proteínas no córtex renal de coelhos que foram induzidas pelo exercício dinâmico crônico e pela glicose elevada.

Metodologia: Os coelhos foram mantidos confinados (S) ou submetidos a treinamento físico em esteira motorizada cinco dias por semana a velocidade de 18m/min durante 60 minutos ao longo de um período de doze semanas (T). Os rins isolados de coelhos foram canulados e a circulação renal imediatamente lavada com 50ml de solução salina (S0 e T0) ou continuamente perfundida *ex vivo* durante 3 horas com solução de Krebs-Henseleit contendo concentração normal (5.5mM: SN e TN) ou elevada (50mM: SH e TH) de D-glicose. A expressão de proteínas no córtex renal foi determinada através de coloração por azul de *coomassie* coloidal após eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. As proteínas diferencialmente expressas foram excisadas, digeridas por tripsina e seqüenciadas através de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF ou com ionização por eletrospray acoplada a *ion trap*. Os dados adquiridos foram analisados em algoritmo de procura Mascot ou manualmente interpretados, e as seqüências obtidas, submetidas através de programa Blastp, ao banco de bases da NCBI.

Resultados: Dos 324 *spots* visualizados, cerca de 30% apresentaram intensidade com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$), compreendendo uma ou mais ocorrências de 40 proteínas. Do total de proteínas com expressão diferenciada, 27% apresentam função antioxidante, 7% participam de funções chaperona, 5% são proteínas estruturais e 46 % são enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Além da redução na expressão de enzimas da beta oxidação e da fosforilação oxidativa, que podem reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial, o treinamento físico foi capaz de elevar a expressão de proteínas de estresse (HSP27, HSP60 e GRP75) e antioxidantes (Peroxiredoxina-6, proteína disulfeto isomerase, glutathione transferase e aldo-ceto redutase) que, ao lado da maior quantidade da proteína dimetilarginina aminohidrolase (DDAH-1), é capaz de exercer efeito citoprotetor contra eventos oxidativos e apoptóticos além de contribuir para o aumento da disponibilidade de óxido nítrico no córtex renal.

Conclusão: O exercício dinâmico crônico é capaz de modificar o fenótipo do córtex renal de coelhos alterando a expressão de proteínas que aperfeiçoam a capacidade de resposta ao estresse neste órgão e permitem a manutenção da funcionalidade da enzima óxido nítrico sintase além de menor inativação do óxido nítrico em desafios da homeostasia redox intracelular. Estes resultados explicam porque o treinamento físico é capaz de aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico na circulação renal de coelhos e proteger este leito vascular contra os efeitos agudos deletérios da glicose elevada podendo representar juntos, importantes mecanismos de prevenção para o desenvolvimento da nefropatia diabética.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MECHANISMS ASSOCIATED TO THE PHYSICAL TRAINING ADAPTATIVE EFFECTS OVER THE RABBIT KIDNEY AND THE INFLUENCES FROM HIGH GLUCOSE: A PROTEOMIC APPROACH

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

Roger de Moraes

Introduction: It is well demonstrated that physical training alters the rabbit kidney vascular reactivity, enhancing endothelium-dependent and independent renal vasodilation, and protects the renal circulation against endothelial dysfunction elicited by acute exposure to moderately elevated glucose level. In order to identify the mechanisms associated to glucose toxicity and exercise training adaptative effects over the renal metabolism, the present study investigated, using a proteomic approach, the protein expression changes in the rabbit renal cortex induced by chronic dynamic exercise and high glucose levels.

Methods: Animals were pen confined (S) or treadmill trained (0% grade) for 5 days/wk at a speed of 18 m/min during 60 min over a 12-week period (T). Kidneys isolated from S and T rabbits were isolated and both the renal arteries and veins were cannulated and flushed immediately with saline solution (S0 e T0) or continuously perfused *ex vivo* during 3 hours with Krebs-Henseleit solutions containing normal (5.5mM: SN e TN) or high (50mM: SH e TH) concentrations of D-glucose. Expression of proteins in the renal cortex was determined by colloidal Coomassie blue staining after two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Differential protein spots were excised, trypsin digested and peptides sequenced by MALDI TOF/TOF mass spectrometry or by electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. Acquired data were analysed at Mascot algorithm searcher or manually interpreted and obtained sequences submitted to the NCBI non-redundant database using the Blastp software.

Results: From 324 protein spots visualized, 30% showed differential expression between the experimental groups ($p < 0,05$), revealing 40 proteins. Altogether, those proteins includes 27% with antioxidant function, 7% with chaperone activity, 5% with structural function and 46% are enzymes that belongs to carbohydrate, protein and lipid metabolism. Besides a reduction in beta oxidation and oxidative phosphorylation, exercise training was able to increases expression level from stress proteins (HSP27, HSP60 e GRP75) and antioxidants (Peroxiredoxin-6, protein disulphide isomerase, glutathione transferase and aldo-keto reductase) which together with increases in Dimethylarginine Aminohydrolase protein could elicit cytoprotection effect against oxidative and apoptotic events and also participate in the enhancement of nitric oxide bioavailability in the renal cortex.

Conclusion: Chronic dynamic exercise modifies the renal cortex phenotype changing the expression of proteins that enhances stress response capacity and keeps nitric oxide synthase enzyme functionality besides lowering intracellular redox challenge nitric oxide inactivation. Those results explain why exercise training is able to increase nitric oxide biodisponibility in the renal cortex circulation and protects this vascular bed against the acute and deleterious effects of high glucose and thus could represent important mechanisms against diabetic nephropathy development.

ABREVIATURAS

- ACh- Acetilcolina (Acetylcholine)
- ADMA – Dimetilarginina Assimétrica (Asymmetric Dimethylarginine)
- AGEs – Produtos avançados de glicação não enzimática (Advanced Glycation End-products)
- AGL – Ácido Graxo Livre
- AMPK – Adenosina monofosfato cinase (AMP-activated protein kinase)
- ANG II- Angiotensina 2
- AP-1 – Proteína ativadora 1 (Activated Protein 1)
- APO-A1 – Apolipoproteína A-1 (Apolipoprotein A-1)
- ARE – Elemento regulador da expressão de genes antioxidantes (Antioxidant Response Element)
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AUR – Taxa de Excreção Urinária de Albumina (Albumin Urinary Rate)
- BH₄ – Tetrahydrobiopterina (Tetrahydrobiopterin)
- CaMKII- Cinase dependente de cálcio/calmodulina 2 (Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II)
- CAT – Catalase (Catalase)
- CHAPS – Detergente zwitteriônico (3-Cholamidopropyl dimethyl-ammonio 1-propanesulfonate)
- COX – Ciclooxygenase (Cyclooxygenase)
- Cys – aminoácido cisteína (Cysteine)
- Cys-SH – Grupo tiol ativado do resíduo de cisteína (Cysteine-Sulfhydryl)
- 2-D/PAGE- Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)
- DAG- Diacilglicerol (Diacylglycerol)
- DDAH – Dimetilaminohidrolase (Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase)
- DM – Diabetes Melitus (Diabetes Mellitus)
- DM-1 – Diabetes Melitus tipo 1 (Type 1 Diabetes Mellitus)
- DM-2 – Diabetes Melitus tipo 2 (Type 2 Diabetes Mellitus)
- DRT – Doença Renal Terminal
- DTT – Ditioneitol (Dithiothreitol)
- ECA – Enzima conversora de angiotensina
- EDCFs – Fatores de Construção Derivados do Endotélio (Endothelial Derived Contracting Factors)

EDHF – Fator Hiperpolarizante Derivado de Endotélio (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor)

EDRFs – Fatores de Relaxamento Derivados do Endotélio (Endothelial Derived Relaxing Factors)

eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial (endothelial NO-synthase)

ERM – Família de proteínas envolvidas na estabilização do citoesqueleto que incluem ezrin, radixin e moesin (Ezrin-Radixin-Moesin)

ESI – Ionização por eletrospray (Electrospray Ionization)

ET- Endotelina (Endothelin)

ET-1 – Endotelina-1(Endothelin-1)

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo (Flavin-Adenine Dinucleotide)

FMN – Mononucleotídeo de flavina (Flavin Mononucleotide)

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblasto (Fibroblast Growth Factor)

G3P – Gliceraldeído 3-fosfato

G3PDSH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GLUT – Transportador de Glicose (Glucose Transporter)

GpX – Glutathione Peroxidase (Glutathione Peroxidase)

GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclico (Guanosine Monophosphate Cyclic)

GRP – Proteína regulada por glicose (Glucose Regulated Protein)

GST - Glutathione-S-transferase (Glutathione-S-Transferase)

GSH – Glutathione reduzida (Reduced Glutathione)

GSSG – Glutathione oxidada (Oxidated Glutathione)

GTP – Guanosina Trifosfato

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

4-HNE - 4-hidroxinonenal (4-hydroxynonenal)

HbA1c – Hemoglobina glicosilada (Glycated Haemoglobin)

HDL – Lipoproteína de alta densidade (High Density Lipoprotein)

HSA – Albumina humana sérica (Human Serum Albumin)

HSA-SH – Mercaptoalbumina (Mercaptoalbumin-Sulfhydryl)

HSA-S-S-R – Forma não mercaptoalbumina (Oxidated mercaptoalbumin)

HSP - Proteína de estresse (Heat Shock Protein)

HSF-1 - Fator de transcrição de proteínas de estresse (Heat shock factor 1)

HUVEC- Células endoteliais provenientes do cordão umbilical humano (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

ICAM – Molécula de adesão intercelular (Intercellular Adhesion Molecule)

IECA – Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

IEF - Focalização isoelétrica (Isoelectric Focusing)

IGF-1 - Fator de Crescimento semelhante à Insulina-1 (Insulin-like Growth Factor-1)

IGT – Tolerância diminuída à glicose (Impaired Glucose Tolerance)

IL-1 - Interleucina 1(Interleucin-1)

IL-1 β - Interleucina 1 beta (Interleucin 1 β)

IL-6 – Interleucina 6 (Interleucin 6)

IL-18 – Interleucina 18 (Interleucin 18)

iNOS – Óxido Nítrico Sintase indutível (Inducible NO-synthase)

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein)

L-NAME – Análogo da L-arginina que inibe competitivamente a NOS (Nitro-L-Arginine Methyl Ester)

L-NMMA – Monometil arginina assimétrica (Monomethyl L-Arginine)

LPS - Lipolissacarídeos (Lipopolysaccharide)

MALDI – Ionização e dessorção da matriz assistida por laser (Matrix Assited Laser Desorption/Ionization)

MAPK – Molécula de sinalização intracelular MAP cinase (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MAPKAPK-2 - Mitogen-Activated Protein Kinase -Activated Protein Kinase-2

MDO – Malonaldeído (Malondialdehyde)

MS – Espectrometria de massa (Mass spectrometry)

NAD - Nicotidamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH Oxidase – Enzima oxidase formadora de espécies reativas de oxigênio (Oxidated Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NE – Noradrenalina (Norepinephrine)

NF-1 – Fator de transcrição nuclear 1(Nuclear Factor 1)

NF- $\kappa\beta$ - Fator de transcrição nuclear kappa-beta (Nuclear Factor kappa-betha)

NO – Óxido Nítrico (Nitric Oxide)

nNOS – Óxido Nítrico Sintase neuronal (neuronal NO-synthase)

NOS - Óxido Nítrico Sintase (Nitric Oxide Synthase)

Nrf₂ – Fator de transcrição sensível ao estado redox da célula (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

OGTT – Teste de tolerância oral à glicose (Oral Glucose Tolerance Test)

OMS – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (Plasminogen Activator Inhibitor-I)

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor)

PDI - proteína disulfeto isomerase (Protein Disulphide Isomerase)

PFK-1 – Fosfofrutocinase 1(Phosphofructokinase 1)

PGI₂ – Prostaciclina (Prostacyclin)

pI – Ponto isoelétrico (Isoelectric Point)

PKC – Proteína Cinase C (Protein Kinase C)

PMRT – Proteína metil transferase (Protein Arginine Methyl Transferase)

PRDXs – Peroxiredoxinas (Peroxiredoxins)

RAGE – Receptores para AGEs (Receptor for AGE)

RNAm – RNA mensageiro

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)

SBP – Proteína ligante de selênio (Selenium Binding Protein)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (Sodium Dodecyl Sulfate)

SH – Grupo sulfidril ou tiol ativado (Sulfhydryl Group)

SOD – Superóxido Dismutase (Superoxide Dismutase)

SOD-2 – Isoforma mitocondrial da Superóxido Dismutase (Mitochondrial Superoxide Dismutase)

SNO – Grupamento sulfidril nitrosilado (Nitroso-Sulfhydryl)

SOH – Grupo sulfidril oxidado a ácido sulfênico (Sulphenic Acid)

STZ – Estreptozotocina (Streptozotocin)

TCA – Ácido tricloroacético (Trichloroacetic Acid)

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TGF α – Fator de Transformação do crescimento alfa (Transforming Growth Factor- alpha)

TGF β – Fator de Transformação do crescimento beta (Transforming Growth Factor- betha)

Thr – Aminoácido treonina (Threonine)

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor– alpha)

TNF β 1 – Fator de Necrose Tumoral beta 1 (Tumor Necrosis Factor– betha)

TOF – Tempo de vôo (Time of Flight)

TXN – Tromboxano (Tromboxane)

VCAM-1- Molécula de adesão vascular-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)

VEGF – Fator de crescimento vascular derivado de endotélio (Vascular Endothelial Growth Factor)

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes e doença vascular.....	01
1.2- Mecanismos de lesão associados à hiperglicemia.....	04
1.3- Nefropatia diabética	12
1.4- Proteoma na doença renal.....	17
1.5- Circulação renal.....	20
1.6- Exercício Físico.....	22
1.7- Efeito protetor do exercício sobre a glicose elevada.....	28

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral.....	32
2.2- Objetivo Específico.....	32

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais de experimentação.....	33
3.2- Protocolo de Treinamento.....	33
3.2.1- Experimento 1.....	33
3.2.2- Experimento 2.....	34
3.3- Preparação das amostras.....	34
3.3.1- Experimentos 1 e 2.....	34
3.4- Extração das proteínas do córtex renal dos coelhos.....	35
3.4.1- Experimento 1.....	35
3.4.2- Experimento 2.....	35
3.5- Eletroforese bidimensional.....	36
3.5.1- Experimento 1.....	36
3.5.2- Experimento 2.....	38
3.6- Digestão in gel.....	39
3.6.1- Experimentos 1 e 2.....	39
3.7- Espectrometria de massa.....	39
3.7.1- Experimento 1: ESI-ION TRAP.....	39
3.7.2- Experimento 2: MALDI-TOF.....	40

3.8- Análise estatística da imagem dos géis	41
3.8.1- Experimento 1.....	41
3.8.2- Experimento 2.....	41

CAPÍTULO 4 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 - Apresentação dos Resultados.....	42
--	----

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1- Apolipoproteína A-1 (APO-A1).....	58
5.2- Proteínas de estresse (<i>Heat shock proteins</i>).....	59
5.2.1- HSP27.....	60
5.2.1.1- Vilina.....	63
5.2.2- HSP60.....	66
5.2.3- Outras alterações na expressão de proteínas de estresse.....	70
5.3- Proteínas antioxidantes.....	71
5.3.1- Peroxiredoxina-6.....	73
5.3.1.1- Outras alterações na expressão de proteínas bifuncionais....	76
5.3.2- Glutathiona-S-transferase.....	80
5.3.2.1- Outras proteínas do metabolismo de xenobióticos.....	83
5.3.3- Albumina.....	85
5.3.4- Proteína ligante de selênio (SBP-1).....	91
5.4- Proteínas que controlam a atividade da NOS.....	93
5.4.1- Dimetilarginina aminohidrolase.....	93
5.4.2- Regucalcina.....	98
5.5- Proteínas do metabolismo de carboidratos, peptídeos e lipídios.....	101
5.5.1- Enzimas da beta-oxidação e da fosforilação oxidativa.....	101
5.5.2- Enzimas da via gliconeogênica.....	108
5.6- Considerações finais.....	114
6 – CONCLUSÃO.....	117
7 – REFERÊNCIAS.....	119
8 - ANEXOS.....	158

SUMÁRIO DE FIGURAS

	Página
Figura 4.1. Eletroforese bidimensional dos grupos S0 e T0 do experimento 1.....	43
Figura 4.2. Eletroforese bidimensional dos grupos S0 e T0 do experimento 2.....	44
Figura 4.3. Eletroforese bidimensional dos grupos SN e TN do experimento 2.....	44
Figura 4.4. Eletroforese bidimensional dos grupos SH e TH do experimento 2.....	45
Figura 4.5. Distribuição por grupos de proteínas identificadas no experimento 2.....	51
Figura 4.6. Imagens da região de 45-97kDa e pI de 5-6,5 do experimento 2.....	53
Figura 4.7. Imagens da região de 20-45kDa e pI de 5-6 do experimento 2.....	54
Figura 4.8. Imagens da região de 10-30kDa e pI de 6-7 do experimento 2.....	55
Figura 5.1. Intensidade da HSP27 entre os grupos do experimento 2.....	62
Figura 5.2. Intensidade da vilina entre os grupos do experimento 2.....	64
Figura 5.3. Intensidade da HSP60 entre os grupos do experimento 2.....	68
Figura 5.4. Intensidade da GRP75 entre os grupos do experimento 2.....	72
Figura 5.5. Intensidade da PRDX-6 entre os grupos do experimento 2.....	75
Figura 5.6. Intensidade da PDI-A3 entre os grupos do experimento 2.....	77
Figura 5.7. Intensidade da ciclofilina entre os grupos do experimento 2.....	79
Figura 5.8. Intensidade da GST entre os grupos do experimento 2.....	82
Figura 5.9. Intensidade da AKRA1 entre os grupos do experimento 2.....	84
Figura 5.10. Intensidade da albumina (<i>spot40</i>) entre os grupos do experimento 2.....	86
Figura 5.11. Intensidade da albumina (<i>spot43</i>) entre os grupos do experimento 2.....	87
Figura 5.12. Intensidade da albumina (<i>spot50</i>) entre os grupos do experimento 2.....	88
Figura 5.13. Intensidade da SBP-1 entre os grupos do experimento 2.....	92
Figura 5.14. Intensidade da DDAH-1 entre os grupos do experimento 2.....	93
Figura 5.15. Intensidade da RGN entre os grupos do experimento 2.....	99
Figura 5.16. Intensidade da SOD-2 entre os grupos do experimento 2.....	100
Figura 5.17. Intensidade da UbCitC redutase entre os grupos do experimento 2.....	102
Figura 5.18. Intensidade da ATP sintase entre os grupos do experimento 2.....	103
Figura 5.19. Intensidade da FTE entre os grupos do experimento 2.....	104
Figura 5.20. Intensidade da Enoil-CoA HIDR-Mit entre os grupos do experimento 2.....	105
Figura 5.21. Intensidade da Acil-CoA DSH entre os grupos do experimento 2.....	106
Figura 5.22. Intensidade da TIM entre os grupos do experimento 2.....	110
Figura 5.23. Intensidade da enolase entre os grupos do experimento 2.....	111
Figura 5.24. Intensidade da Frutose 1,6BPase entre os grupos do experimento 2.....	112

Figura 5.25. Intensidade da Malato DSH-1 entre os grupos do experimento 2.....113

SUMÁRIO DE TABELAS

	Página
Tabela 4.1. Descrição nominal das proteínas do experimento 2.....	47
Tabela 4.2. Descrição funcional das proteínas do experimento 2.....	49
Tabela 4.3. Descrição das proteínas selecionadas para estudo.....	52
Tabela 4.4. Descrição das outras proteínas identificadas no experimento 2.....	56
Tabela 4.5. Descrição dos <i>spots</i> identificados como albumina.....	57

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes e doença vascular

O Diabetes mellitus (DM) abrange um grupo heterogêneo de desordens metabólicas de múltipla etiologia, com elevado impacto na morbidade e mortalidade da população geral (1,2,3). Apesar das dificuldades de diagnóstico da doença, que, na maioria dos casos, evolui de forma silenciosa, trata-se de enfermidade de alta prevalência nas sociedades modernas, com efeitos catastróficos predominantemente verificados em países subdesenvolvidos, aonde a maior parte dos indivíduos com a doença encontram-se na plenitude etária de sua capacidade laborativa (4,5).

Neste contexto, estima-se que existam hoje, cerca de 180 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo, valores que, segundo estudos epidemiológicos, tendem a aumentar em virtude do envelhecimento, urbanização e crescimento populacional, podendo chegar a cerca de 370 milhões de pessoas em 2030 (4,5).

Como é sabido, o DM caracteriza-se por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, resultantes da incapacidade das células beta do pâncreas de produzir insulina e/ou de a insulina exercer adequadamente seus efeitos sobre as células do organismo (3,6). Essa condição provoca danos na macro e na micro-circulação, com disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos (6,7), que representam a principal causa de invalidez e morte entre pacientes diabéticos (8). De fato, são inúmeras as evidências clínicas e experimentais que indicam a existência de complicações vasculares no DM, efeito que, em grande parte, decorre da exposição do sistema circulatório a quantidades excessivas de glicose (7,8,9,10, 11).

Com a finalidade de propiciar rápido transporte de grande volume de líquidos, a distâncias aonde a difusão seria inadequada ou mesmo muito lenta, o sistema circulatório desenvolveu-se, ao longo de milhões de anos de evolução, a fim de atender à maior complexidade e sofisticação dos organismos aeróbicos (12). Em mamíferos, este sistema é composto por vasos de condução e de resistência que conduzem o sangue e modulam a oferta de oxigênio, e nutrientes como a glicose, aos capilares, de acordo com a atividade metabólica de cada tecido. Em condições de hiperglicemia crônica, ou mesmo, em situações em que exista elevação intermitente e aguda da glicose do sangue (13,14), este essencial nutriente poderá, paradoxalmente, provocar efeito tóxico sobre as estruturas do vaso, propiciando resposta inflamatória, capaz de se propagar para diferentes tecidos e deteriorar a função de vários órgãos (15,16,17).

Enquanto a arquitetura dos capilares teciduais caracteriza-se por fina camada de células endoteliais, comuns a todos os vasos, e que neste segmento, permite a difusão de nutrientes e o trânsito de produtos do metabolismo, a dos vasos de condução e de resistência, apresenta adicionalmente, duas outras camadas (18). A primeira, a camada média é formada por células de músculo liso, colágeno e fibrilas elásticas, enquanto que a segunda, distal à luz do vaso e denominada adventícia, é constituída de colágeno e fibroblastos onde residem todas as inervações autonômicas responsáveis pelo controle extrínseco do tônus vascular (19).

O tônus vascular reflete a atividade tônica de contração do músculo liso dos vasos do sistema circulatório e seu efeito sobre os vasos de resistência é responsável pela modulação da velocidade do fluxo e da pressão sangüínea (20). Neste processo, o controle do tônus depende também de influências intrínsecas, como substâncias humorais e vasoativas derivadas do próprio endotélio vascular, que se comunicam com o músculo liso para, em conjunto com as influências extrínsecas, definir o lúmen vascular destinado à passagem do sangue (21). Alterações fisiopatológicas no controle intrínseco do tônus vascular encontram-se presentes em condições de hiperglicemia e envolvem quase sempre, a disfunção da célula endotelial (22).

Muito mais do que uma simples barreira de separação entre os elementos do sangue e os demais compartimentos intersticiais, o endotélio vascular desempenha papel de grande importância na determinação do tônus vasomotor (23). Representado por um conjunto de células homogêneas, com elevada atividade metabólica e área de aproximadamente 1000m² que reveste de forma contínua a parede luminal de todos os vasos do sistema circulatório, este tecido participa também do controle da hemostasia do sangue e da resposta imune (24, para revisão ver 25). Em condições íntegras, através da produção de diferentes substâncias vasoativas de ação sinérgica, antagônica ou complementar, desempenha papel indispensável no controle da fisiologia vascular (25). Quando, no entanto, distúrbios metabólicos permitem aumentos na concentração sérica de moléculas como a glicose, impõe-se forte desequilíbrio na produção e/ou biodisponibilidade dessas substâncias provocando profundas alterações na síntese e na atividade de proteínas endoteliais, que contribuem para expressão de fenótipo vascular inflamatório e aterogênico (22,26).

Estudos realizados com cultura de células derivadas do endotélio vascular, segmentos de vasos ou órgãos isolados *in vitro* demonstram que a exposição à concentração de glicose em excesso aos valores fisiológicos é capaz de, aguda ou cronicamente, interferir negativamente na função endotelial, provocando desde pequenas alterações de sua função até morte celular por apoptose (27,28). Doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose acelerada e microangiopatia são complicações diabéticas típicas, relacionadas com o processo

precoce de disfunção endotelial que, em geral, é diagnosticado por reduzida resposta de vasodilatação dependente de endotélio (22,26).

As células endoteliais sintetizam e liberam várias substâncias difusíveis com ação vasoativa de relaxamento e constrição, que interagem com o músculo liso vascular contribuindo com a modulação contínua da reatividade vascular (24). Os fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) melhor caracterizados são o óxido nítrico (NO), gás formado pela atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a partir da transformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina, e a prostaciclina (PGI₂), prostanóide vasoativo liberado a partir da ação da enzima ciclooxygenase sobre o ácido aracônico da membrana celular. Ambos podem ser liberados através de estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento (*shear stress*) provocado pela circulação do sangue e também, pelo estímulo hormonal (25). Neste contexto, a vasodilatação dependente de endotélio induzida por acetilcolina (ACh), que, reconhecidamente, tem-se mostrado capaz de produzir relaxamento vascular induzido por NO, tem sido utilizada para caracterizar a função endotelial em diferentes condições fisiológicas e fisiopatológicas em vários estudos que incluem humanos ou animais (29).

A reatividade vascular pode também ser modulada pelo fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF), que, provavelmente, atua através da ativação dos canais de K⁺ sensíveis a Ca²⁺ (K_{Ca}) (30, 31). O EDHF parece estar envolvido na regulação local do fluxo de sangue em pequenos vasos de resistência (32), com a exceção dos leitos coronário e renal, aonde também contribui para a modulação da reatividade vascular em artérias de condução (33).

O endotélio vascular é capaz igualmente de produzir substâncias de ação vasoconstritora (EDCFs), como o tromboxano (TXN), a endotelina (ET), e a angiotensina II (ANG-II) que, apesar de possuírem importantes papéis fisiológicos na manutenção da homeostasia vascular, podem apresentar-se desproporcionalmente elevados em algumas condições fisiopatológicas (22,25,34). A hiperglicemia e outros distúrbios metabólicos associados ao DM têm se mostrado capazes de promover forte desequilíbrio na produção de substâncias vasoativas derivadas do endotélio, determinando não apenas uma elevação dos EDCFs mas também, redução significativa na biodisponibilidade dos EDRFs, o que corrompe a funcionalidade do endotélio vascular e o predispõem à doença (35). Esta assimetria permite o predomínio das forças constritoras sobre o tônus vascular e cria um ambiente pró-inflamatório e pró-trombótico, diretamente associado à etiologia da aterosclerose e da angiopatia diabética (10,36,37). De forma semelhante, tais mecanismos encontram-se diretamente envolvidos com a patogênese de outras doenças cardiovasculares, como

hipertensão arterial (38,39) e doença coronariana (25), ambas associadas a distúrbios da função endotelial.

Neste sentido, alterações metabólicas típicas do DM, que incluem não apenas a hiperglicemia, mas também as elevações dos níveis plasmáticos de colesterol e ácidos graxos, encontram-se diretamente relacionadas com a desorganização dos papéis biológicos da célula endotelial e promovem o desenvolvimento de fenótipo vascular fisiopatológico, capaz de comprometer a função de vários órgãos (40,41). Estudos clínicos prospectivos já demonstraram a existência de disfunção endotelial em indivíduos, que, apesar de não serem diabéticos, já apresentam resistência à insulina e tolerância diminuída à glicose (IGT) tendo, portanto, risco aumentado de complicações em órgãos como o coração e os rins (37,42).

Por outro lado, mesmo em indivíduos saudáveis, a hiperglicemia agudamente induzida é capaz de reduzir imediatamente a resposta de vasodilatação do endotélio vascular (43,44). De fato, a exposição breve e intermitente do endotélio vascular íntegro a concentrações de glicose moderadamente elevadas pode desregular sua função e prejudicar os mecanismos de controle da homeostasia vascular (45). Esses achados sugerem que a elevação da glicose, por si só, exerça efeito deletério sobre a integridade e funcionalidade endotelial (46) e são coerentes com a constatação de que a hiperglicemia pós-prandial é considerada atualmente fator de risco independente para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares e mortalidade em pacientes com IGT e diabetes mellitus tipo 2 (DM-2)(47,48).

A meta de se obter um controle estrito da glicemia em todos os pacientes com essas alterações metabólicas é defendida pela maioria dos autores, cujos estudos constataram igualmente que o tratamento intensivo da hiperglicemia tem o efeito de provocar importantes reduções no risco de desenvolvimento e progressão das complicações microvasculares associadas à doença. (49, 50, 51, 52).

1.2- Mecanismos de lesão associados à hiperglicemia

A necessidade de moléculas, como oxigênio e glicose para a sobrevivência dos organismos aeróbios, obscurece o fato de que elas apresentam elevado grau de toxicidade celular e são capazes de provocar danos que deterioram significativamente a fisiologia do organismo (53). Apesar de vitais para transformação de energia em inúmeros tecidos, quando presentes em quantidades elevadas, essas moléculas encontram-se associadas à formação de substâncias reativas que danificam as estruturas celulares e lhes alteram a função (54).

O oxigênio diatômico surgiu em quantidades significativas na atmosfera da terra a aproximadamente 2,5 bilhões de anos, quando as cianobactérias passaram a extrair átomos de

hidrogênio das moléculas de água a fim de atenderem suas necessidades metabólicas (54). Este acontecimento determinou aumento inexorável da concentração atmosférica de oxigênio, permitindo a formação de extensa camada de ozônio que, ao filtrar a radiação ultra-violeta do sol, abriria espaço para a colonização da terra por seres vivos cuja existência até então era restrita às profundezas oceânicas. Por outro lado, tal fato acarretaria igualmente o extermínio de inúmeras formas de vida com metabolismo estritamente anaeróbico, que predominantemente habitavam o planeta e ainda não possuíam defesas para lidar com este gás mutagênico e extremamente letal (54). As espécies que sobreviveram, só o fizeram, graças ao desenvolvimento de sistemas de defesa anti-oxidante que, além de tornar tolerável a presença do oxigênio, permitiram também, sua utilização em transformações metabólicas e na produção eficiente de energia (55). No entanto, tais processos oxidativos ocasionavam também, a síntese de substâncias extremamente reativas, como o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio, coletivamente denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS) (56).

Os ROS incluem pequenas moléculas produzidas pelo metabolismo aeróbio, como os íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos de origem orgânica ou inorgânica, que apresentam elevada reatividade, em decorrência da presença de elétrons desemparelhados em seu último orbital (55). Encontram-se envolvidos em um grande número de processos fisiopatológicos como aterosclerose, inflamação e doenças neuro-degenerativas (57,58). Apesar de, em situações de estresse metabólico, como no caso da hiperglicemia, sua produção aumentar dramaticamente, a ponto de causar prejuízos no funcionamento celular, estas moléculas são normalmente formadas em condições fisiológicas e desempenham uma variedade de funções como sinalização, metabolização de xenobióticos, inicialização de apoptose e estimulação de processos anti-oxidantes e de reparo celular (59).

A despeito de sua colaboração na manutenção da homeostase, participando inclusive no controle da função vascular, através da modulação da síntese protéica e do crescimento e morte das células do endotélio e do músculo liso vascular, os ROS permanecem em constante equilíbrio com outras moléculas (anti-oxidantes) sintetizadas pela própria célula para se oporem à sua ação oxidante, contribuindo desta forma, para a manutenção de um estado redox ideal ao funcionamento do metabolismo (60). De fato, todas as formas de vida mantêm em seu ambiente intracelular, um predomínio de moléculas em estado reduzido, e a vida dos organismos aeróbios não seria possível sem a sua inerente capacidade de sintetizar moléculas com atividade anti-oxidante que incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), bem como, as recentemente descobertas, peroxiredoxinas (PRDXs), sulfiredoxinas e aldeídos desidrogenases (61). Distúrbios no estado redox

intracelular, com supremacia do estado oxidativo, provocam efeitos tóxicos capazes de promover danos em componentes da célula, como a membrana plasmática e estruturas do DNA, além de modificar a função de várias proteínas. Assim, quando a produção de ROS é muito mais elevada do que a capacidade biológica de inativá-las ou de reparar seus danos, estabelece-se uma condição de predomínio oxidante denominada estresse oxidativo (62).

Os efeitos celulares do estresse oxidativo dependem da magnitude das modificações no estado redox. Em alguns casos, a célula sobrepuja pequenas perturbações e restabelece o estado original por meio de adaptação que aperfeiçoa os próprios mecanismos de defesa anti-oxidante (63). Em outros, no entanto, quando existe estresse oxidativo mais severo, poderá ocorrer efeito devastador sobre a função e a estrutura das células, levando, em muitos casos, todo um órgão à falência (64). A presença de quantidades excessivas de glicose no sistema circulatório, ainda não adaptado evolutivamente à abundância desta molécula, estabelece condição de estresse oxidativo severo, que rompe o equilíbrio pré-existente entre as substâncias vasoativas derivadas do endotélio e, além de comprometer sua capacidade de controle do tônus, predispõe o ambiente vascular a processos inflamatórios e trombóticos que têm papel central na etiologia da aterosclerose e da microangiopatia diabética (65).

Conforme demonstrado em modelos experimentais e em ensaios clínicos com diabéticos, a hiperglicemia promove aumento dos níveis de ROS e a redução das reservas anti-oxidantes, sendo portanto, fator decisivo nas alterações funcionais que ocorrem na célula endotelial, predispondo-a ao desenvolvimento da doença vascular (62). Acredita-se que a alteração do equilíbrio na produção de substâncias vasoativas derivadas do endotélio explique o efeito tóxico vascular associado à presença de elevada concentração de glicose (66).

Monossacarídeos, como a glicose, são considerados tóxicos, por sua capacidade de se auto-oxidar espontaneamente e, neste processo, formar ROS para, em seguida, reagir com proteínas e, ao alterar-lhes a função original, degradar paulatinamente a fisiologia da célula (67,68). A toxicidade celular da glicose pode ser igualmente evidenciada por seu comportamento químico similar ao de um aldeído, permitindo a formação de ligações, que ocorrem lenta e gradualmente, de forma não enzimática, a grupamentos amina reativos, licenciando a formação de proteínas glicosiladas e inoperantes conhecidas como base de Schiff e produto de Amadori (69,70). Diante de excessos na concentração de glicose, essas reações ocorrem com maior frequência e as proteínas glicosiladas são novamente oxidadas em reações irreversíveis, que formam os chamados produtos de glicação enzimática avançada (AGE) (71). Os AGEs, classicamente representados pelo metilglioal e a 3-deoxiglicosona têm o potencial de alterar não apenas a função de proteínas e lipoproteínas (55), mas também,

de modificar a estrutura original da matriz extracelular e estimular, através da interação com seu próprio receptor (RAGE), a formação de quantidades adicionais de ROS (72,73).

O excesso de glicose intracelular aumenta também o fluxo da glicólise e garante a formação de elevado gradiente de prótons na membrana externa mitocondrial, o que eleva a produção mitocondrial de ROS que, por sua vez, reduz a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDSH), ocasionando o acúmulo de intermediários da via glicolítica (74). Neste sentido, aumentam no interior da célula as concentrações de trioses fosfato, frutose-6-fosfato e a própria glicose, o que potencializa a ativação de outras vias de produção de ROS através de dois mecanismos (74). No primeiro, a elevação da frutose-6-fosfato ativa a via da hexosamina, elevando a produção de glucosamina-6-P que estimula a expressão dos genes que codificam para a síntese de TGF β , fator de transcrição diretamente envolvido na síntese de substâncias vasoativas de natureza pró-inflamatória, as quais contribuem para a formação de ROS (75). A glucosamina-6-P poderá ainda, aumentar a síntese do inibidor da ativação do plasminogênio tecidual (PAI-1) e produzir a formação de ambiente pró-trombótico vascular que também incita a resposta inflamatória do organismo e provoca a formação de ainda mais moléculas de ROS. No segundo mecanismo, o próprio excesso de glicose ativa a via dos polióis, permitindo a formação de sorbitol, através da ação da enzima aldose reductase. O sorbitol é então oxidado a frutose, em reações que, além de diminuir a oferta de equivalentes redutores (NADPH), capazes de regenerar moléculas que neutralizam a ação das ROS (enzimas anti-oxidantes), também elevam a relação NADH/NAD⁺ ao ponto de impedir a oxidação das trioses fosfato. Este acontecimento aumenta ainda mais a quantidade de gliceraldeído-3-fosfato, desviando o metabolismo glicolítico para, a partir de sua degradação, assegurar a síntese de diacilglicerol (DAG) e de metilglioxal, respectivamente envolvidos na síntese de ROS (76). Alternativamente, a frutose formada na via dos polióis, poderá ser fosforilada e depois convertida em 3-deoxiglicosona, representando fonte alternativa para produção de ROS (77).

São clássicos os estudos conclusivos de que, em condições de hiperglicemia, os níveis de DAG encontram-se significativamente elevados em cultura de células e tecidos como rim, retina e aorta (78). O DAG representa o principal ativador da proteína cinase C (PKC), enzima diretamente envolvida nas complicações vasculares associadas ao DM e responsável por inúmeras alterações mediadas por concentração elevada de glicose sobre a função da célula endotelial (79).

Encontra-se bem estabelecido entre os investigadores que se empenham para compreender os efeitos deletérios vasculares da glicose elevada, que a hiperglicemia é capaz de promover hiper estimulação da PKC (80,81). O acionamento desta enzima induz a

ativação do Fator Nuclear de Transcrição NF- κ B responsável por estimular a transcrição de vários genes envolvidos no processo inflamatório, como os que codificam para as citocinas TNF- α e interleucina 1 β e proteínas de adesão como a E-selectina (40,82). A ativação crônica desses genes aumenta a permeabilidade endotelial, permite a adesão de células inflamatórias e plaquetas e transforma a parede vascular na sede de um processo inflamatório crônico, causador das alterações morfológicas que definem a aterosclerose (83). Além disso, a PKC é apta a ativar outra enzima, a NADPH oxidase, que cataliza a redução de um elétron do oxigênio com a oxidação simultânea do NADPH, para formar espécies reativas de oxigênio adicionais e potencializar o desequilíbrio já existente entre forças oxidantes e anti-oxidantes (84). Inevitavelmente, os ROS produzidos pela NADPH oxidase interferem novamente na atividade da G3PDSH e reiniciam o processo de síntese de ROS, através das vias da hexosamina, dos polióis e da produção excessiva de DAG-PKC e AGEs.

Evidências recentes demonstram que a NADPH oxidase é a principal fonte de ROS do endotélio vascular e sua constante ativação determina condição de estresse oxidativo severo, diretamente associado à disfunção e morte de células do endotélio vascular (83,85). De fato, a elevação crônica da concentração de glicose aumenta a apoptose associada ao estresse oxidativo em células endoteliais através da ativação do sistema PKC-NADPH oxidase e pode estar associada também, juntamente com os outros mecanismos anteriormente descritos, com a morte tecidual observada em órgãos independentes de insulina como os olhos e os rins (27,86).

Neste contexto, o papel da PKC é central já que, em modelos experimentais que investigaram o estresse oxidativo provocado pela hiperglicemia, a inibição da enzima poderia melhorar a função endotelial, restabelecendo a vasodilatação dependente de endotélio após *clamp* hiperglicêmico em indivíduos saudáveis (87), e suprimindo a expressão endotelial de moléculas de adesão e as interações leucócito-endotélio em diabéticos (88). Por intermédio da ativação sustentada da PKC, a hiperglicemia encontra-se associada ao aumento da expressão celular de TXN e endotelina 1 (ET-1), peptídeo da família das endotelinas de maior potencial vasoconstritor (89) e também, à maior produção de ANG II pela enzima conversora de angiotensina, presente na própria célula endotelial. Evidências recentes sugerem que a ANG II, produzida também pelas células do músculo liso vascular durante exposição à elevada concentração de glicose (90), possa aumentar a ativação da NADPH oxidase endotelial através da hiperestimulação da PKC (91).

Com isso, a elevação concomitante de TXN, ET-1, ANG-II (EDCFs) e NF- κ B, permite a liberação de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas de adesão celular, associadas ao desenvolvimento da aterosclerose e das complicações microvasculares

vinculadas à hiperglicemia (92). Estes efeitos se agravam com a redução da biodisponibilidade dos EDRFs, amplamente verificada em condições de estresse oxidativo.

Neste contexto, encontra-se bem evidenciado que, em condições de estresse oxidativo, o NO pode interagir com o ânion superóxido e formar substâncias tóxicas como o peróxido de nitrito, bem antes de conseguir provocar seus efeitos vasculares (93). O peróxido de nitrito aumenta o potencial de oxidação celular, reduzindo a biodisponibilidade do NO e comprometendo sua participação no controle da homeostasia vascular (94). Além disso, pode provocar rapidamente inúmeras reações oxidativas e nitrosativas, que, conforme demonstrado em condições experimentais *in vivo* e *in vitro*, caracterizam-se pela nitração de resíduos tirosina ligados a proteínas (94,95). Este acontecimento altera a propriedade funcional das proteínas e favorece o desenvolvimento de estados fisiopatológicos em vários órgãos (96,97).

Na tentativa de se contrapor à ação inativadora de NO e aos efeitos vasculares deletérios associados aos excessos de ROS, a célula endotelial aumenta a expressão da eNOS que, em associação com proteínas de choque térmico, também positivamente reguladas diante do desafio hiperglicêmico (98), procura aumentar a biodisponibilidade deste gás a fim de preservar seus efeitos vasculares (99). De fato, vários estudos sugerem que a adição de NO tem o potencial de impedir a morte de células endoteliais expostas à elevada concentração de glicose, podendo retardar por 24 horas o início do processo apoptótico (98,100). No entanto, a presença de peróxido de nitrito e outros agentes oxidantes, poderá determinar a modificação oxidativa de co-fatores da eNOS, como a tetrahydrobiopterina (BH₄) e desacoplar a função da enzima de seu papel produtor de NO, transformando-a paradoxalmente, em fonte de ânions superóxido (38,101), o que definitivamente compromete o efeito deste gás no controle das funções vasculares. Além disto, há evidências de que a enzima eNOS possa sofrer inativação direta mediada pela PKC (102) bem como por outras substâncias, presentes em quantidades abundantes em processos fisiopatológicos associados ao estresse oxidativo vascular (103,104,105).

Por sua vez, a eNOS poderá ser inativada pela dimetilarginina assimétrica (ADMA), o que reduz ainda mais a biodisponibilidade de NO vascular. A ADMA é uma substância de ação vasoconstritora formada a partir da metilação da arginina presente em proteínas alteradas pelos AGEs, que se acumula nos vasos, em decorrência da inativação da enzima responsável por sua degradação, a dimetilaminohidrolase (DHAH) (106). Há evidências de que, em pacientes diabéticos ou com resistência à insulina, os níveis de ADMA no plasma encontram-se aumentados e podem predizer a morbidade e mortalidade associada à nefropatia diabética (106) e à doença cardiovascular (107). Estudos que investigaram a inativação da DHAH

sugerem que, tanto os ROS (108,109) como os AGEs (35,110) podem modificar a atividade da enzima e determinar sua inativação.

Depreende-se do exposto que o estresse oxidativo vascular, associado à hiperglicemia, além de aumentar os EDCFs, diminui a biodisponibilidade de NO, seja reduzindo sua produção, seja aumentando sua inativação por ROS (8,56). No entanto, diante de concentração elevada de glicose, a função endotelial poderá ser alterada também, pela menor produção de EDHF e prostanóides vasodilatadores (15,56). Já foi demonstrado que o peróxido de nitrito encontra-se envolvido na inibição da síntese de PGI₂ nas células endoteliais, através de bloqueio da atividade da prostaciclina sintase. Uma vez que PGI₂ e NO contribuem também para impedir a ativação plaquetária, suas reduções criam um ambiente pró-trombótico vascular, que se acentua com o já mencionado aumento da produção do PAI-1 pelas células endoteliais expostas a ambientes hiperglicêmico (111,112).

Por outro lado, a exposição do endotélio vascular à concentração elevada de glicose é capaz de, por intermédio do estresse oxidativo vigente, impedir a propagação do EDHF do endotélio para o músculo liso vascular, através do bloqueio das junções comunicantes (*gap junction*)(113). Dessa forma, encontra-se bem estabelecido que a PKC também é capaz de fosforilar e inativar a conexina-43, principal proteína constituinte da *gap-junction* mio-endotelial vascular (114).

Percebe-se, pois, que a exposição do endotélio a elevada concentração de glicose, permite, através da ativação de várias vias bioquímicas, a formação excessiva de espécies reativas derivadas do oxigênio e concretização de severo estresse oxidativo capaz de romper a homeostase vascular e criar ambiente propício para o desenvolvimento da doença vascular (115). Dessa forma, com a redução da disponibilidade de NO, PGI₂ e EDHF, e aumento da participação dos EDCFs, edificam-se as condições pró-trombóticas e pró-inflamatórias associadas à doença aterosclerótica e às complicações microvasculares que precipitam distúrbios em órgãos alvo, estabelecendo as condições necessárias para o surgimento da nefropatia, da retinopatia e da neuropatia diabética (35,68,80).

Apesar de alguns estudos sugerirem que a exposição das células endoteliais a elevada concentração de glicose apresenta o potencial de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir imediatamente suas reservas anti-oxidantes (65), a maior parte dos estudiosos concorda que, na verdade, o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia, estimularia em um primeiro momento, a síntese de enzimas anti-oxidantes (116). Através da modificação nos processos de síntese protéica que subsistem diante de exposição prolongada das células endoteliais ao estresse oxidativo, poderá ocorrer redução significativa na

expressão destas enzimas anti-oxidantes incapacitando a célula no combate aos ROS formados em situações em que a glicemia se encontre aumentada (117).

Alguns marcadores do estresse oxidativo vascular observado em ambiente hiperglicêmico, como a elevação do malonaldeído e de dienos conjugados, ambos associados à produção de fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) que favorece a migração do músculo liso vascular durante a formação da placa de ateroma, são reduzidos e seus efeitos revertidos após a adição de SOD e GPx, sugerindo que o tratamento com anti-oxidantes seja importante co-adjuvante para reduzir as complicações vasculares do diabetes (65,118).

Conforme mencionado, um rigoroso controle glicêmico em pacientes com diabetes poderia reduzir o risco das complicações cardiovasculares e renais associadas à doença (16,17,49,50,51) e este tem sido o objetivo das recomendações nutricionais e estudos com secretagogos de insulina (repaglinide) (119), sulfoniluréias (16), glitazonas (120) e também, estatinas (108,115,121) orientados para a promoção da melhoria na função endotelial de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM-2). Por outro lado, terapias recentes que visam a reduzir o estresse oxidativo limitando a possibilidade de formação de ROS e eventualmente aumentando as reservas anti-oxidantes, vêm sendo planejadas e executadas em pacientes diabéticos (122).

Nessas experiências, moléculas como a edaravone são utilizadas na tentativa de neutralizar a ação dos ROS (scavenger) e a aumentar a biodisponibilidade de NO e PGI₂ melhorando os prognósticos vasculares da doença (123). Outras drogas, como a ruboxistaurina (124) e aminoguanidina (125) que, respectivamente, impedem a formação da PKC e reações de glicação não-enzimática, prometem, ao lado da suplementação com L-arginina (126), tetrahydrobiopterina (127), agentes redutores como o ácido ascórbico (128), inibidores da aldose reductase (129) ou da enzima conversora da angiotensina (130), ou mesmo através da utilização de desacopladores mitocondriais e terapias que aumentem a produção de SOD (83), atenuar os efeitos vasculares deletérios da hiperglicemia em pacientes diabéticos que tenham a função vascular alterada.

Além dessas estratégias, faz parte da terapia clássica de prevenção e controle do DM, a adoção de hábitos que incluam a prática regular de atividades físicas aeróbicas (132). Este procedimento vem sendo utilizado com o intuito de reduzir o risco de doença cardiovascular em pacientes com diabetes e indivíduos com tolerância diminuída à glicose (133) e se justifica por sua capacidade de aperfeiçoar o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, reduzindo principalmente os níveis de colesterol total e LDL e contribuindo decisivamente para o controle glicêmico (134). Na última década, entretanto, uma nova contribuição terapêutica associada ao treinamento físico vem sendo proposta para explicar seu papel de

proteção vascular. Inúmeros estudos sugerem que o exercício aeróbico crônico possa restabelecer e aperfeiçoar a função vascular, protegendo-a contra os efeitos deletérios associados ao DM e à glicose elevada (135). Mesmo assim, apesar de alguns poucos estudos haverem investigado a participação do treinamento físico sobre órgãos alvo diretamente comprometidos pelo DM, como a circulação renal, nenhum deles havia ainda apurado o papel do exercício dinâmico crônico sobre os efeitos da glicose elevada neste leito vascular.

Tal lacuna no conhecimento foi recentemente preenchida com a demonstração, realizada por nossa equipe de investigadores (136), de que o exercício dinâmico crônico é capaz de proteger a circulação renal contra os efeitos deletérios de concentrações elevadas de glicose, sugerindo que terapias que incluam este tipo de atividade física possam prevenir ou mesmo atenuar o desenvolvimento de uma das principais complicações clínicas associadas ao DM, a nefropatia diabética.

1.3- Nefropatia diabética

A nefropatia diabética acomete cerca de 40% dos pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2 (137) e, além de estar associada a elevada mortalidade cardiovascular (138), é a principal causa de doença renal terminal nos países desenvolvidos (139). Trata-se de complicação típica do DM, tradicionalmente definida pela presença de proteinúria superior a 0,5 g a cada 24 horas, que se manifesta freqüentemente no curso da doença, em grande parte devido à disseminação dos processos inflamatórios que ocorrem no endotélio da circulação renal e também, da sistêmica (140).

Apesar das dificuldades no seu diagnóstico, a nefropatia diabética caracteriza-se por alterações morfológicas e funcionais específicas, que incidem sobre quase todas as estruturas renais (141). Atualmente, a mensuração da excreção urinária de albumina (AUR) é o parâmetro de referência mais utilizado para diagnosticar e estabelecer os estágios da doença que incluem, nefropatia incipiente com microalbuminúria (AUR > 20 µg/min e <199µg/min) e nefropatia clinicamente estabelecida com presença de macroalbuminúria (AUR >200 µg/min) (3).

Nos estágios iniciais da doença, todos os pacientes apresentam aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) e do fluxo sanguíneo renal; porém, sem qualquer alteração histológica associada. Tal estado evolui para hipertrofia glomerular, aumento dos rins, expansão da matriz mesangial e espessamento de membrana basal do glomérulo, resultando em glomerulosclerose (142). Subseqüentemente, verifica-se normalização da TFG, com

elevação associada da pressão intraglomerular e aparecimento de microalbuminúria dentro de 10-15 anos após o surgimento das alterações metabólicas associadas ao DM. Após este estágio pré-clínico de nefropatia incipiente, segue-se declínio da TFG e aterosclerose das arteríolas aferente e eferente, à medida que aumenta a taxa de excreção da albumina (143-146).

Transcorridos cinco anos desde o aparecimento de macroalbuminúria, o declínio da TFG atinge 50% em cerca de 50% dos pacientes e, dentro de mais 3-4 anos, metade desses pacientes terá desenvolvido doença renal terminal (DRT) (3).

Acredita-se que as alterações fisiopatológicas que incidem sobre as estruturas e funções dos rins estejam associadas ao processo inflamatório deflagrado pelo estresse oxidativo, após exposição da circulação renal a níveis elevados de glicose (147,148). De fato, foi recentemente demonstrado o papel de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-18 e TNF- α no desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética (149).

Neste contexto, investigações acerca da etiologia da nefropatia diabética revelaram a existência de alterações micro e macrovasculares, que podem ser observadas de forma localizada na circulação renal, em decorrência do efeito tóxico associado à exposição das estruturas vasculares, incluindo o tecido endotelial, a elevada concentração de glicose (150,151). Dessa forma, o controle rigoroso da glicemia, quando realizado no estágio de microalbuminúria, poderá evitar (ou até reverter) a progressão para falência renal (152).

Estudos clínicos realizados com pacientes DM-2 portadores de nefropatia revelam aumento significativo de marcadores plasmáticos de lesão endotelial e aumento do tônus das arteríolas renais que co-existem com a hipertensão glomerular e a redução do fluxo nos capilares peritubulares (145-148). Vários mediadores da nefropatia diabética encontram-se também associados à lesão da célula endotelial e incluem o fator de crescimento TGF- β (142), a ANG-II (149), a NADPH oxidase (149), a PKC (153), os AGEs (154) entre outros. Todos eles apresentam-se aumentados nas estruturas renais e favorecem o estabelecimento de estresse oxidativo severo que, como explicitado, tem influência altamente deletéria à função deste órgão (142). A hiperglicemia, portanto, é capaz de induzir disfunção endotelial na circulação renal e se encontra diretamente envolvida na fisiopatologia da nefropatia diabética (140,142,154).

Neste contexto, a disfunção endotelial é encontrada em praticamente todos os pacientes portadores de nefropatia, desempenhando importante efeito na evolução e no prognóstico da doença (155,156). Acredita-se que a doença se introduza após a alteração das

propriedades funcionais da célula endotelial, que, no indivíduo diabético, decorre dos distúrbios metabólicos inerentes à doença, e que são capazes de expor todas as estruturas vasculares a elevado grau de estresse oxidativo (155).

Em recente estudo que investigou a função renal de crianças normo-albuminúricas com diabetes mellitus tipo 1 (DM-1), identificou-se claro desequilíbrio entre os EDCFs e EDRFs que resultavam em constrição de arteríolas da circulação renal e elevação da resistência vascular, sugerindo que desajustes hemodinâmicos já estejam presentes desde muito cedo neste órgão, antes mesmo das manifestações clínicas da doença (106). Nesse processo, o estresse oxidativo característico do ambiente vascular hiperglicêmico é capaz de propiciar, à semelhança do que ocorre em outros leitos vasculares, a formação de fenótipo endotelial pró-inflamatório, pró-trombótico e de predomínio vasconstritor, que interfere de forma decisiva no desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética, bem como da doença renal terminal (157).

Nesta linha de raciocínio, Goligorsky et al. (2001) (159) sugerem que a nefropatia diabética inicia-se especificamente com a redução da biodisponibilidade do NO derivado do endotélio. De fato, inúmeras evidências associam o estresse oxidativo e a maior inativação do NO produzido pelo endotélio vascular, com complicações microvasculares e falência de órgãos durante o DM (160,161). Apesar das demonstrações de aumento da expressão da eNOS no córtex renal de animais diabéticos (162), e em biópsias renais de pacientes com DM-2 (163), a disponibilidade e a produção de NO encontram-se diminuídas em ambiente hiperglicêmico, já que existe também, respectivamente, maior inativação pelos ROS e redução da atividade da própria enzima, em geral mediada pela hiper-ativação da PKC e pela ADMA (162,164,165).

De fato, a deficiência de NO pode interferir na evolução desfavorável das doenças renais crônicas (158,166). Por exemplo, ratos diabéticos que se caracterizam por elevada pressão glomerular e proteinúria, com suplementação de L-arginina apresentam melhoria do quadro sintomático renal, além de redução da resposta inflamatória e da fibrose intersticial, esta última, um dos mais sensíveis marcadores de evolução desfavorável das doenças renais e que, em geral, é precedida por inflamação local (167,168).

Em modelos de hipertensão animal com bloqueio da função das isoformas da NOS, foram observadas elevação da pressão arterial sistêmica, queda da filtração glomerular e redução do coeficiente de filtração e do fluxo plasmático renal (169). Essas anomalias normalmente são acompanhadas de elevação da renina plasmática, proteinúria e, em fases mais tardias, esclerose glomerular e encontram-se presentes em modelos animais de falência renal (170). Muitas dessas condições podem ser totais ou parcialmente revertidas pela infusão

com L-arginina (165,167,168), sugerindo que fatores associados ao mecanismo do NO, além de participarem da fisiologia renal normal, podem, em caso de alteração, colaborar para disfunção endotelial neste órgão (171).

A possibilidade de que a disfunção endotelial induzida por hiperglicemia seja elemento central na patogenia da nefropatia diabética é agora suportada por novos trabalhos que mostram que camundongos *knock-out* para eNOS e com diabetes, desenvolvem lesões renais similares às observadas na nefropatia diabética humana, que só podem ser revertidas através do controle glicêmico com insulina (172,173). Nos estágios iniciais do DM experimental, a produção de ânions superóxido no córtex renal é aumentada (174), reduzindo a biodisponibilidade do NO (155,175) e levando à vasoconstrição das arteríolas renais, o que justifica os achados de menor dilatação dependente de endotélio nestes segmentos vasculares (176). Em alguns modelos experimentais de doença renal, metodologias que aumentam a disponibilidade de NO parecem exercer efeito renoprotetor, restabelecendo a hemodinâmica glomerular (177).

Os trabalhos de Zhao et al. (178) e Nakagawa et al., (172) propiciam claras evidências de que a perda da eNOS aumenta a susceptibilidade à doença glomerular no ambiente metabólico do DM e sugerem que as complicações microvasculares associadas à doença, e que ocorrem na circulação renal, sejam também responsáveis pela glomeruloesclerose nodular observada nos estágios avançados da nefropatia (179).

Por outro lado, é provável que a disfunção endotelial possibilite o desacoplamento existente entre o NO e o fator de crescimento vascular derivado de endotélio (VEGF), resultando em potencialização dos efeitos inflamatórios e proliferativos deste último (180). Verificou-se recentemente a formação de novos vasos no glomérulo renal de indivíduos diabéticos com nefropatia, evento que se encontrava correlacionado com maior expressão do VEGF (181).

Desta forma, as alterações metabólicas associadas ao DM, cooperam, em grande parte, através do efeito tóxico da hiperglicemia, para alterações da fisiologia vascular renal, reduzindo a função de seu endotélio vascular e predispondo os rins às complicações clínicas associadas a nefropatia. Uma vez que a toxicidade inerente ao excesso de glicose decorre do estresse oxidativo que se estabelece no ambiente vascular, acredita-se que esta condição seja responsável também, pela redução da biodisponibilidade do NO e outros EDRFs, estabelecendo condição inflamatória localizada que se propaga por todas as estruturas renais (147,148).

A maior atividade da ciclooxigenase endotelial demonstrada, na circulação renal em modelos de falência deste órgão, favorece a produção de prostanóides vasoconstritores como

o TXN, que atraem as células inflamatórias e aumentam a produção de ROS (182). Por outro lado, na doença renal crônica, o estiramento do vaso e a pressão hidrostática aumentada encontram-se associados com a maior produção de ANG-II que, além de vasoconstritor, também pode gerar radicais livres (183).

Em estudo que procurou investigar a participação do estresse oxidativo vascular no desenvolvimento da nefropatia diabética, verificou-se que, apesar da vasoconstrição mediada por inibidor da eNOS na circulação renal ser similar entre pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis, a infusão de L-arginina e vitamina C (agente anti-oxidante) acarretava aumento mais pronunciado da perfusão renal apenas em pacientes com a doença (184). Estes achados são coerentes com os resultados que indicam aumento da expressão da eNOS na circulação renal, em decorrência do estresse hiperglicêmico; porém com redução da biodisponibilidade do NO, quase sempre inativado por ROS diante do estresse oxidativo vigente (99,175,185).

Pode-se inferir com isso, que as complicações renais observadas em pacientes diabéticos decorrem também do desequilíbrio entre EDRFs e EDCFs, causado pelo estresse oxidativo vascular (186,187). Este fenômeno estabelece as condições pró-trombóticas e pró-inflamatórias, necessárias ao início do processo fisiopatológico associado à nefropatia diabética (159) e pode alterar o metabolismo do órgão (188). Estudos recentes demonstraram associação direta entre capacidade anti-oxidante total e a presença de proteinúria, sugerindo que, no curso da doença, a redução da capacidade de inativação dos ROS formados em meio hiperglicêmico, acelere a destruição do glomérulo comprometendo decisivamente a função renal (189).

Evidências recentes sugerem que formação de ROS excede em muito a capacidade de a célula renal se adaptar, produzindo resposta antioxidante. Verificam-se neste sentido, efeitos do estresse oxidativo nos capilares glomerulares, em toda circulação renal e também em diferentes proteínas teciduais, mediante exposição a quantidades excessivas de moléculas de glicose (154). Por exemplo, encontra-se bem estabelecido que a alteração da matriz mesangial durante a nefropatia diabética decorre da formação de ligações cruzadas pelo processo de glicosilação avançada (154) e que essas mesmas células, quando expostas a elevada concentração de glicose por curto período de tempo, apresentam aumento desproporcional da síntese de colágeno mediada por PAI-1 e PKC (190). Da mesma forma, em modelos experimentais de DM-1, verificaram-se, concomitantemente ao estresse oxidativo presente no glomérulo e túbulos renais, profundas modificações na síntese e na atividade de inúmeras proteínas deste órgão, sugerindo que as alterações fisiopatológicas associadas à doença renal possam ser decorrentes das modificações impostas pela ação oxidativa dos ROS sobre a função e expressão de algumas destas proteínas (191).

De fato, inúmeros marcadores de estresse oxidativo foram descritos em pacientes com doença renal crônica (192,193). No rim, as fontes de radicais livres podem incluir o endotélio, as células glomerulares e intersticiais, bem como macrófagos associados à resposta inflamatória (194). Apesar da utilização de terapias que incluam rigoroso controle glicêmico e terapêutica farmacológica que visem à inativação de algumas vias de produção de ROS, a doença renal continua a progredir entre pacientes diabéticos (154). Nesse contexto, alguns investigadores afirmam que a proteção renal contra os efeitos deletérios da hiperglicemia observados durante a nefropatia diabética só poderá ser alcançada a partir de aumento da reserva anti-oxidante das células deste órgão (195). Por exemplo, recentemente, algumas drogas que se mostraram capazes de inibir a NADPH oxidase e mimetizar a ação da SOD, foram descritas como estratégia promissora no tratamento da nefropatia (195). Já foi demonstrada a capacidade de substâncias antioxidantes inibirem a ação dos ROS produzidos pelas células mesangiais, diante de desafio hiperglicêmico e reduzirem significativamente as complicações clínicas associadas à nefropatia diabética (196,197).

1.4- Proteoma na doença renal

Recentemente, Clarkson e colaboradores (198) demonstraram que, pelo menos, 200 genes encontram-se diferencialmente expressos nas células mesangiais, após exposição a ambiente com concentração elevada de glicose. Esse achado, além de identificar a complexidade do desenvolvimento da nefropatia diabética, sugere que o funcionamento das células renais encontra-se significativamente modificado; entretanto, proteínas, e não genes governam as funções celulares (199). Desta forma, alguns investigadores defendem que as investigações sobre os efeitos deletérios da glicose elevada sobre as estruturas renais se concentrem na análise da expressão das proteínas fabricadas pelo tecido nessas condições (199).

Apesar de não identificarem as proteínas alteradas, Ianello e colaboradores (200) demonstraram, com base em modelo experimental de DM, que a síntese de proteínas do córtex renal encontra-se alterada no início da doença e que pode ser modificada agudamente em resposta a simples exposição ao excesso de glicose (200). Da mesma forma, a exposição *in vitro* de células do córtex renal, região que comporta a maior parte dos vasos da circulação renal, à elevada concentração de glicose, determina a formação de estresse oxidativo, capaz de alterar a transcrição de genes do DNA e modificar o padrão de expressão de proteínas, com aumento na produção de colágeno neste órgão (190).

Recentemente, alguns estudos evidenciaram, através de tecnologias mais sofisticadas que permitem a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre tecidos, que o estado diabético pode modificar o padrão de expressão de proteínas renais. Tradicionalmente, tais procedimentos eram realizados por métodos imuno-químicos (201), através da degradação de Edman, que apesar de útil, restringia a análise a um número relativamente pequeno de proteínas, que só poderiam ser estudadas em experimentos individuais e na presença de anticorpos específicos previamente selecionados. Neste contexto, inúmeros estudos da área da nefrologia vêm utilizando análise proteômica, procedimento inovador que sobrepõe as limitações das análises de proteínas baseada na imunologia, para investigar alterações na expressão de proteínas no tecido renal em condições fisiológicas ou associado com a doença renal (202).

Especificamente na área da nefropatia diabética, trata-se de tecnologia extremamente promissora, pois permite a identificação das proteínas que se encontram alteradas no curso da doença, em diferentes regiões e compartimentos do órgão e que possam vislumbrar a natureza molecular da doença renal, provendo novos biomarcadores para essas condições fisiopatológicas (203).

Tipicamente, a análise proteômica inicia-se com a extração de proteínas, seguida de sua separação por eletroforese bidimensional ou por cromatografia líquida e identificação das mesmas por vários tipos de espectrometria de massa (202). Bioinformática é utilizada para obter informações adicionais da proteína e orientar estudos de proteoma funcional. Os resultados da análise proteômica completa propiciam a formulação de novas hipóteses, melhor compreensão da fisiologia normal e dos mecanismos de doença e identificação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novas drogas (204).

Encontra-se bem estabelecido que as modificações histopatológicas típicas da nefropatia diabética são verificadas em decorrência de alterações das funções de inúmeras proteínas que resultam em redução da função renal e conseqüente falência do órgão (205-207). Utilizando abordagem proteômica, Bickel e colaboradores (208) demonstraram, em modelo experimental para DM-2 que utilizou ratos obesos Zucker, que além de rins hipertrofiados, aumento da creatinina plasmática e hipertensão arterial, estes animais apresentavam redução significativa da abundância de proteínas associadas ao transporte de sódio. Especificamente no córtex renal, houve redução de 68% no co-transportador sódio-fosfato, e de 66% no trocador sódio-hidrogênio que, juntamente com outras alterações na medula renal, poderiam contribuir para redução da taxa de filtração glomerular e colaborar no controle da pressão arterial, através da menor absorção de sódio no túbulo proximal (208).

Da mesma forma, através de abordagem proteômica, Kim e colaboradores (209) verificaram que 50 das 900 proteínas identificadas encontravam-se diferencialmente expressas no plasma de animais diabéticos. Entre as proteínas plasmáticas modificadas pelo DM destacava-se redução significativa da isoforma A-1 da apolipoproteína (APO-A1), molécula que, além de principal integrante da fração protéica da molécula de HDL, tem sido implicada na ativação da eNOS.

A análise por eletroforese bidimensional de amostras provenientes de rins de ratos transgênicos diabéticos revelou a existência de 41 proteínas diferencialmente expressas em relação ao grupo controle que incluíam proteases, inibidores de proteases, proteínas associadas a apoptose, reguladores da tolerância oxidativa, proteínas ligantes de cálcio, reguladores de transporte, proteínas de sinalização celular e elementos contráteis do músculo liso (205).

Nas análises dos resultados do estudo anteriormente mencionado, os autores demonstraram igualmente que o DM promove aumento significativo da expressão do inibidor da elastase, reduzindo os níveis de elastase no tecido renal e garantindo aumento igualmente significativo da expressão de elastina neste órgão (205). Tal hipótese foi posteriormente confirmada em camundongos diabéticos e em humanos, por métodos de imuno-histoquímica e pode estar associada com a maior deposição desta proteína no túbulo renal de pacientes com DM-1 (210).

Da mesma forma, a calbidina D-28k, proteína ligante de Ca^{++} , dependente de vitamina D, e com importante papel na reabsorção de Ca^{++} nos túbulos renais (211), apresenta aumento significativo de sua expressão em animais diabéticos, podendo representar importante mecanismo compensatório para sobreposição da hipercalcúria associada à doença (212). De fato, o DM-1 encontra-se freqüentemente associado com alterações na homeostase do Ca^{++} , caracterizadas por hipercalcúria e redução dos níveis plasmáticos de 1,25-dihidroxi-vitamina D3 e osteopenia (213).

Mais recentemente, Hwang e colaboradores (214), em abordagem proteômica que comparou amostras do córtex e da medula renal de ratos normoglicêmicos e com DM induzida por estreptozotocina (STZ), verificou a existência de um conjunto de proteínas diferencialmente expressas entre os dois grupos (214). Após a indução de DM, houve redução significativa da expressão da aldeído reductase, envolvida com a via dos polióis que metaboliza os intermediários dos compostos dicarbonil, metilglioxal e 3-deoxiglicosona e de proteínas de choque térmico, responsáveis pela preservação da função de proteínas celulares, como a eNOS, além de aumento da expressão de proteínas envolvidas na apoptose mitocondrial (215).

Parece evidente que a hiperglicemia tem o potencial de alterar significativamente a expressão de proteínas renais, comprometendo a fisiologia normal deste órgão. Uma vez que os excessos de glicose encontram-se concentrados no sangue e, portanto, em contato direto com as estruturas vasculares, é razoável especular que o estresse oxidativo a ele associado possa alterar também o padrão de expressão das proteínas endoteliais, criando ambiente pró-inflamatório compatível com o aparecimento da doença renal. Especificamente, é capaz de alterar o funcionamento do endotélio vascular da circulação renal, cuja disfunção é apontada por inúmeros investigadores, como agente etiológico da nefropatia diabética.

1.5- Circulação renal

Uma vez que a disfunção do endotélio vascular renal apresenta associação direta com a patogenia da nefropatia diabética (216), modelos clínicos e experimentais de DM vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos para demonstrar os efeitos adversos da doença sobre a circulação renal (186,187,217,218). A maior parte dos resultados demonstra que a vasodilatação dependente de endotélio em vasos isolados da circulação renal encontra-se diminuída em animais com DM induzida por aloxano (219) ou STZ (220), principalmente devido à menor biodisponibilidade de NO (221).

Utilizando o modelo de rim isolado e perfundido, capaz de investigar a função vascular renal como um todo, incluindo a macro e a microcirculação renal, Costa e Forti & Fonteles (219) constataram a presença de disfunção endotelial na circulação renal de animais com DM. Este modelo experimental, classicamente utilizado para investigação da reatividade vascular renal em condições fisiológicas e também em diferentes condições fisiopatológicas (222), permite o controle preciso de variáveis hemodinâmicas regionais como a pressão de perfusão, a intensidade do fluxo, bem como a eliminação das influências neuro-humorais e das células sanguíneas sobre a função vascular renal (217).

Modelos experimentais que utilizaram animais diabéticos demonstraram que a disfunção endotelial na circulação renal mediada pelo DM decorre do estresse oxidativo associado às complicações metabólicas da doença, mas foram incapazes de isolar a participação de agentes etiológicos específicos. Nesse contexto, hiperglicemia, além de outras alterações metabólicas associadas ao DM, são capazes de estabelecer estresse oxidativo vascular e contribuir para o desenvolvimento de complicações renais.

Apesar de muitos estudos demonstrarem o efeito deletério da glicose elevada em cultura de células endoteliais renais e em alguns segmentos vasculares deste órgão, nenhum

deles havia investigado este efeito na circulação renal como um todo. Neste sentido, a fim de isolar os efeitos adversos da glicose elevada, Afonso e colaboradores demonstraram, utilizando o já mencionado modelo de rim isolado e perfundido, que, mesmo em coelhos sem diabetes, a exposição aguda da circulação renal a elevada concentração de glicose (15mM) é capaz de induzir redução significativa da vasodilatação renal dependente de endotélio (217). Nessas condições experimentais, a função endotelial não era influenciada por outros fatores de risco presentes em estudos com humanos, como dislipidemia e hipertensão permitindo, portanto, a investigação isolada dos efeitos vasculares agudos da glicose elevada sobre o endotélio normal.

Estes resultados sugerem que níveis de glicose apenas moderadamente elevados, compatíveis, segundo o estabelecido por Afonso e colaboradores, com a média da glicemia pós-prandial de pacientes com DM-2 em tratamento ambulatorial, já seria capaz de induzir dano endotelial agudo e direto na circulação renal, efeito que se mostrava independente das demais complicações metabólicas associadas à doença (217). Neste contexto, as alterações no metabolismo da glicose, que conduzem a hiperglicemia pós-prandial, permitem a exposição do endotélio vascular a intermitentes lesões repetitivas concretizando a médio-prazo, condição fisiopatológica caracterizada por disfunção vascular crônica.

Parece, portanto, que a manutenção da fisiologia da circulação renal em indivíduos diabéticos, prevenindo a doença renal que habitualmente os aflige, depende, em grande parte, da integridade endotelial (186,187). Sob esse enfoque, metodologias capazes de proteger a circulação renal contra os efeitos deletérios da hiperglicemia são extremamente relevantes, na medida em que podem interferir na instalação do quadro de falência renal, característico do diabético.

Conforme mencionado, uma vez que a intolerância à glicose pode existir antes mesmo do diagnóstico da doença, parece razoável admitir que a disfunção endotelial e, portanto, o início das complicações vasculares comece bem antes da adoção de qualquer tipo de medida terapêutica.

Também no caso da doença renal terminal, que evolui após a micro e macro albuminúria, os desafios glicêmicos impostos anteriormente ao diagnóstico da doença e associados ao estilo de vida pregresso do paciente, podem contribuir para a disfunção vascular e justificam a adoção de medidas preventivas em indivíduos com risco de desenvolver a doença.

Neste contexto, encontra-se bem estabelecido que o treinamento físico é capaz de restabelecer e aperfeiçoar a função vascular, protegendo-a contra os efeitos deletérios

associados ao DM e à glicose elevada em diferentes leitos vasculares (223,224,225). Uma vez que a patogenia da nefropatia diabética encontra-se associada à disfunção endotelial na circulação renal, as adaptações associadas ao exercício dinâmico crônico, constituem intervenções potenciais para a prevenção das alterações da reatividade vascular associada à hiperglicemia e desenvolvimento da nefropatia diabética.

1.6- Exercício Físico

Encontra-se bem evidenciado que o exercício dinâmico crônico é capaz de aperfeiçoar a reatividade vascular em vários níveis do sistema circulatório, desde grandes vasos de condução, até a microcirculação de diferentes leitos vasculares (226-230). Neste contexto, os efeitos vasculares adaptativos do treinamento físico encontram-se predominantemente descritos em tecidos, como o músculo esquelético e cardíaco, eis que existe aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício dinâmico agudo nestas áreas (231). Nessa situação, o débito cardíaco é redistribuído, promovendo aumento da oferta de sangue para os músculos ativos, incluindo o miocárdio e redução da perfusão das circulações renal e esplâncnica (232). Apesar de este acontecimento representar proeminente desafio fisiológico para os mecanismos de controle do sistema cardiovascular, ele representa também, o necessário estímulo para promoção de respostas vasculares adaptativas em longo prazo. Assim, quando repetidas inúmeras vezes, as modificações no fluxo sanguíneo induzem adaptações estruturais e funcionais, já bem caracterizadas nos leitos vasculares coronários (233), pulmonares (234) e do músculo esquelético (235).

Entre as inúmeras adaptações induzidas pelo treinamento físico no sistema circulatório, destaca-se o aumento da disponibilidade de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio que, conforme discutido anteriormente, apresentam propriedades vaso-protetoras e, portanto, podem impedir o exórdio e a progressão da doença vascular (231,236,237). De fato, vários estudos já demonstraram que o exercício dinâmico crônico altera a função endotelial (238), melhorando os mecanismos de vasodilatação mediados por NO (236,239), EDHF (237,240) e prostanoídes vasoativos (231), principalmente em vasos de resistência dos leitos vasculares do músculo esquelético e cardíaco (241,242).

Neste sentido, considera-se que o exercício dinâmico crônico, de intensidade moderada, apresente efeitos benéficos nas doenças vasculares que envolvem disfunção endotelial (178,179,318), incluindo DM (180), provavelmente através de aumento da liberação de NO (181,182). Destarte, metodologias que incluem o exercício dinâmico crônico têm apresentado efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, envolvendo a disfunção

endotelial (227,243-245). Nesta linha de pensamento, acredita-se que o maior estresse de cisalhamento vascular, associado às sessões agudas de exercício físico, essencialmente determinado pela velocidade do fluxo sanguíneo, represente o principal estímulo para as adaptações vasculares induzidas pelo exercício dinâmico crônico (246,247).

De fato, a exposição das paredes do vaso ao *shear stress* imposto pelas modificações hemodinâmicas associadas ao exercício parece essencial para provocar modificações no citoesqueleto e desencadear sinalização intracelular que aumente a liberação dos EDRFs e modifique o padrão de expressão de proteínas anti-oxidantes que asseguram a manutenção da fisiologia vascular (247,248,249,250). Recentemente verificou-se que o *shear stress* vascular afeta a expressão de 3000 genes nas células endoteliais (251,252) e ativa o fator de transcrição Nrf2, capaz de regular positivamente a expressão de vários genes de proteínas antioxidantes (253,254). É interessante assinalar que o efeito do *shear stress* vascular no aumento das reservas antioxidantes endoteliais depende da formação de ROS e do estresse oxidativo a ele associado, que, ao modificar o estado redox da célula, é capaz de ativar o Nrf2 (254).

Diversos mecanismos são sugeridos para explicar a transdução de sinal mediada por fluxo na célula endotelial e incluem mecano-receptores de superfície, canais iônicos sensíveis ao fluxo e interação com moléculas vasoativas carregadas de células adjacentes (251). Mais recentemente, conforme proposto por Busse e Fleming (1998) (249), demonstrou-se que o processo é mediado pela ativação de integrinas, proteína G e cascatas de proteínas cinases. Neste processo, a isoforma constitutiva da eNOS pode ser ativada pelo *shear stress*, envolvendo mecanismos de redistribuição do citoesqueleto nos cavéolos (255) que também contribuem para o aumento da captação de L-arginina (256). Alternativamente, a regulação positiva da proteína envolvida na comunicação intercelular mio-endotelial, conexina 43 e a conseqüente propagação da onda de hiperpolarização da célula endotelial para o músculo liso vascular, pode ser o resultado da maior liberação de EDHF induzida por estresse de cisalhamento (257).

Assim, a elevação do fluxo sanguíneo durante o estímulo agudo, associado a uma sessão de treinamento aeróbio, representaria a força necessária para, se imposto regularmente, depois de 8 a 12 semanas, aperfeiçoar a função endotelial e contribuir para prevenção da doença vascular. Alguns estudos sugerem inclusive que a ausência desses estímulos, importante característica do sedentarismo, predisponha o sistema vascular a condições fisiopatológicas como a aterosclerose (258-261). Na mesma orientação teórico-prática, há muito tempo, identificou-se que áreas vasculares expostas ao baixo *shear stress*, causados por reduzido fluxo laminar e/ou padrões de fluxo recirculatório existentes em bifurcações vasculares, apresentam maior tendência para formação de lesões ateroscleróticas, o que

comprova a importância da velocidade do fluxo para manter a liberação basal das substâncias vasodilatadoras (247, 262, 263).

Com papel fundamental na homeostase corporal, os rins sofrem modificações dramáticas em seu padrão de fluxo sanguíneo durante o exercício (232) e, por se encontrarem envolvidos no curso de doenças como a hipertensão arterial primária (158) e diabetes (159), deveriam despertar o interesse da comunidade científica para investigação dos eventuais efeitos do exercício aeróbio crônico sobre sua circulação.

Apesar de poucos estudos focalizarem suas investigações em circulações viscerais, como a do rim, existem inúmeras evidências de que o exercício físico é capaz de alterar agudamente a fisiologia renal (264). Abundantes relatos, predominantemente verificados após exercícios físicos de alta intensidade, indicam a existência de elevado grau de estresse oxidativo neste órgão (265). A alta taxa de degradação de moléculas de ATP, diretamente associadas à grande exigência do processo de contração muscular, contribui para a produção de ROS no tecido músculo esquelético e lesão direta da membrana de suas células, liberando moléculas de mioglobina no sangue que precipitam resposta inflamatória glomerular e, algumas vezes, falência renal aguda. Alternativamente, na circulação renal, em que o fluxo de sangue na realidade, diminui durante o exercício (266,267), poderá haver episódios de isquemia relativa, seguida de reperfusão que se estabelece no pós-exercício. Episódios de isquemia e reperfusão vascular têm sido frequentemente vinculados à produção excessiva de ROS e já foram descritos na transição esforço-recuperação em órgãos como intestino e fígado (268-270).

No entanto, em exercícios de intensidade moderada, a elevação modesta dos níveis de ROS durante o exercício agudo, vem sendo vinculada ao aumento adaptativo das reservas antioxidantes (63,271,272). Nesta linha de raciocínio, o treinamento físico regular seria capaz de induzir a síntese de defesas antioxidantes vasculares que se contrapõem à ação dos ROS produzidos durante cada uma das sessões de exercício físico (63,272,273). Este fenômeno adaptativo se assemelha às respostas biológicas favoráveis à exposição a pequenas quantidades de moléculas tóxicas, que, quando presentes em níveis mais elevados, seriam capazes de destruir a própria célula. Tal fenômeno é conhecido como *hormese* e poderia acontecer na circulação renal, após período de treinamento físico (274).

A escassez de estudos sobre os efeitos do treinamento físico sobre a circulação renal decorre do paradigma vigente de que o estresse de cisalhamento neste leito vascular diminui durante o exercício e, portanto, não existam estímulos para promoção de adaptações vasculares. Na realidade, mesmo que o fluxo sanguíneo renal seja diminuído, considerando-se que o débito cardíaco e a pressão aórtica encontram-se elevadas e que existe vasoconstrição

das artérias renais durante o exercício agudo, a velocidade do fluxo provavelmente será aumentada, ao invés de reduzida (278). Por ser a velocidade do fluxo, e não sua quantidade, que determina o estresse de cisalhamento vascular, há boas chances de que os efeitos vasculares adaptativos verificados em outros leitos vasculares também existam na circulação renal.

Historicamente, estudos indicam que o treinamento físico é capaz de aperfeiçoar a reatividade vascular na circulação renal. Armstrong e Laughlin (266), utilizando microesferas radiomarcadas, já haviam demonstrado que o fluxo de sangue para a maior parte dos órgãos esplâncnicos e para os rins durante o exercício agudo é mantido em níveis mais elevados em ratos treinados, quando comparados com animais sedentários. Estes resultados foram confirmados por Di Carlo e Bishop (267), que demonstraram menor aumento na resistência vascular nas artérias mesentérica e renal, durante o exercício agudo em animais treinados, resultante de menor redução do fluxo de sangue para estes leitos vasculares (267).

Conforme revisto por McAllister (279), este fenômeno poderia ser atribuído à menor atividade do sistema nervoso simpático para a mesma intensidade absoluta de exercício ou alternativamente de modificações da sinalização na célula endotelial.

A menor resposta de vasconstrição renal durante o exercício agudo no estado treinado também foi investigada em preparações de vasos de condução isolados do corpo do animal. Neste contexto, a redução da resposta contrátil induzida por noradrenalina na artéria renal isolada observado após o exercício aeróbico crônico em porcos parece ser completamente abolida após a remoção do endotélio (279), indicando a importância dos mecanismos associados ao endotélio para o aperfeiçoamento da reatividade vascular após o treinamento físico.

Mais recentemente, utilizando o modelo experimental de rim isolado e perfundido, que envolve tanto a macro como a microcirculação deste órgão, De Moraes e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que o treinamento físico é capaz de alterar a reatividade vascular da circulação renal de coelhos, potencializando a vasodilatação dependente e independente de endotélio (280). No estudo em tela, a potencialização da vasodilatação dependente de endotélio induzida pelo exercício aeróbico crônico parecia ser inteiramente dependente de NO, uma vez que o efeito do treinamento físico neste leito vascular era completamente abolido na presença de inibidor da síntese de NO (280). Esses resultados podem explicar, pelo menos em parte, porque o fluxo sanguíneo renal durante o exercício agudo de mesma intensidade absoluta é maior após período de treinamento, conforme observado em ratos e coelhos (266,267).

Depreende-se do exposto, que além da maior disponibilidade de NO, o músculo liso vascular da circulação renal, após o treinamento físico, tornou-se mais responsivo ao NO, sugerindo que as adaptações crônicas possam contribuir para a preservação da função renal durante o exercício agudo e conferir efeito renoprotetor em doenças em que a função renal se encontre comprometida.

Este efeito poderá ser clinicamente relevante já que, conforme sugerido, vários processos fisiopatológicos renais resultantes da nefropatia associada a hipercolesterolemia (281), hipertensão (26) e diabetes (159) têm sido associados com a disfunção do endotélio vascular renal.

Os mecanismos responsáveis pelas adaptações vasculares renais, verificadas após o exercício crônico ainda não foram investigados, mas devem ser consequência da repetição sucessiva de estímulos de aumento do estresse de cisalhamento vascular, que ocorre durante o exercício agudo. Estímulos dessa natureza, quando aplicados repetidamente ao longo do tempo, têm sido associados não apenas com a regulação positiva da eNOS mas também, com a regulação negativa da ET-1 (247,282), favorecendo o aperfeiçoamento da responsividade vascular, observada após a realização de programas de exercício aeróbico crônico. Além disso, a hiperemia renal, que ocorre imediatamente após o exercício, encontra-se associada à regulação positiva do sistema de enzimas anti-oxidantes - que inativa os ROS vasculares e, conseqüentemente, previne sua interação com o NO e portanto, pode promover aumento da biodisponibilidade deste gás (283,284).

Recentemente dois estudos demonstraram que o exercício agudo de alta intensidade induz: i) aumento da expressão de ET-1 mRNA no rim do rato (285); ii) redução dos níveis renais de produtos do metabolismo do NO, como nitrito e nitrato; iii) redução da expressão de eNOS mRNA (286). Neste caso, os investigadores assumem, apesar de não mensurarem diretamente, que os baixos níveis de estresse de cisalhamento no leito vascular renal durante o exercício agudo, possam resultar em regulação negativa da eNOS e conseqüente redução da produção de NO no rim do rato, com conseqüente aumento da expressão e liberação de ET-1 diretamente envolvido na produção aguda de ROS (286).

Entretanto, uma interpretação alternativa para esses achados deve ser considerada. Considerando o padrão de expressão da eNOS, regulada não apenas no nível transcripcional mas também, pós-transcripcionalmente (287), é possível que as interações complexas entre diferentes mediadores endógenos liberados durante o exercício agudo constitua o estímulo para inúmeras adaptações crônicas.

O exercício de alta intensidade, utilizado no referido estudo de Miyauchi e

colaboradores (286), provoca a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (288). É instigante assinalar que a TNF- α induz a regulação negativa da eNOS que resulta da desestabilização do eNOS RNAm, sem efeito na transcrição (289,290). Além disso, a liberação de TNF- α pode promover aumentos da ET-1 (291). Dessa forma, a redução da expressão e atividade da eNOS renal e a regulação positiva de ET-1 podem ser específicos para a alta intensidade de exercício. Uma vez que ET-1 pode cronicamente regular positivamente a eNOS (292), é razoável especular que a exposição a estímulos vasconstritores provoque adaptação fisiológica na circulação renal, favorecendo a vasodilatação e preservando a perfusão renal durante o exercício agudo. Alternativamente, o aumento da produção de ROS associado aos processos de isquemia e reperfusão ou à liberação de citocinas inflamatórias, presentes em cada sessão aguda de exercício físico, seria capaz de estimular, a longo prazo, após período de treinamento físico, a síntese de proteínas antioxidantes que neutralizem precocemente a ação dos ROS, aumentando a biodisponibilidade do NO.

Foi recentemente demonstrado que o exercício agudo tem o potencial de promover apoptose nas células do túbulo distal e do duto coletor do rim de ratos e aumentar a peroxidação lipídica neste órgão. Esse processo, diretamente associado ao estresse oxidativo, seria induzido pela ativação de receptores de ANG II que apresentam expressão aumentada após estímulos agudos de exercício físico e são capazes de aumentar a produção de ROS (270,293,294). Até então, a apoptose nas células tubulares só havia sido bem documentada na falência renal aguda isquêmica (associada com redução do fluxo renal, hipóxia e depleção de ATP) e em intoxicações com certas drogas como doxorubicina e cisplatina (295-297). Através da redução da expressão de receptores de angiotensina no rim de ratos treinados, efeito já observado na célula endotelial vascular, o treinamento físico reduziu a peroxidação lipídica e apoptose neste órgão, demonstrando redução do estresse oxidativo, que possibilita aumentos na biodisponibilidade de NO (295,298). Efeito adaptativo semelhante foi relatado no fígado, em que, à semelhança dos rins, o fluxo de sangue diminuiu durante o exercício agudo (299).

Nesta linha de raciocínio, Podhorska-Okolów e colaboradores (2006) demonstraram que o potencial do exercício crônico em reduzir o estresse oxidativo sobre os túbulos renais, encontrava-se associado ao aumento significativo da expressão da proteína citoprotetora, metalotioneína (300). Da mesma forma, foi igualmente evidenciado, que o exercício de intensidade moderada é capaz de reduzir o estresse oxidativo renal (135) e atenuar a disfunção endotelial observada na circulação mesentérica de animais diabéticos (301).

Apesar do relevante papel do estresse de cisalhamento vascular nas adaptações da circulação renal verificadas após o treinamento físico, outros mecanismos podem estar

envolvidos. Constatou-se que quatro semanas de treinamento em bicicleta ergométrica aumenta a hiperemia reativa do fluxo sanguíneo no antebraço de indivíduos saudáveis (302), um leito vascular que não pertence ao músculo ativo durante esta atividade. Além disso, o treinamento com exercícios físicos, realizados em porcos fêmeas, aumenta o relaxamento dependente de endotélio da artéria braquial, mas não da femoral, o que constitui resultado inesperado para animais quadrúpedes (303) e ressalta a possibilidade de que outros estímulos além do estresse de cisalhamento também estejam envolvidos no efeito adaptativo vascular mediado pelo treinamento físico.

Assim, à semelhança do que ocorre nos leitos vasculares do músculo esquelético, cardíaco e pulmonar, o exercício dinâmico crônico é capaz de promover adaptações positivas que melhoram a reatividade vascular da circulação renal e podem influenciar na prevenção de processos fisiopatológicos, que se iniciem nos rins a partir da lesão do tecido endotelial, como é o caso da nefropatia diabética.

1.7- Efeito protetor do exercício sobre a glicose elevada

Encontra-se bem estabelecido que o exercício dinâmico crônico melhora o controle metabólico em indivíduos diabéticos e com síndrome metabólica (304,305). Recentemente, inúmeros estudos evidenciaram que o treinamento físico é capaz de preservar a função do endotélio vascular frente ao desafio hiperglicêmico, conservando a resposta de vasodilatação dependente de endotélio que como ressaltado, é significativamente atenuada nestas condições.

Além dos efeitos já descritos sobre a enzima eNOS (236,306), o treinamento físico é capaz de elevar, na célula endotelial, a expressão e atividade de enzimas anti-oxidantes (253,268) resultando, respectivamente, em aumento da síntese e redução da inativação do NO (141). Uma vez que as alterações provocadas pela hiperglicemia na função endotelial se encontram, conforme discutido anteriormente, relacionadas com o estresse oxidativo vascular (307,308), é razoável especular que o treinamento físico seja capaz de exercer papel protetor contra os efeitos tóxicos da glicose elevada. Nessa linha de raciocínio, a proteção vascular mediada pelo treinamento físico frente ao desafio hiperglicêmico inclui aumento da biodisponibilidade de NO e alteração de outros mediadores como a prostaciclina e o EDHF (158,159).

Desta forma, seria razoável especular que o aumento da capacidade de vasodilatação renal induzida pelo treinamento físico e descrita no estudo de De Moraes e colaboradores (280), pudesse igualmente existir diante da presença de elevada concentração de glicose, o que representaria, adicionalmente aos já conhecidos efeitos do exercício sobre o controle

metabólico, um efeito protetor direto do exercício físico sobre a circulação renal (280).

Neste contexto, recentemente o mesmo grupo demonstrou, utilizando idêntico modelo experimental do rim isolado e perfundido, que o treinamento físico de 45 minutos de corrida de intensidade moderada, cinco vezes por semana, por 12 semanas pode provocar efeito protetor sobre a disfunção endotelial na circulação renal de coelhos não-diabéticos, observada após a exposição aguda à concentração elevada de glicose correspondente à hiperglicemia pós-prandial de pacientes DM-2 (136). Com isso, no modelo experimental do rim isolado e perfundido de coelho, a maior reserva de vasodilatação renal determinada pelo exercício físico assegura a proteção renal aos efeitos deletérios dos picos glicêmicos (136).

Estes resultados podem trazer à luz evidência da ação protetora do treinamento físico sobre os efeitos deletérios da glicose elevada na circulação renal, com implicações clínicas em potencial. Se as adaptações vasculares renais demonstradas no presente estudo também ocorrerem em indivíduos diabéticos e com síndrome metabólica, elas poderão representar outro mecanismo adicional aos efeitos benéficos gerais do treinamento físico. Estudos prospectivos clínicos deverão ser elaborados para especificamente solucionar esta questão, já que terapias que incluam a realização da prática regular de atividades físicas poderão ser utilizadas, juntamente com agentes farmacológicos para reduzir complicações clínicas de doenças, como a nefropatia diabética.

Por outro lado, a identificação dos mecanismos associados ao efeito protetor do exercício físico sobre a circulação renal deverá ser elucidada, com o propósito de permitir o desenvolvimento de intervenções terapêuticas, coerentes com as respostas adaptativas criadas nos tecidos deste órgão após o período de treinamento. Especificamente, permitiria a identificação de marcadores de proteção renal que poderiam ser ativados através de metodologias de treinamento físico ou mesmo, através de ação farmacológica após o desenvolvimento de drogas que reprimissem ou estimulassem a expressão de proteínas alvo envolvidas nos efeitos adaptativos do exercício físico.

Conforme mencionado, a identificação de proteínas diferencialmente expressas em tecidos submetidos a diferentes tratamentos pode ser adequadamente investigada através de abordagem proteômica, incluindo eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Tal procedimento, também conhecido como proteômica funcional, poderia revelar vários mecanismos potencialmente envolvidos nos efeitos adaptativos do exercício físico sobre a circulação renal.

Como referido, o treinamento físico é capaz de aumentar a resposta de vasodilatação dependente e independente de endotélio na circulação renal de coelhos não diabéticos e

proteger este leito vascular dos efeitos deletérios associados à elevada concentração de glicose. A adoção de abordagem proteômica, amplamente utilizada na investigação dos mecanismos associados à nefropatia diabética permitiria também, desvendar os principais mecanismos relacionados ao efeito protetor do exercício físico sobre a toxicidade da glicose elevada.

Considerando que a glicose elevada é capaz de reduzir a resposta de vasodilatação dependente de endotélio na circulação renal de coelhos não diabéticos e que o exercício aeróbico crônico é capaz de aumentar a resposta de relaxamento dependente e independente de endotélio, além de proteger a circulação renal contra os efeitos deletérios da glicose elevada, é razoável especular que estes efeitos decorram da modificação sistemática na expressão de proteínas neste órgão, verificada após o tratamento com glicose ou com exercício físico.

Apesar de existirem hipóteses plausíveis para investigação dos mecanismos associados aos efeitos deletérios da glicose elevada, e que envolvem a ativação de enzimas como aldose reductase, PKC, NADPH oxidase entre outras, a disponibilidade da tecnologia proteômica permite a caracterização de um grande número de proteínas, diferencialmente expressas no tecido renal diante das diferentes formas de tratamento. A partir da identificação deste perfil de proteínas diferencialmente expressas, dezenas de novas hipóteses poderão ser geradas em relação aos efeitos renais da glicose e do exercício físico.

Apesar de muitos estudos investigarem através de tecnologia proteômica, os mecanismos da nefropatia diabética no córtex renal, área que engloba a maior parte de vasos da circulação deste órgão, nenhum até o presente momento investigou os mecanismos associados aos efeitos deletérios agudamente induzidos por elevada concentração de glicose.

Por outro lado, não obstante a tecnologia proteômica já ter sido utilizada para investigar os mecanismos associados aos efeitos adaptativos do exercício físico no músculo cardíaco, esquelético e até mesmo no cérebro, ainda persistem lacunas no conhecimento desses efeitos sobre os rins. Uma vez que já demonstramos que o exercício crônico é capaz de proteger a circulação renal contra os efeitos deletérios da glicose elevada, é razoável especular que os mecanismos envolvidos nesta resposta adaptativa do treinamento físico também estejam associados a modificações crônicas na expressão de proteínas no córtex renal.

A identificação de mecanismos de proteção induzidos pelo treinamento físico no córtex renal ou dos efeitos deletérios associados à glicose elevada, além de preencher importante lacuna no conhecimento, permitirá que novas drogas sejam desenvolvidas tendo

como alvo, as proteínas identificadas e diferencialmente expressas no tecido renal em função das diferentes formas de tratamento.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

A demonstração farmacológica de que o treinamento físico é capaz de aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico na circulação renal de coelhos e proteger este leito vascular contra a ação deletéria e aguda da glicose elevada, pode ser o resultado de importante processo adaptativo associado a alterações na expressão e atividade de proteínas presentes nos rins destes animais.

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar as modificações no padrão de expressão de proteínas no córtex renal de coelhos, induzida pelo exercício dinâmico crônico e pela glicose elevada, através da utilização de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Como os efeitos deletérios da glicose elevada e adaptativo do treinamento físico foram originalmente observados na circulação renal, a região do córtex foi preferencialmente selecionada para estudo por conter cerca de 90% da circulação deste órgão.

2.2- Objetivos Específicos

Especificamente este trabalho pretende elucidar os mecanismos associados ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico na circulação renal de coelhos treinados bem como identificar no córtex renal destes animais, os dispositivos intracelulares que conferiram proteção deste leito vascular contra os efeitos agudos deletérios da glicose elevada.

Este estudo se propõem também, a padronizar os procedimentos de extração de proteínas do córtex renal de coelho e estabelecer protocolo mais adequado de separação das mesmas através de eletroforese bidimensional á fim de possibilitar a visualização de abundante quantidade de proteínas.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para que nossos objetivos fossem alcançados, foi estabelecido cronograma de atividades que incluiu a realização de vários experimentos-piloto capazes de definir as condições ideais de lise celular e extração de proteínas no córtex renal de coelhos. Tais resultados permitiram também, o ajuste de técnicas proteômicas de separação e quantificação de proteínas delimitando a faixa de focalização isoeletrica, a concentração da acrilamida no gel e a técnica mais apropriada para detecção das proteínas após a eletroforese bidimensional. Este processo culminou na realização de dois experimentos principais (experimento 1 e experimento 2; vide diagrama explicativo no anexo 1) cuja metodologia se encontra descrita á seguir.

3.1- Animais de experimentação

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo número P-0214-04) e são consistentes com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Publicação do National Institute of Health (EUA) No. 85-23, revisado em 1996). Para alcançar os objetivos, realizamos pesquisa experimental, envolvendo treinamento físico de coelhos Nova Zelândia (não-diabéticos) de ambos os sexos, pesando entre 2,0 e 2,5Kg, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Durante o período das observações e procedimentos, os animais de ambos os grupos experimentais foram alojados em condições controladas de luz (ciclo 12/12 claro-escuro) e temperatura (22+/- 1°C), com livre acesso à água e ração de coelhos.

3.2- Protocolo de Treinamento

3.2.1- Experimento 1

Os coelhos foram randomicamente alocados em dois grupos: i) coelhos submetidos a programa de treinamento físico (T0; n=8); e coelhos sedentários (S0; n=8) mantidos confinados em suas gaiolas pelo mesmo período de tempo. O treinamento físico foi executado em esteira motorizada (Universidade de São Carlos, São Paulo, Brasil) de baixa velocidade e

consistiu de 60 minutos de corridas realizadas cinco vezes por semana a 18m/min, sem inclinação.

3.2.2- Experimento 2

Os coelhos (n=90) foram randomicamente distribuídos em seis grupos: i) coelhos submetidos a programa de treinamento físico, que tiveram a circulação renal tratada *ex-vivo* através de perfusão durante 3 horas com concentração normal (5mM;n=15) (TN) ou elevada de glicose (50mM;n=15) (TH); ii) coelhos sedentários, mantidos confinados em suas gaiolas durante o mesmo período de tempo, com a circulação renal tratada *ex-vivo* através de perfusão durante 3 horas com concentração normal (5mM;n=15) (SN) ou elevada de glicose (50mM) (SH;n=15). Adicionalmente, a fim de verificar o efeito isolado do treinamento físico, foram criados dois novos grupos que excluía o tratamento da circulação renal com glicose: a) coelhos submetidos a programa de treinamento físico (T0;n=15) ou mantidos confinados em suas gaiolas (S0;n=15) pelo mesmo período de tempo. O treinamento físico foi executado em esteira motorizada (Universidade de São Carlos, São Paulo, Brasil) de baixa velocidade e consistiu de 60 minutos de corridas realizadas cinco vezes por semana a 18m/min, sem inclinação.

3.3- Preparação das amostras

3.3.1- Experimentos 1 e 2

Após o período de 12 semanas, todos os grupos de animais foram preparados para a cirurgia, realizada após anestesia com pentobarbital sódico (40mg/Kg) administrado através da veia marginal da orelha e administração em bolus de heparina (500IU/Kg). Os animais foram então submetidos a laparotomia mediana: uma vez isolados os rins, canulou-se artéria e veia renal com cateteres de polietileno (Pharmacia Biotech, diâmetro externo 1,8mm, diâmetro interno 1,1mm). Todos os rins foram imediatamente perfundidos com solução de Krebs-Henseleit (50ml), para remover os elementos do sangue. Os rins dos grupos T0 e S0 foram diretamente encaminhados para os procedimentos de extração de proteínas enquanto que os demais foram antes, transferidos para uma placa de Petri umidificada e perfundidos novamente em sistema não-recirculatório com fluxo constante, definido por bomba peristáltica a uma velocidade de 3.0 ml/min, com solução aquecida (37° C) de Krebs-Henseleit aerada com carbogênio (95% O₂ / 5% CO₂). O sistema de perfusão renal foi

conectado a um transdutor de pressão e as modificações na pressão de perfusão foram continuamente monitoradas com um sistema de pré-amplificação e registro em polígrafo. A composição da solução de Krebs-Henseleit (em mM) : 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO₄, 2.5 CaCl₂·6H₂O, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, (pH 7.4) envolveu duas possíveis concentrações de glicose: 5mM ou 50mM.

3.4- Extração das proteínas do cortex renal dos coelhos

3.4.1- Experimento 1

Rins provenientes de animais sedentários (S;n=8) e treinados (T;n=8), foram isolados e artéria e veia renal canuladas com cateter de polietileno e lavadas imediatamente com 50ml de solução de Krebs-Hanseleit para remoção dos elementos do sangue. Os rins foram então removidos do corpo do animal, a cápsula renal removida e o córtex renal, que contém cerca de 90% da circulação renal, foi separado da medula, cortado em pequenos pedaços com bisturi, e lavado em solução salina. Os pedaços de córtex renal foram então congelados em nitrogênio líquido, pulverizados com pistilo de porcelana e pesados para o armazenamento de 300mg, por amostra, em tubos estéreis para extração de proteínas segundo o descrito por Arthur e colaboradores (319). Neste sentido, o tecido de cada amostra foi homogeneizado em 600uL de tampão contendo 50mM de tris pH 8,0, 0,3% dodecil sulfato de sódio (SDS) e 200mM de ditioneitol (DTT), incubado a 100⁰C por 4min e transferido para o gelo. Após 5min 60uL de tampão contendo 500mM de Tris pH 7,0, 50mM de MgCl₂, 200U/mL de DNase I e 0,25mg/mL de RNase A foram adicionados aos tubos e incubados por 10min adicionais. Em seguida centrifugou-se a 16.000xg por 15min e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Após quantificação das proteínas através de método 2D Quant Kit (GE Healthcare), *pools* amostrais dos dois diferentes grupos (S0,n=8 e T0,n=8) contendo 600µg de proteína cada um foram então, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) e ressuspensas em 360uL de tampão contendo uréia a 8M, CHAPS a 2% (m/v), IPG *buffer* 4-7 a 1% (v/v), DTT 20mM e azul de bromofenol a 0,002% (m/v) e deixados por 14h a 4°C, seguido de 1h à temperatura ambiente antes da aplicação na primeira dimensão.

3.4.2- Experimento 2

Após o procedimento cirúrgico e o tratamento com diferentes concentrações de glicose (5mM ou 50mM), rins provenientes dos grupos de animais TN (n=15), TH (n=15), SN (n=15), SH (n=15), T0 (n=15) e S0 (n=15), foram dissecados, a cápsula removida e o córtex renal, que contém cerca de 90% da circulação renal, foi separado da medula, cortado em pequenos pedaços com bisturi, e lavado em solução salina. Os pedaços de córtex renal foram então congelados em nitrogênio líquido, pulverizados com pistilo de porcelana e pesados para o armazenamento, individual, de 100mg de material em tubos estéreis. Em seguida as amostras foram transferidas, juntamente com 240µL de solução de extração (Uréia 8M; Tiouréia 0,5M; CHAPS 4% (m/v); IPG buffer 4-7 0,5% (v/v); DTT 60mM e Inibidor de protease Mini Complete (ROCHE) 1x concentrado), para tubos especiais de 1,5mL contendo resina abrasiva e maceradas com auxílio de pistilo fornecido pelo fabricante (*Sample Grinding Kit* - GE Healthcare). Após adicionar 240µL de solução de diluição (Uréia 8M; CHAPS 4% (m/v); IPG buffer 4-7 0,5% (v/v) e DTT 60mM), as amostras foram centrifugadas por 10min e o sobrenadante vertido em novo tubo estéril. Após quantificação das proteínas através de método 2D Quant Kit (GE Healthcare), foram formados 3 *pools* (n=5 por *pool*; 1,8mg de proteína) com contribuição protéica equitativa para cada grupo investigado (S0,T0,SN,TN,SH,TH).

3.5- Eletroforese bidimensional

As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-D/PAGE), tecnologia proteômica de alta resolução que utiliza a característica das proteínas de migrarem em um campo elétrico de acordo com sua carga (focalização isoeétrica) e volume molecular (SDS-PAGE).

Na focalização isoeétrica (IEF), primeira dimensão desta técnica, as proteínas migram em gradientes de pH com campo elétrico, até alcançarem seu ponto isoeétrico (pI). O pI de uma proteína é o valor de pH aonde a proteína apresenta carga líquida zero. Assim, proteínas positivamente carregadas irão migrar para o catodo perdendo prótons através do gradiente de pH e se tornar progressivamente menos carregadas até atingirem seu pI. Da mesma forma, proteínas negativamente carregadas, ganharão prótons ao longo do gradiente de pH até obterem carga líquida zero, parando de migrar.

3.5.1- Experimento 1

A solução contendo a amostra com proteínas representativas de cada *pool*, foi aplicada (350µL) ao sarcófago de cerâmica (*strip holder*) e as proteínas separadas por seu ponto isoelétrico, em fitas de gel (*strip*) com gradiente imobilizado de pH em faixa linear compreendida entre 4-7 (*Immobiline DryStrip Gel* - GE Healthcare) em sistema IPGphor, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A programação utilizada foi: 20°C ; 50µA máximos ; 12h a 30V / 1h a 200V / 1h a 500V / 1h a 1.000V / 0,5h em gradiente de 1.000 a 8.000V / 8h a 8.000V.

Após a focalização isoelétrica, os *strips* foram reduzidos e alquilados em tampões de equilíbrio contendo 65mM de ditioneitol e 215mM de iodoacetamida, respectivamente. Para isto, cada fita de gel foi incubada por 15min, sob agitação em 10mL de solução de equilíbrio [tris-HCl 1,5M pH 8,8; uréia 6M; glicerol 30% (v/v); SDS 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,002% (p/v)], contendo 100mg de ditioneitol. Após descarte do líquido, as fitas foram novamente incubadas por 15min, sob agitação em 10ml de solução de equilíbrio contendo agora 400mg de iodoacetamida.

As fitas foram então posicionadas sobre gel SDS-PAGE de 18cm com concentração de acrilamida a 12%, e a separação das proteínas por seu peso molecular realizada em sistema de eletroforese ETTAN Daltsix (GE Healthcare). O tampão de eletrodo utilizado foi o Tris-base 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1% (p/v) pH 8,3. As condições elétricas utilizadas foram de 2,5W por gel durante 30min seguidos de 100W totais constantes por tempo suficiente para que a frente de migração do azul de bromofenol saísse do gel.

Os géis foram fixados em solução aquosa contendo 30% de etanol e 2% (v/v) de ácido fosfórico e mantidos sob agitação moderada durante três sessões de 30min, aonde no intervalo de cada uma, a solução em contato com o gel era removida e outra recém preparada adicionada. Este mesmo procedimento foi repetido em outras três sessões de agitação moderada durante 20min com solução contendo 2% (v/v) de ácido fosfórico em água. Os géis foram então transferidos para uma solução aquosa de etanol a 18%, ácido fosfórico a 2% (v/v) e sulfato de amônio a 15% (p/v). Após 30min de incubação, adicionou-se o volume necessário de Coomassie Blue G-250 a 2% (p/v) em água, para atingirmos uma concentração final de C. Blue de 0,02% (p/v). Deixou-se agitando por 72h.

As imagens dos géis foram capturadas em densitômetro *ImageScanner* (GE Healthcare). A análise das duas imagens que numerou, identificou o ponto isoelétrico, massa molecular e concentração relativa dos *spots* visualizados foi realizada utilizando o programa *ImageMaster Platinum* da GE Healthcare segundo instruções do fabricante (GE Healthcare). Os padrões de massa molecular utilizados foram fosforilase b (94kDa), BSA (67kDa),

ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor trípico de soja (20,1kDa) e α -lactalbumina (14,4kDa).

3.5.2- Experimento 2

A solução contendo a amostra com proteínas representativas de cada *pool*, foi aplicada (0,45mL) ao sarcófago de cerâmica (*strip holder*) e as proteínas separadas por seu ponto isoelétrico, em fitas de gel (*strip*) com gradiente imobilizado de pH em faixa não-linear compreendida entre 3-7 (*Immobiline DryStrip Gel* - GE Healthcare) em sistema IPGphor, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A programação utilizada foi: 20°C ; 50 μ A máximos ; 12h a 30V / 1h a 200V / 1h a 500V / 1h a 1.000V / 0,5h em gradiente de 1.000 a 8.000V / 10h a 8.000V. Nesse último passo, caso não se atingisse 80.000 Vh após 10h a corrida era prolongada pelo tempo necessário para que isso ocorresse.

Após a focalização isoelétrica, os *strips* foram reduzidos e alquilados em tampões de equilíbrio contendo 65mM de ditiotreitol e 215mM de iodoacetamida, respectivamente. Para isto, cada fita de gel foi incubada por 15min, sob agitação em 10mL de solução de equilíbrio [tris-HCl 1,5M pH 8,8; uréia 6M; glicerol 30% (v/v); SDS 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,002% (p/v)], contendo 100mg de ditiotreitol. Após descarte do líquido, as fitas foram novamente incubadas por 15min, sob agitação em 10ml de solução de equilíbrio contendo agora 400mg de iodoacetamida.

As fitas foram então posicionadas sobre gel SDS-PAGE de 24cm com concentração de acrilamida a 12%, e a separação das proteínas por seu peso molecular realizada em sistema de eletroforese ETTAN Daltsix (GE Healthcare). O tampão de eletrodo utilizado foi o Tris-base 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1% (p/v) pH 8,3. As condições elétricas utilizadas foram de 2,5W por gel durante 30min seguidos de 100W totais constantes por tempo suficiente para que a frente de migração do azul de bromofenol saísse do gel.

Os géis foram fixados em solução aquosa contendo 30% de etanol e 2% (v/v) de ácido fosfórico e mantidos sob agitação moderada durante três sessões de 30min, aonde no intervalo de cada uma, a solução em contato com o gel era removida e outra recém preparada adicionada. Este mesmo procedimento foi repetido em outras três sessões de agitação moderada durante 20min com solução contendo 2% (v/v) de ácido fosfórico em água. Os géis foram então transferidos para uma solução aquosa de etanol a 18%, ácido fosfórico a 2% (v/v) e sulfato de amônio a 15% (p/v). Após 30min de incubação, adicionou-se o volume necessário de Coomassie Blue G-250 a 2% (p/v) em água, para atingirmos uma concentração final de C. Blue de 0,02% (p/v). Deixou-se agitando por 72h.

As imagens dos géis foram capturadas em densitômetro *ImageScanner* (GE Healthcare). A análise das 18 imagens que numerou, identificou o ponto isoelétrico, massa molecular e concentração relativa dos *spots* visualizados foi realizada utilizando o programa *ImageMaster Platinum* da GE Healthcare segundo instruções do fabricante (GE Healthcare). Os padrões de massa molecular utilizados foram fosforilase b (94kDa), BSA (67kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor trípico de soja (20,1kDa) e α -lactalbumina (14,4kDa).

3.6- Digestão in gel

3.6.1- Experimentos 1 e 2

As cadeias polipeptídicas reveladas como manchas (*spots*) nos géis de eletroforese bidimensional foram manualmente excisadas com o auxílio de um bisturi nº 15 e digeridas com tripsina, segundo o descrito na literatura (309). Resumidamente, os *spots* foram transferidos para tubos limpos e lavados durante 3 sessões de 15min, com troca das soluções no intervalo, em solução (400 μ L) contendo 50% de acetonitrila e 25mM de bicarbonato de amônio em pH 8,0. Em seguida, os géis foram desidratados por 5min em solução (200 μ L) contendo 100% de acetonitrila (um procedimento repetido sucessivamente até que cada pedaço de gel ficasse opaco), e secados à vácuo em equipamento *speed vac* durante 15min. A tripsina (20 μ g /100 μ L de ácido acético a 50mM) foi então diluída dez vezes em bicarbonato de amônio a 50mM e adicionada nos tubos que continham os géis secos e a digestão realizada por 16h em banho a 37⁰C. Em seguida, os peptídeos foram extraídos por duas vezes com solução contendo 5% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila. O extrato foi concentrado por evaporação até um volume que variou de 5 a 10 μ L.

3.7- Espectrometria de massa

3.7.1- Experimento 1: LCMS/MS

Os extratos peptídicos da digestão trípica foram separados em coluna μ RPC C2/C18 (15cm x 300 μ m e poro de 120 Å - GE Healthcare). A fase móvel A foi de 0,1% (v/v) de ácido fórmico diluído em água e a fase móvel B de 0,1% (v/v) de ácido fórmico diluído em acetonitrila. O gradiente utilizado para separação dos peptídeos foi de 5% de B por 5 min, 40% de B em 35 min, 60% de B em 45 min, 80% de B em 48 min. Os peptídeos eluídos da

coluna foram diretamente eletro-vaporizados (electrosprayed) em espectrômetro ion trap LCQ Deca XP Plus (Thermo Finnigan, USA) para análise de acordo com as instruções do manual. Os dados obtidos foram manualmente interpretados e as seqüências obtidas submetidas através do programa Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ao banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.7.2- Experimento 2: MALDI-TOF/TOF

Os extratos peptídicos da digestão trípica foram concentrados e dessalinizados em pointeiras ZipTip C₁₈ (Millipore) e em seguida analisados no espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (ABI 4700 Proteomics Analyzer) no modo *reflectron* para íons positivos. As amostras foram inicialmente misturadas, equivolumentricamente, com a matriz (10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em solução contendo 50% de acetonitrilo e 0,3% (v/v) de ácido trifluoroacético). As misturas foram aplicadas individualmente na placa de MALDI e secas à temperatura ambiente.

A placa de MALDI foi calibrada com uma mistura dos seguintes peptídeos: arg-bradicinina (m/z 904,46), angiotensina I (m/z 1.296,68), glu-fibrinopeptídeo B (m/z 1.570,67), ACTH (1-17) (m/z 2.093,08) e ACTH (18-39) (m/z 2.465,19). No modo MS, as massas (na realidade a relação m/z) dos íons observados correspondiam às massas dos peptídeos obtidos pela digestão trípica da proteína e detectados no espectrômetro (mapa peptídico). No modo MS/MS, os dez íons mais abundantes foram selecionados (*timed ion selector*) e fragmentados por PSD (*Post Source Decay*).

A lista de valores de m/z de cada espectro MS/MS gerado foi submetida à análise utilizando o algoritmo de procura Mascot (Matrix Science, GB; versão 1.9.05). O Mascot foi configurado para efetuar a procura para o grupo *Mammalia* (405.343 entradas) do banco de dados não-redundante do NCBI de 20.12.2007. Outros parâmetros utilizados foram: enzima = tripsina ; clivagens perdidas = 2 ; tolerância para massa dos íons-fragmento = 0,2 Da e para o íons precursores de 0,6 Da ; Modificações variáveis = oxidação de histidina, metionina e triptofano ; modificação de cisteína por iodoacetamida ou por acrilamida; modificação pyro-glutamato.

O software Scaffold (versão 01-07-00, Proteome Software Inc., EUA) foi utilizado para validar as identificações dos peptídeos e proteínas geradas por MASCOT através dos espectros MS/MS. As identificações dos peptídeos foram aceitas para valores de probabilidade maiores do que 95% como especificado pelo algoritmo *Peptide Prophet*. No

caso das identificações das proteínas, foram aceitas aquelas proteínas que contivessem pelo menos um peptídeo sequenciado e que apresentassem probabilidade maior do que 95% como estabelecido pelo algoritmo *Protein Prophet* (310).

3.8- Análise estatística das imagens dos géis

3.8.1- Experimento 1 e 2

No experimento 1, apenas os *spots* que apresentaram intensidade (área x pixels) diferencial duas vezes maior foram considerados para análise.

No experimento 2, a intensidade média de cada *spot*, obtida a partir dos 3 *pools* formados em cada grupo experimental, foi submetida a comparação dois a dois entre cada um dos 6 grupos, através de testes t, com p-valores empíricos obtidos a partir de testes de permutação. Os valores obtidos foram então, utilizados para calcular o q valor, uma abordagem derivada do *False Discovery Rate* (FDR) (311). Foram consideradas significativas as diferenças do valor de p menores que 0,05 que apresentavam um q valor de até 0,25. Todos os cálculos foram realizados utilizando o ambiente R para Windows, versão 2.6.0.

4 – RESULTADOS

4.1. Apresentação dos resultados

Neste capítulo, temos o objetivo de apresentar os principais achados que derivamos da parte experimental do estudo sintetizando os resultados referentes aos efeitos deletérios da glicose elevada e adaptativos do exercício dinâmico crônico sobre o córtex renal de coelhos. Pretende-se com isso, revelar, entre outros processos, os principais mecanismos pelo qual o treinamento físico é capaz de promover aumentos na resposta de vasodilatação dependente e independente de endotélio na circulação renal, bem como proteger este leito vascular da ação deletéria associada a glicose elevada.

Inicialmente serão apresentados os resultados do experimento 1. Com este intuito, elaboramos a figura 4.1 que mostra a comparação entre a eletroforese bidimensional obtida das amostras de proteínas extraídas do córtex renal de coelhos treinados (T0, painel a;n=8) e sedentários (S0, painel b;n=8) com destaque para expressão diferencial com intensidade três vezes maior entre dois pares de *spots* (T1 e S1; T2 e S2) com massa molecular de 23kDa e valores de pI de 5.02 (T1), 5.11 (T2), 5.01 (S1) e 5.08 (S2). A análise por espectrometria de massa dos peptídeos provenientes destes *spots* identificou a apolipoproteína A-1 de coelho (APO A-I – acesso no *SwissProt* sob o número P09809).

As figuras 4.2, 4.3 e 4.4 mostram a comparação entre os padrões de eletroforese bidimensional obtidos para os grupos de animais sedentários (S0,SN e SH) e treinados (T0,TN e TH) nas diferentes condições experimentais obtidas a partir do experimento 2. Após minuciosa análise das imagens somente os *spots* que apresentaram expressão diferencial entre os grupos foram submetidos à análise por espectrometria de massa.

Dos 324 *spots* visualizados, cerca de 30% apresentaram intensidade (área x pixels) com diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$), compreendendo uma ou mais ocorrências de 40 proteínas cuja identidade é descrita na tabela 4.1. A tabela 4.2 descreve a função da proteína e indica o acesso para consulta através de outras informações sobre a proteína e seu gene através dos bancos de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). A análise das imagens expostas nas referidas figuras evidencia que o treinamento físico e/ou o tratamento com glicose elevada, são capazes de

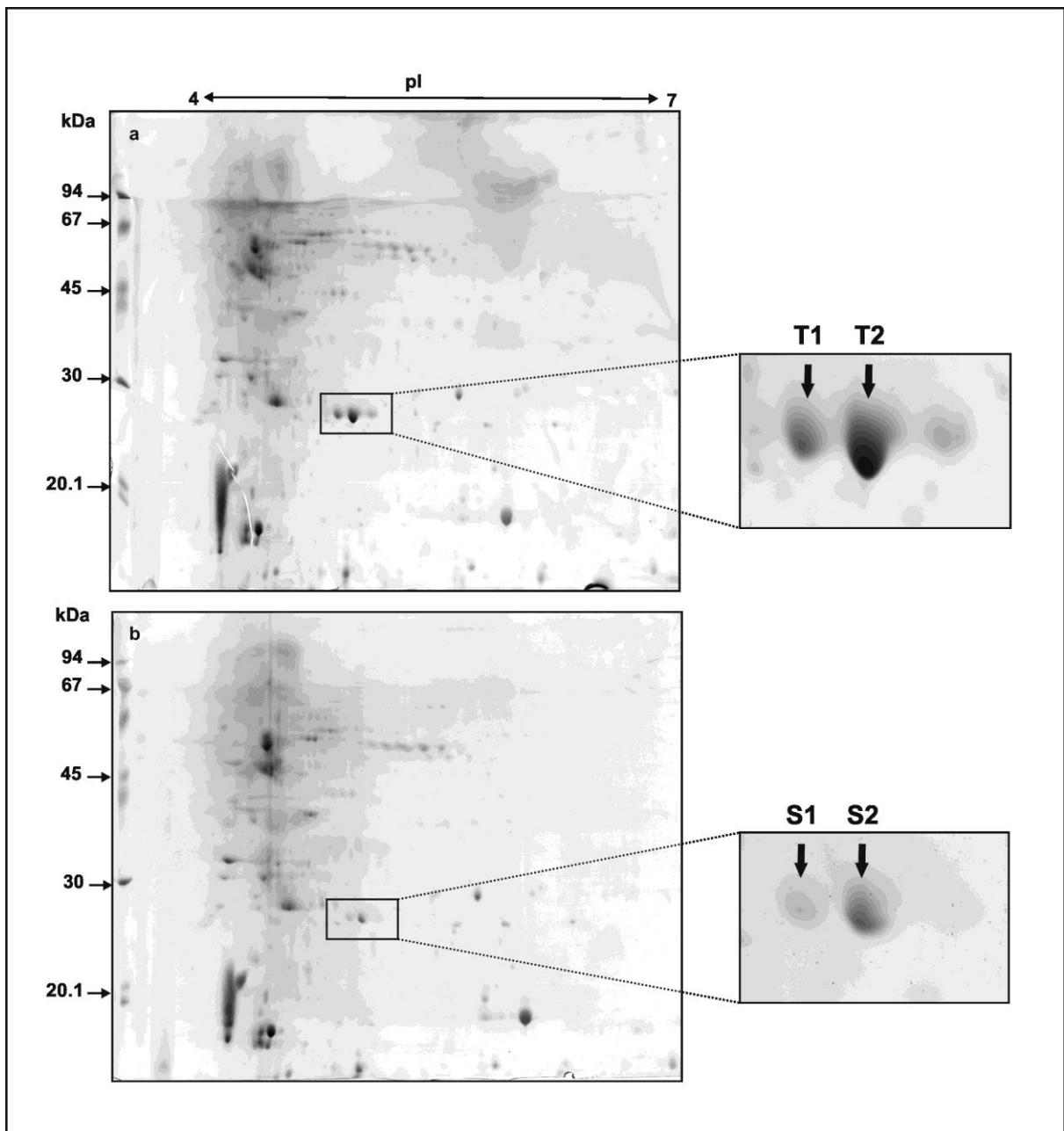


Figura 4.1. Eletroforese bidimensional dos grupos S0 e T0 do experimento 1. O gel de poliacrilamida foi revelado com azul de Coomassie coloidal e representa a separação das proteínas do cortex renal de coelhos submetidos a programa de treinamento físico (T0, painel a, n=8) ou mantidos sedentários (S0, painel b, n=8), em faixa de pH de 4-7 linear e SDS-PAGE de 18cm com concentração de acrilamida a 12%. Em destaque a região com expressão diferencial de proteínas (T1xS1 e T2xS2; $p < 0,05$) identificadas pela espectrometria de massa como sendo a apolipoproteína A-1. A quantidade de proteína presente é proporcional à intensidade (área x pixels) do *spot*.

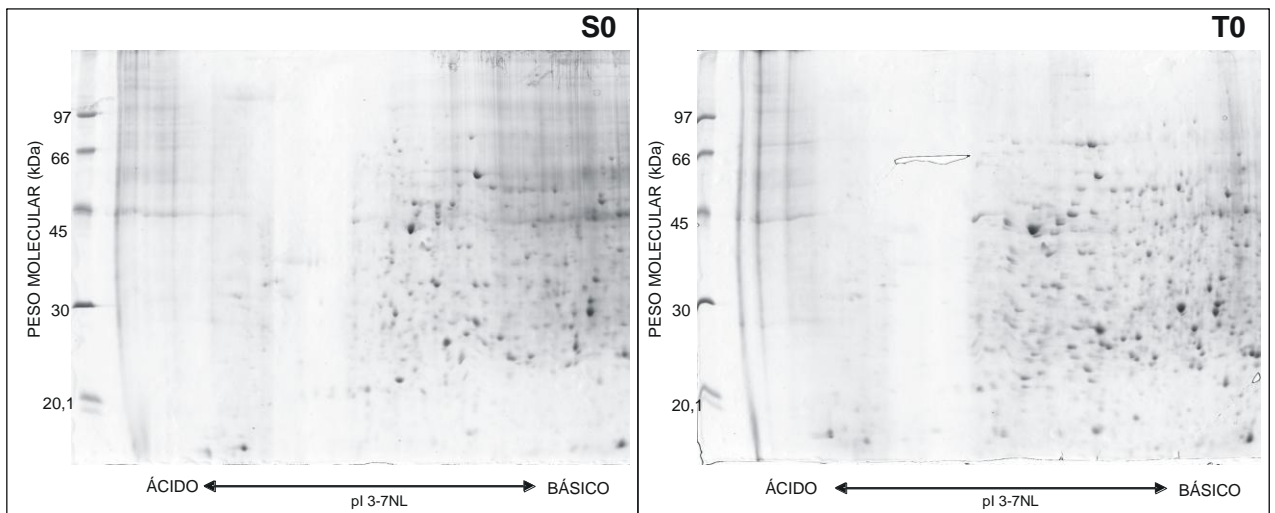


Figura 4.2. Eletroforese bidimensional dos grupos S0 e T0 do experimento 2. Imagens representativas da separação das proteínas dos 3 *pools* de amostras do córtex renal de coelhos sedentários (S0) e dos 3 *pools* de amostras do córtex renal de coelhos treinados (T0) sem pré-tratamento da circulação renal com glicose. O gel de poliacrilamida foi revelado com azul de Coomassie coloidal após separação das proteínas em faixa de pH de 3-7 não-linear e SDS-PAGE de 24cm com concentração de acrilamida a 12%. A quantidade de proteína presente é proporcional à intensidade (área x pixels) do *spot*.

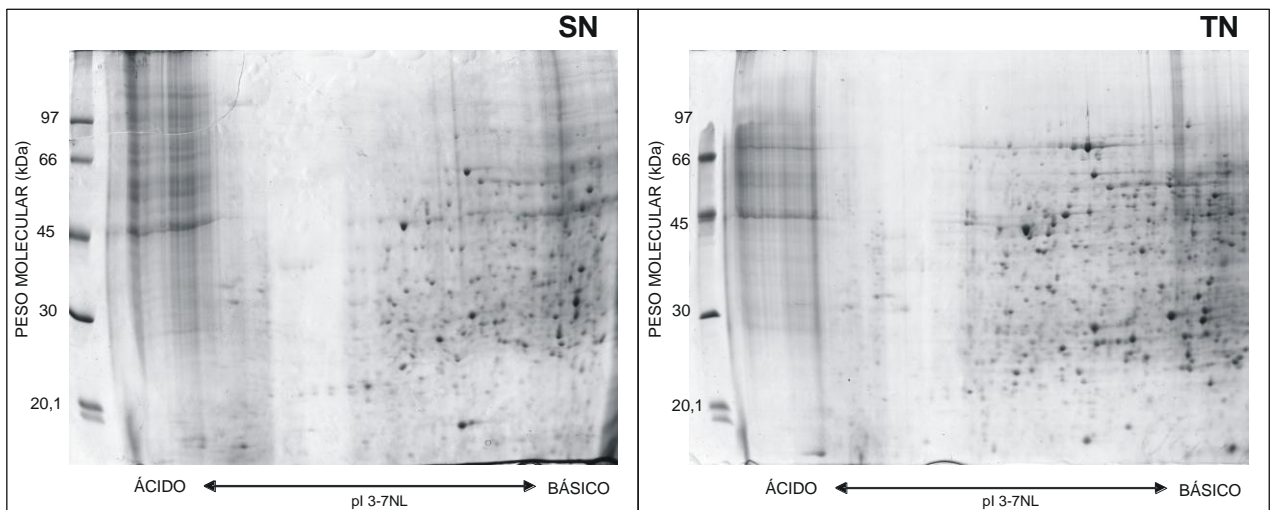


Figura 4.3. Eletroforese bidimensional dos grupos SN e TN do experimento 2. Imagens representativas da separação das proteínas dos 3 *pools* de amostras do córtex renal de coelhos sedentários (SN) e treinados (TN) com pré-tratamento da circulação renal com concentração normal de glicose (5mM). O gel de poliacrilamida foi revelado com azul de Coomassie coloidal após separação das proteínas em faixa de pH de 3-7 não-linear e SDS-PAGE de 24cm com concentração de acrilamida a 12%. A quantidade de proteína presente é proporcional à intensidade (área x pixels) do *spot*.

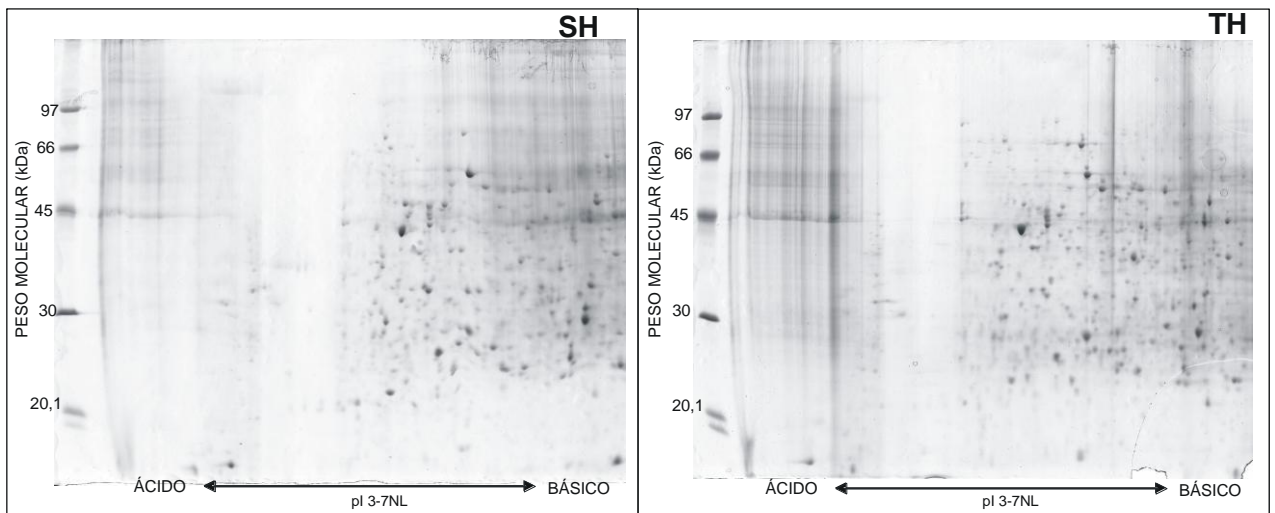


Figura 4.4. Eletroforese bidimensional dos grupos SH e TH do experimento 2. Imagens representativas da separação das proteínas dos 3 *pools* de amostras do córtex renal de coelhos sedentários (SH) e treinados (TH) com pré-tratamento da circulação renal com concentração elevada de glicose (50mM). O gel de poliacrilamida foi revelado com azul de Coomassie colloidal após separação das proteínas em faixa de pH de 3-7 não-linear e SDS-PAGE de 24cm com concentração de acrilamida a 12%. A quantidade de proteína presente é proporcional à intensidade (área x pixels) do *spot*.

modificar o fenótipo do córtex renal alterando significativamente a expressão de proteínas com diferentes funções neste tecido.

Refletindo sobre os dados expostos na tabela 4.2, podemos inferir conforme exposto na figura 4.5, que o do total de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos, 27% apresentam atividade antioxidante, 7% participam de funções chaperona, 5% são proteínas estruturais e 46 % são enzimas do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios.

As proteínas selecionadas para este estudo por integrarem mecanismos relevantes associados ao efeito adaptativo do treinamento físico sobre a reatividade vascular da circulação renal isolada de coelhos se encontram descritas na tabela 4.3 e podem ser visualizadas em destaque nas figuras 4.6, 4.7 e 4.8. Conforme indicam os resultados, em todas as proteínas selecionadas para o estudo, por estarem de alguma forma associadas ao aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico na circulação renal, existem expressões protéicas diferenciais com significância estatística entre os grupos.

A tabela 4.4 apresenta a intensidade (área x pixels) intergrupos associada à expressão diferencial das outras proteínas identificadas na análise dos espectros de massa com destaque para aquelas que participam do metabolismo energético do córtex renal de coelhos aonde algumas foram selecionadas para estudo por evidenciarem outros possíveis mecanismos adaptativos provocados pelo treinamento físico nesta área do tecido renal.

Finalmente, a tabela 4.5 mostra a relação das oito ocorrências da proteína albumina no experimento 2.

Tabela 4.1 - Descrição nominal das proteínas do experimento 2

NOME DA PROTEÍNA SEGUNDO NCBI	ABREVIATURA	DENOMINAÇÃO UTILIZADA NO TEXTO
1. Proteínas com função chaperona e de estabilização do citoesqueleto		
heat shock 27kDa protein 1 / (HspB1)	HSP27	Proteína de estresse de 27kDa
villin 2 (ezrin)	vilina	vilina
Chaperonin / (Hsp60)	HSP60	Proteína de estresse de 60kDa
Heat shock 70 kDa protein 9 / (GRP 75)	GRP75	Proteína regulada por glicose de 75kDa
2. Proteínas com atividade anti-oxidante		
peroxiredoxin 6 / Non-selenium glutathione peroxidase (NSGPx) /Thiol-specific antioxidant protein	PRDX-6	Peroxiredoxina 6
Protein disulfide-isomerase A3 / (Erp 60/ GRP 58)	PDI-A3	Proteína disulfeto isomerase (isoforma A3)
Cyclophilin 18 / (cyclophilin A) / (Rotamase A)	ciclofilina	ciclofilina
Glutathione S-transferase Yc (Alpha II) (GST class-alpha)	GST	Glutathione transferase
aldo-keto reductase family 1, member A1 isoform 1 / (AKR1A1)	AKR1A1	Aldo-ceto redutase
serum albumin precursor	ALBUMINA	Albumina
Selenium-binding protein 1 / SELENBP1	SBP-1	Proteína ligante de selênio (isoforma 1)
Sod2 protein	SOD-2	Superóxido dismutase mitocondrial
3. Proteínas que controlam a atividade da enzima NOS		
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH-1	Dimetilarginina Aminohidrolase (isoforma 1)
regucalcin / (Senescence marker protein 30) (SMP-30)	RGN	Regucalcina
4. Proteínas que participam da fosforilação oxidativa, beta-oxidação e metabolismo energético		
ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I isoform 2 (citocromo b)	UbCitC redutase	Ubiquinol citocromo c redutase
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1	ATP sintase	ATP sintase mitocondrial
electron transfer flavoprotein	FTE	Flavoproteína transferidora de elétrons
mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1	Enoil-CoA HIDR-Mit	Enoil-CoA hidratase mitocondrial
acyl-Coenzyme A dehydrogenase	Acil-CoA DSH	Acil-CoA desidrogenase
Isocitrate dehydrogenase-1 / (IDH)	IDH-1	Isocitrato desidrogenase citosólica
peroxisomal enoyl-coenzyme A hydratase-like protein	Enoil-CoA HIDR-Per	Enoil-CoA hidratase peroxissomal

5. Proteínas envolvidas na gliconeogênese e biossíntese de aminoácidos		
Triosephosphate isomerase (TIM)	TIM	Triose fosfato isomerase
Alpha enolase / (Enolase 1/MPB-1)	Enolase	Enolase
Fructose-1,6-bisphosphatase 1 / (FBPase 1)	Frutose 1,6BPase	Frutose 1,6 bifosfatase
glycerol-3-phosphate dehydrogenase / (GPD-1)	G3PDSH	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase
malate dehydrogenase 1	Malato DSH-1	Malato desidrogenase citosólica
ACY1 aminoacylase 1	ACY-1	Aminoacilase
6. Proteínas do citoesqueleto		
beta-actin	beta-actina	beta actina
tropomyosin 1, alpha isoform 2	Tropomiosina	Tropomiosina
7. Outras proteínas		
liver carboxylesterase	carboxilesterase hepática	Carboxilesterase hepática
carbonil reductase	carbonil redutase	Carbonil redutase
PDZ domain containing 1/ Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 3	PDZ domain cont	Trocador Na(+)/H(+)
Crystallin, lambda 1	Cristalin Lambda	Cristalina
glutamine synthetase 1	GLN sintase	Glutamina sintase
nonerythroid alpha-spectrin	NE α SPECTRIN	alfa-espectrina não eritróide
nitrilase family, member 2 / (nit 2)	nitrilase	Nitrilase
N-myc downstream regulated gene 1	N-myc RG	N-myc regulatório
aldehyde dehydrogenase 6A1 precursor / Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase mitochondrial precursor / (ALDH6A1/MMSDH)	Aldeído DSH	Aldeído desidrogenase
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3-HBTDSH	3-hidroxisobutirato desidrogenase
UDP-glucose dehydrogenase	udp-glicose DSH	UDP-glicose desidrogenase
Tabela 4.1. As proteínas que apresentaram expressão diferencial significativa entre um ou mais grupos ($p < 0,05$) foram separadas por grupos funcionais e apresentam denominação e abreviatura técnica extraídas do banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Incluímos também, a denominação da proteína utilizada no texto.		

Tabela 4.2 - Descrição funcional das proteínas do experimento 2

SPOT	ABREVIATURA	NCBI	UniProt	FUNÇÃO	Locus	Gene ID
1. Proteínas com função chaperona e de estabilização do citoesqueleto						
300	HSP27	gi 149063018	P42930	Envolvida na resistência ao estresse e na organização da actina	EDM13341	24471
188	vilina	gi 32363162	Q8HZQ5	Envolvida nas conexões com as principais estruturas do citoesqueleto na membrana plasmática	Q8HZQ5	100008846
115	HSP60	gi 11560024	P10809	Impede desarranjo e contribui para reorganização de proteínas mitocondriais em condições de estresse	NP_071565	698024
311	GRP75	gi 1000439	P38646	Funciona como chaperona molecular	AAB34982	3313
2. Proteínas com atividade anti-oxidante						
323	PRDX-6	gi 16758348	O35244	Envolvida na regulação redox da célula e na proteção contra lesão oxidativa. Pode reduzir peróxido de hidrogênio.	NP_446028	94167
56	PDI-A3	gi 38382858	P11598	Cataliza a organização das ligações sulfidrilas (S-S) em proteínas	AAH62393	29468
397	ciclofilina	gi 126722924	Q9TTC6	Acelera o processamento (<i>fold</i> ing) das proteínas.	NP_001075526	100008724
377	GST	gi 126722906	P46439	Cataliza conjugação da glutatona reduzida a eletrófilos hidrofóbicos	NP_001075721	2949
402	AKRA1	gi 13591894	P14550	Cataliza redução de aldeídos	NP_112262	693380
40,43,50	ALBUMINA	gi 126723746	P49065	Principal proteína plasmática	NP_001075813	100009195
83	SBP-1	gi 18266692	Q5RF48	Envolvida no transporte de proteínas em Golgi e sensor de xenobióticos reativos no citoplasma	NP_543168	67895
354	SOD-2	gi 1174386	P41982	Destroi radicais tóxicos à célula	P41982	100009336
3. Proteínas que controlam a atividade da enzima NOS						
191	DDAH-1	gi 11560131	O94760	Responsável pela hidrólise da ADMA e do L-NMMA	NP_071633	490182
213	RGN	gi 126722755	Q9TTJ6	Regula sinalização intracelular dos íons cálcio	NP_001075472	100008619
4. Proteínas que participam da fosforilação oxidativa, beta-oxidação e metabolismo energético						
112	UbCitC redutase	gi 6166086	P34863	Componente do complexo III mitocondrial da CTE.	P34863	476503
373	ATP sintase	gi 89574025	P25705	Produz ATP na presença de gradiente de prótons (F ₀ F ₁ ATPase)	ABD77238	498
235	FTE	gi 57527204	P13803	Aceptor de elétrons para desidrogenases (inclui Acyl-Coa DSH) e capaz de transferir elétrons na CTE pela via ETF-ubiquinona oxidoreductase	NP_001009668	300726
275,277	Enoil-CoA HIDR-Mit	gi 17530977	P14604	Envolvido na beta oxidação	NP_511178	140547
168	Acil-CoA DSH	gi 113019	P16219	Participa da beta oxidação mitocondrial	P16219	35
248	IDH-1	gi 89573975	O88844	Participa da conversão de isocitrato em 2-oxoglutarato	ABD77213	15926
252,253	Enoil-CoA HIDR-Per	gi 109124614		Participa da beta oxidação peroxissomal	XP_001084167	694324

5. Proteínas envolvidas na gliconeogênese						
305	TIM	gi 136066	P00939	Participa da biossíntese de carboidratos	P00939	44456
102	Enolase	gi 109468300	P06733	Participa da glicólise e ativa o plasminogênio de leucócitos e neurônios	XP_001067222	688509
302	Frutose 1,6BPase	gi 3915684	P00637	Participa da biossíntese de carboidratos	P00637	2456
219	G3PDSH	gi 3043365	P08507	Oxidoreductase da via glicolítica	P08507	14555
215	Malato DSH-1	gi 15100179	O88989	Desidrogenação do malato para formar oxaloacetato	NP_150238	24551
149,15	ACY-1	gi 52851387	Q3T0V2	Participa do processo proteolítico de peptídeos	NP_001005383	768058
6. Proteínas do citoesqueleto						
135,139,158	beta-actina	gi 46849862	P60710	Proteína do citoesqueleto	AAT02354	11461
243	tropomiosina	gi 73986126		Motor molecular	XP_852641	609879
7. Outras proteínas						
250	PDZ domain cont	gi 126723666	Q865P3	Proteína <i>scaffold</i> que se conecta a proteínas de membrana regulando sua expressão na superfície celular	NP_001075620	100008900
268	Cristalin Lambda	gi 126723698	P14755	Principal proteína do cristalino ocular	NP_001075747	100009108
130	GLN sintase	gi 121376	P09606	Ligase dependente de ATP que adiciona NH ₃ ⁺ ao glutamato	P09606	24957
236	NEaSPECTRIN	gi 203014	P07751	Participa da organização de proteínas de membrana	AAA40770	9031
281	nitrilase	gi 77628000	Q497B0	Participa do controle da divisão celular	NP_001029298	288174
400	N-myc RG	gi 109471189	Q6AYR2	Participa da inibição do crescimento celular	XP_001067405	296318
361	Aldeído DSH	gi 6164678	Q02252	Papel no metabolismo de valina e pirimidinas.	AAF04489	4329
75	udp-glicose DSH	gi 149035357	O70199	Envolvida na síntese de glicosaminoglicanos, condroitina sulfato e heparan sulfato	EDL90061	83472
247	3-HBTDSH	gi 23308751	P31937	Oxidoreductase mitocondrial	NP_689953	11112
223	carboxilesterase hepática	gi 130491007	P12337	Envolvido na detoxificação de xenobióticos	NP_001076234	100009551
234	carbonil redutase	gi 1352257	P47844	Catalisa a redução de compostos carbonila	P47844	100009528
<p>Tabela 4.2. As informações funcionais das proteínas que apresentaram expressão diferencial significativa entre um ou mais grupos ($p < 0,05$), são acompanhadas de indicações para acesso através dos bancos de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/uniprot/). Para seqüência dos peptídeos ver em anexo quadros 8.1 e 8.2.</p>						

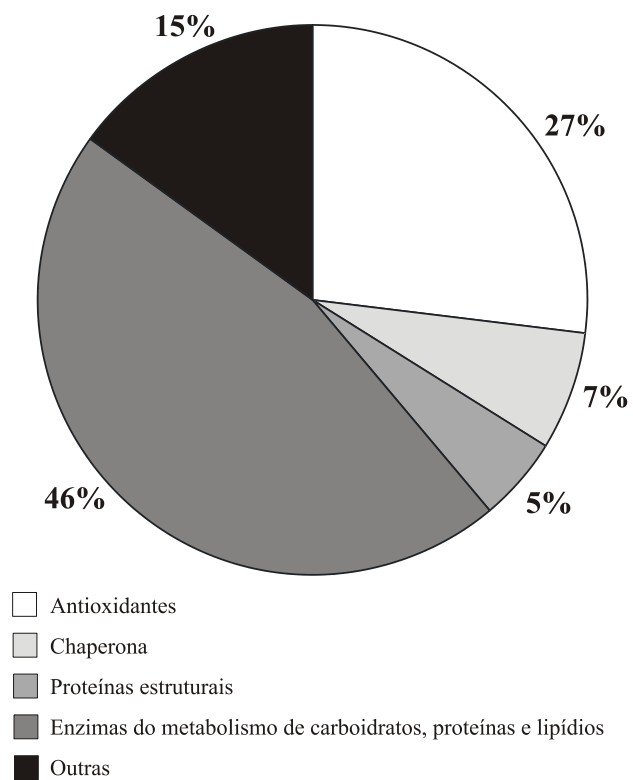


Figura 4.5. Distribuição por grupos de proteínas identificadas no experimento 2.

Tabela 4.3 - Descrição das proteínas selecionadas para estudo

SPOT	NOME	pI/MW-T	pI/MW-E	S0	T0	SN	TN	SH	TH	p<0,05
300	HSP27	6,5/27,0	5,5/27,6	nd	252	192	198	72	70	S0xT0
188	vilina	6,4/69,2	5,2/41,2	nd	133	nd	198	70	47	S0xT0/SNxTN
311	GRP75	6,0/73,7	5,9/26,7	46	40	nd	272	89	32	SNxTN
115	HSP60	5,5/61,1	5,7/50,5	150	202	nd	207	108	159	TNxSN
323	PRDX-6	5,7/24,8	5,8/26,2	42	403	323	401	nd	93	S0xT0/TNxTH/SNxSH
397	ciclofilina	6,7/17,8	6,6/15,9	524	879	600	831	397	629	ns
56	PDI-A3	6,1/56,6	5,8/69,9	125	148	nd	146	nd	19	SNxTN
377	GST	6,5/21,6	6,4/20,8	234	475	290	569	289	350	S0xT0
40	ALBUMINA	6,2/68,9	6,0/78,2	nd	200	nd	242	nd	124	S0xT0/SNxTN
43	ALBUMINA	6,2/68,9	6,0/76,4	206	904	530	1290	127	1251	S0xT0/SNxTN/SHxTH
50	ALBUMINA	6,2/68,9	6,0/73,0	nd	79	2	172	nd	42	SNxTN
402	AKRA1	6,8/36,6	6,5/19,8	nd	60	26	114	112	nd	SNxTN
83	SBP-1	6,6/52,4	6,1/56,7	377	469	376	501	286	387	SNxTN
191	DDAH-1	5,6/31,1	5,6/40,3	142	141	104	343	215	409	SNxTN
213	RGN	5,4/33,1	5,4/37,9	77	263	49	344	nd	85	S0xT0
354	SOD-2	7,4/22,7	6,6/23,2	445	588	712	818	89	320	ns
S1/T1	APO-A1	5,3/30,6	5,02/23,0	180	640	-	-	-	-	Intensidade pelo menos 2x maior
S2/T2	APO-A1	5,3/30,6	5,11/23,0	680	2056	-	-	-	-	Intensidade pelo menos 2x maior

Tabela 4.3. As proteínas identificadas no experimento 1 encontram-se descritas nas últimas duas linhas desta tabela e foram selecionadas por apresentarem intensidade pelo menos duas vezes maior entre os grupos experimentais. As proteínas identificadas no experimento 2 foram selecionadas por integrarem mecanismos relevantes associados ao efeito adaptativo do treinamento físico sobre a reatividade vascular da circulação renal isolada de coelhos. Encontram-se descritas as abreviaturas das proteínas, *spot* correspondente e intensidade média (área x pixels) de cada grupo experimental, com comparação dos respectivos ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW), teóricos (T) e experimentais (E), e relações inter-grupo com significância estatística (p<0,05). nd = não detectado; ns = não significativo.

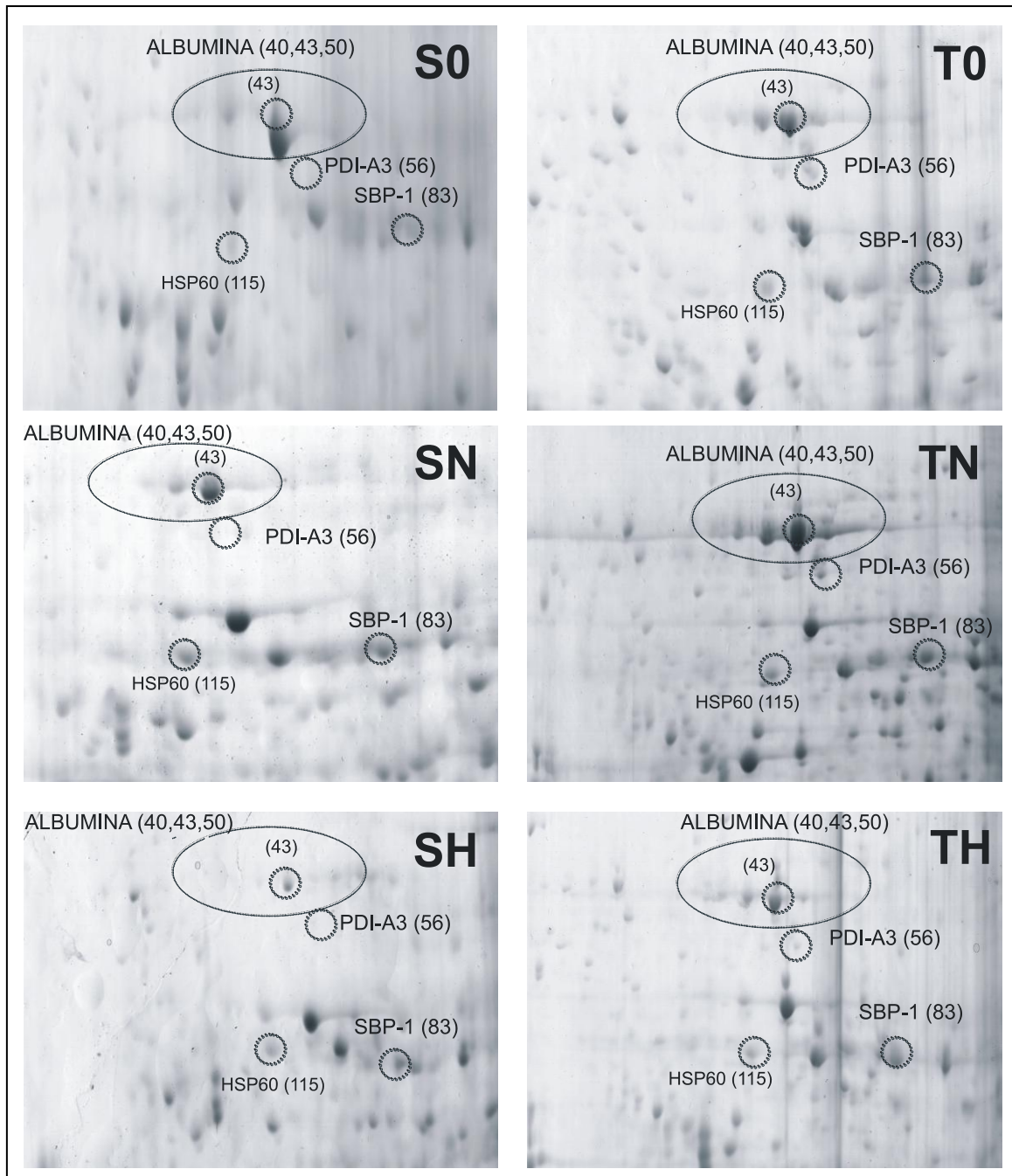


Figura 4.6. Imagens da região de 45-97kDa e pI de 5-6,5 do experimento 2. Imagem representativa dos três *pools* de cada grupo experimental. Em destaque, as proteínas albumina (spots 40,43 e 50), PDI-A3 (spot 56), SBP-1 (spot 83) e HSP60 (spot 115).

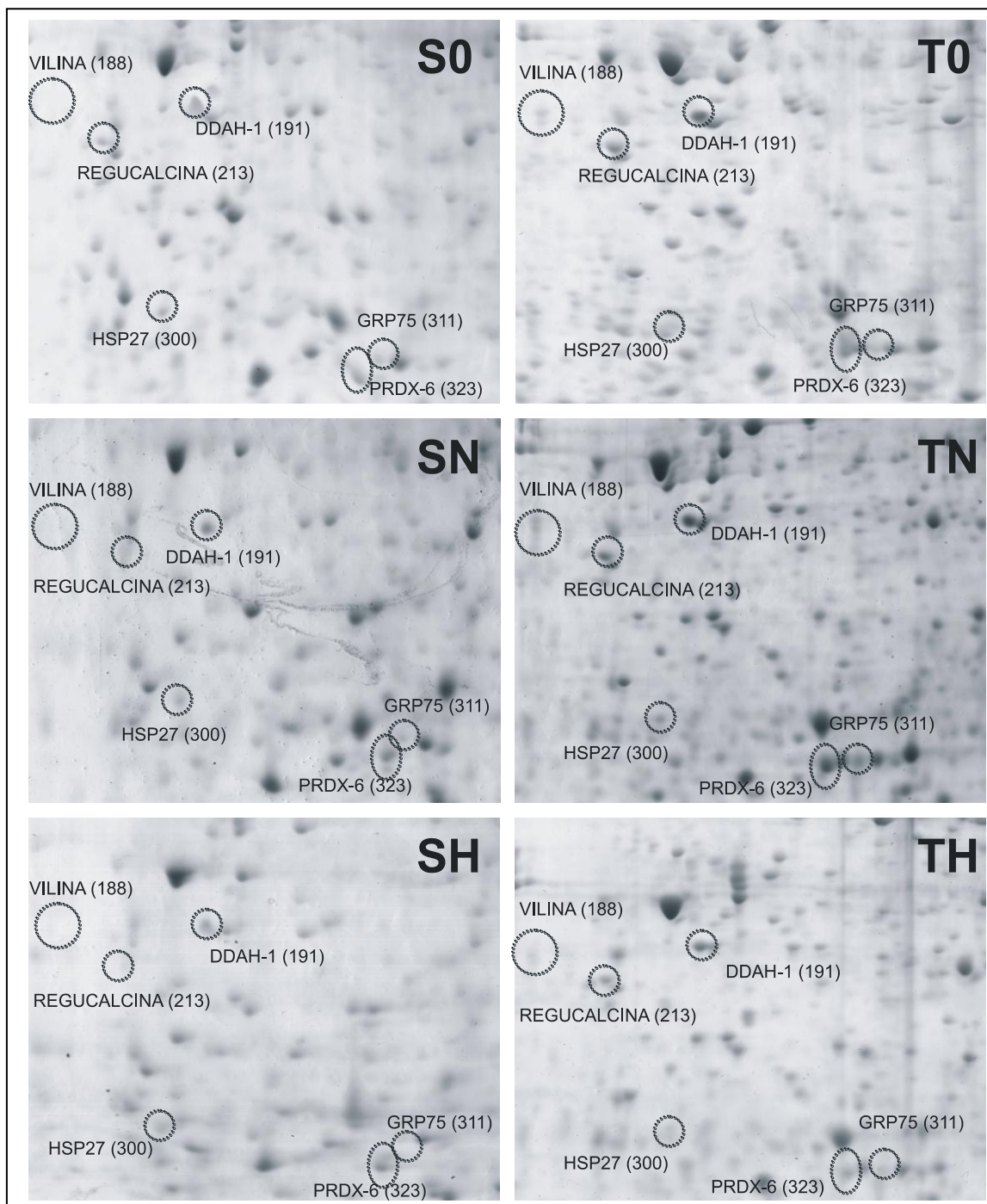


Figura 4.7. Imagens da região de 20-45kDa e pI de 5-6 do experimento 2. Imagem representativa dos três *pools* de cada grupo experimental. Em destaque, as proteínas DDAH-1 (spot 191), Regucalcina (spot 213), vilina (spot 188), PRDX-6 (spot 323), GRP75 (spot 311) e HSP27 (spot 300).

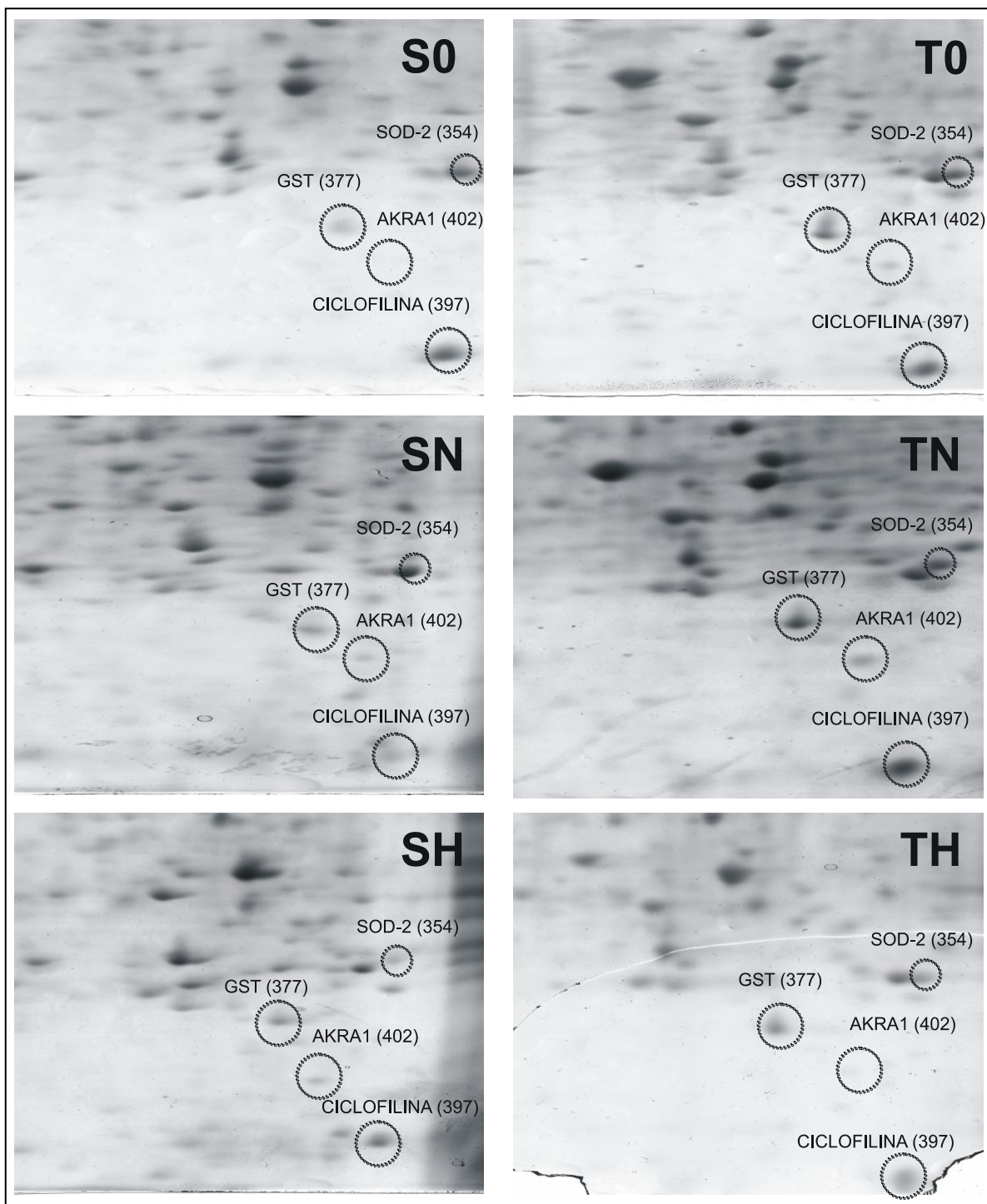


Figura 4.8. Imagens da região de 10-30kDa e pI de 6-7 do experimento 2. Imagem representativa dos três *pools* de cada grupo experimental. Em destaque, as proteínas ciclofilina (spot 397), GST (spot 377) e AKRA1 (spot 402).

Tabela 4.4- Descrição de outras proteínas com expressão diferencial entre grupos

SPOT	NOME	pI/MW-T	pI/MW-E	S0	T0	SN	TN	SH	TH	p<0,05
112	UbCitC redutase	7,7/42,9	5,5/51,4	323	232	204	228	193	175	S0xT0
373	ATP sintase	9,6/59,8	5,5/20,7	465	443	522	362	513	346	SNxTN
235	FTE	8,6/34,9	6,4/34,4	400	319	768	661	654	560	T0xSN
275	Enoil-CoA HIDR-Mit	8,3/31,5	6,4/29,2	1190	886	1457	1208	1302	825	S0xT0
277	Enoil-CoA HIDR-Mit	8,3/31,5	5,7/ 29,7	146	nd	345	168	210	124	S0xT0
168	Acil-CoA DSH	8,1/44,3	6,1/43,8	155	161	342	154	166	151	SNxTN
248	IDH-1	6,9/46,7	6,4/33,0	324	606	323	502	579	387	S0xT0/SNxTN/TNxTH
252	Enoil-CoA HIDR-Per	8,5/35,0	6,2/33,0	142	55	337	292	213	204	T0xSN
253	Enoil-CoA HIDR-Per	8,5/35,0	6,2/32,8	365	257	325	245	168	129	ns
305	TIM	7,4/26,6	6,3/27,4	280	526	281	441	408	331	S0xT0/SNxTN
102	Enolase	7,5/47,2	6,4/52,0	531	780	542	876	782	378	SNxTN
302	Frutose 1,6BPase	7,8/36,4	5,5/27,8	nd	252	192	198	72	70	T0 xS0
219	G3PDSH	6,8/37,6	6,3/37,2	66	nd	271	177	109	242	TNxTH/T0xSN/T0xTH
215	Malato DSH-1	6,5/36,5	6,3/37,8	255	170	532	265	337	204	SNxTN
149	ACY-1	47,7/41,7	5,4/45,3	540	205	237	456	259	329	S0xT0
150	ACY-1	41,7/41,7	5,7/45,4	417	202	346	427	333	363	S0xT0
135	beta-actina	5,1/41,7	6,3/46,7	189	270	896	423	147	434	SHxTH/SNxSH
139	beta-actina	5,1/41,7	6,1/46,3	213	373	384	289	270	186	SHxTH/TNxTH/SNxSH
158	beta-actina	5,1/41,7	5,8/44,9	28	162	224	198	nd	118	SNxSH
243	tropomiosina	4,4/32,3	4,7/33,6	221	173	494	185	148	143	ns
250	PDZ domain cont	57,0	6,5/32,8	96	71	247	206	286	nd	T0xSN/T0xSH
268	cristalin Lambda	9,7/8,6	5,8/30,6	49	75	157	166	117	nd	T0xSN
130	GLN sintase	7,0/42,3	6,2/47,2	249	92	443	201	76	253	T0xS0
236	nitrilase	7,3/30,7	5,3/34,6	41	nd	nd	76	nd	nd	S0xT0/SNxTN
281	NE α SPECTRIN	5,6/118	6,1/29,3	nd	56	98	119	46	13	TNxTH
400	N-myc RG	4,2/41,6	5,6/48,6	189	nd	nd	31	nd	191	S0xT0
361	aldeído DSH	7,0/56,5	6,3/22,4	135	351	171	267	336	170	SHxTH
75	udp-glicose DSH	7,6/54,9	6,2/60,3	71	158	621	135	277	87	ns
247	3-HBTDSH		5,8/33,2	166	174	412	240	108	215	ns
223	carboxilesterase Hep	6,6/62,3	5,9/36,8	129	38	nd	133	125	44	SNxSH
234	carbonil redutase	7,1/30,4	6,2/34,7	436	100	464	375	395	234	S0xT0/TNxTH

Tabela 4.4. Algumas destas proteínas foram selecionadas para estudo por apresentarem participação em outros mecanismos associados aos efeitos adaptativos do treinamento físico sobre a circulação renal de coelhos. Descrição da abreviatura, spot correspondente e intensidade média (área x pixels) de cada grupo experimental, com comparação dos respectivos ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW), teóricos (T) e experimentais (E), e relações inter-grupo com significância estatística (p<0,05). nd = não detectado; ns = não significativo.

Tabela 4.5. Descrição dos spots identificados como albumina.

SPOT	NOME	pI/MW-T	pI/MW-E	S0	T0	SN	TN	SH	TH	p<0,05
38	albumina	6,2/68,9	5,7/80,7	70	414	148	707	43	288	S0xT0
39	albumina	6,2/68,9	5,9/80,9	nd	140	nd	473	83	89	SNxTN
40	albumina	6,2/68,9	5,7/80,1	nd	201	nd	242	nd	125	S0xT0/SNxTN
43	albumina	6,2/68,9	5,8/78,3	206	904	530	1291	127	1252	S0xT0/SNxTN/SHxTH
50	albumina	6,2/68,9	5,8/75,3	nd	80	nd	172	nd	43	SNxTN
100	albumina	6,2/68,9	6,1/52,7	45	243	303	650	247	291	S0xT0
117	albumina	6,2/68,9	5,8/49,7	nd	190	121	356	26	167	SNxTN/TNxTH/SHxTH
123	albumina	6,2/68,9	5,7/48,8	162	651	317	706	46	317	S0xT0/SNxTN/SNxSH/TNxTH

Tabela 4.5. Os dados são apresentados com intensidade média (área x pixels) de cada grupo experimental do experimento 2 e comparação dos respectivos ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW), teóricos (T) e experimentais (E), e relações inter-grupo com significância estatística (p<0,05). nd = não detectado; ns = não significativo.

5- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do presente estudo demonstram que o treinamento físico é capaz de modificar o fenótipo do córtex renal de coelhos, aperfeiçoando sua capacidade de resposta ao estresse. A investigação proteômica preliminar (experimento 1) que separou através de eletroforese bidimensional as proteínas extraídas do córtex renal de coelhos treinados e sedentários, cuja circulação renal não havia recebido qualquer tipo de tratamento com glicose, tendo sido exclusivamente lavada com solução nutriente para remoção dos elementos do sangue, revelou que o treinamento físico é capaz de aumentar de forma significativa a expressão da proteína APO-A1 e de suas isoformas (312).

5.1- Apolipoproteína A-1 (APO-A1)

A APO-AI é a principal proteína estrutural do HDL, que reconhecidamente apresenta importante participação na proteção cardiovascular (313-315). A molécula de HDL participa do transporte reverso do colesterol e encontra-se envolvida nas vias de sinalização do metabolismo do colesterol, apresentando relevante papel na reversão e na prevenção da progressão da doença vascular (316). Sabe-se que o HDL apresenta ações biológicas adicionais em diferentes células como plaquetas, células renais e endotélio vascular. Ademais, foi recentemente demonstrado que o HDL também apresenta efeitos ateroprotetores, aumentando a produção de NO através da estimulação da eNOS (316). Apesar da apolipoproteína-AII apresentar impacto negativo na ativação da enzima, tanto HDL como a APO-AI aumentam a atividade da eNOS através de fosforilação envolvendo ativação da AMPK após a associação entre APO-AI e eNOS (316-318). Estes resultados preliminares sugerem que a produção de NO induzida por HDL/Apo-AI apresente papel crítico na fisiologia do endotélio vascular, incluindo a circulação renal. Apesar de não ter sido investigada a expressão da eNOS no córtex renal destes animais, o aumento da expressão da APO-AI pode estar envolvida no fenômeno adaptativo observado na circulação renal após o exercício dinâmico crônico conforme demonstrado previamente (280).

Entretanto, a metodologia de extração de proteínas utilizada no experimento 1, apesar de frequentemente descrita na literatura como compatível com a visualização de abundante quantidade de proteínas provenientes do córtex renal de roedores (319), não permitiu, conforme pode ser observado na figura 4.1, a visualização de número significativo de proteínas em nossas condições experimentais. Neste sentido, com o intuito de incluirmos outras proteínas, como as de membrana e de pI mais alcalino, modificamos o protocolo de

extração a fim de elevar seu poder de solubilização. De fato, conforme pode ser evidenciado nas figuras 4.2, 4.3 e 4.4, a introdução de 0,5M de tiouréia na solução de extração, aumentou a quantidade de proteínas extraídas da amostra, principalmente daquelas com pI mais alcalino. Entretanto, este procedimento, pode ter comprometido a resolução das proteínas situadas na faixa ácida de pH compreendida entre 3 e 5 impossibilitando a visualização da APO-A1 identificada no experimento anterior.

Apesar de maior potencial solubilizador, garantindo a extração de quantidade mais elevada de proteínas da amostra, especialmente aquelas que por sua elevada carga, migram durante a primeira dimensão para pontos extremos mais alcalinos, a possível presença de impurezas em preparações comerciais de tiouréia, pode comprometer a resolução das proteínas da faixa ácida (pH 3-5) das fitas de gel (*strips*) durante a focalização isoeletrica (320,321).

Mesmo assim, apesar de não confirmarmos os resultados anteriormente descritos para APO-A1 no experimento 2, identificamos outras importantes alterações na expressão de proteínas do córtex renal induzidas pelo treinamento físico. Apesar de algumas serem alteradas pela glicose elevada, é possível que este efeito do treinamento físico sobre o tecido renal revele parte dos mecanismos envolvidos na maior biodisponibilidade de NO já verificados na circulação renal de animais treinados. Neste contexto, observamos aumentos significativos na expressão de enzimas com atividade antioxidante, função chaperona e capacidade de regulação da síntese de NO que podem, ao lado da maior expressão da APO-A1, representar um conjunto de respostas adaptativas responsáveis não apenas pela maior resposta de vasodilatação dependente de endotélio na circulação renal mas também pelo efeito protetor contra a glicose elevada.

Neste contexto, os resultados anteriormente descritos, que revelaram expressão diferencial em 40 proteínas, serão discutidos a partir de análise individual apenas das proteínas diretamente envolvidas nas alterações da reatividade vascular e no efeito protetor contra a glicose elevada mediado pelo treinamento físico na circulação renal de coelhos. Inicialmente serão discutidas duas proteínas de estresse (HSP27 e HSP60), quatro proteínas com ação anti-oxidante (Peroxiredoxina-6, glutationa transferase, proteína ligante de selênio e albumina), e duas proteínas envolvidas na regulação da enzima eNOS (dimetilarginina aminohidrolase e regucalcina).

5.2- Proteínas de estresse (*Heat shock proteins*)

Conforme evidenciado na tabela 4.3, demonstramos que o treinamento físico é capaz de aumentar de forma significativa a expressão de proteínas de choque térmico (*Heat-Shock Protein*), também conhecidas como proteínas de estresse com pesos moleculares de 27 (HSP27) e 60kDa (HSP60) representando importante mecanismo de defesa endógena capaz de manter a integridade tecidual dos rins frente a estímulos agressores como o estresse oxidativo.

5.2.1- HSP27

A proteína *Heat Shock Protein* (HSP) de 27kDa (HSP27), pertence à família das pequenas proteínas de estresse que além de auxiliar no processo de dobramento de novas proteínas, participa também, da preservação e reestruturação do citoesqueleto celular. Essa proteína é responsável pela dinâmica dos microfilamentos de actina e encontra-se abundantemente localizada no endotélio vascular e capilares glomerulares do córtex renal além das células mesangiais e podócitos, todas estas, estruturas envolvidas nas alterações morfológicas renais associadas a nefropatia diabética (322).

A HSP27, que pode ter a expressão e a atividade controlada pelo VEGF(323), encontra-se envolvida na migração das células endoteliais durante o processo de angiogênese (322) e é fundamental para controlar a organização do citoesqueleto celular durante a ativação das integrinas vasculares por modificações hemodinâmicas (324), tomando parte neste caso, na sinalização de eventos mediados pelos estímulos agudos do exercício físico.

Apesar de apresentar peso molecular aproximado em torno de 27kDa, esta proteína, quando não fosforilada, é capaz de interagir entre seus pares e formar grandes agregados de até 800kDa. Nestas condições, inibem a polimerização da actina protegendo os microfilamentos de estímulos que ameacem a integridade celular, como é o caso do estresse oxidativo (325). Entretanto, quando fosforiladas, apresentam alterações em sua estrutura quaternária, que provoca dissociação de tais agregados, e permite a adição controlada de monômeros da forma globular da actina caracterizando a polimerização deste filamento. Através deste procedimento, contribui para a regeneração da rede de microfilamentos do citoesqueleto e adequada recuperação celular após o insulto oxidativo (323).

O estresse oxidativo é capaz de promover fragmentações no citoesqueleto de actina que fazem parte do processo apoptótico. Neste sentido, a HSP27 é capaz de proteger a célula endotelial através de mecanismos que envolvem a interação e a inibição de componentes importantes da via de sinalização apoptótica como o complexo caspase (326), a extrusão mitocondrial do citocromo c (323), e a degradação de proteínas ubiquitinadas que, se não

fossem imediatamente destruídas, ativariam o processo apoptótico durante o estresse oxidativo celular (327).

A fosforilação da HSP27, responsável pela reorganização do citoesqueleto de actina após insultos inflamatórios e oxidativos, respectivamente provocados por citocinas inflamatórias como TNF- α e a IL-1 β e espécies reativas de oxigênio, é mediada pela ativação da cascata p38 MAPK -MAPKAPK-2 e diretamente envolvida na proteção da integridade do endotélio (328,329). Neste contexto, a aterosclerose, que se inicia a partir da disfunção da célula endotelial, tem sido associada a reduções na expressão da HSP27 cujos níveis plasmáticos em pacientes com a doença apresentam-se significativamente menores do que o observado em indivíduos saudáveis (330).

Em células endoteliais provenientes do cordão umbilical humano (HUVEC), o aumento da expressão da HSP27 foi capaz de prevenir apoptose induzida por hipóxia em efeito protetor que persistia por 2 horas após o insulto e resultava em alterações morfológicas do citoesqueleto de actina associadas à regeneração do filamento (331). Tal processo, associado ao pré-condicionamento isquêmico, depende da fosforilação da HSP27 e representa também, o mecanismo pelo qual as estatinas conferem proteção antioxidante a células do músculo liso vascular (323). Evidências mais recentes demonstram que a rápida desintegração da monocamada de células endoteliais em eventos isquêmicos frente à depleção de ATP, e que se encontra associada à desorganização dos filamentos de actina, pode ser prevenida através de aumento da expressão da HSP27 (332).

Acredita-se que a presença da HSP27 reduza o nível intracelular de ROS e também extinga os efeitos pró-oxidantes mediados pelo TNF- α que envolvem peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (323). De fato, o tratamento de células endoteliais extraídas da artéria pulmonar de ratos com TNF α , lipopolissacarídeo ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂), induz a expressão da HSP27 através da ativação do fator de transcrição de *heat shock* (HSF-1) que consistentemente tem sido descrito como inicializador da resposta celular frente à agressão oxidativa e que é capaz de aumentar a expressão desta e outras proteínas de estresse (333).

Neste contexto, verificamos aumento significativo da expressão da proteína HSP27 no córtex renal de animais treinados que pode contribuir, adicionalmente a suas funções de molécula chaperona, para melhor reorganização do citoesqueleto de actina das células endoteliais frente a desafios impostos pelo estresse oxidativo.

A figura 5.1 mostra a intensidade (área x pixels) média relativa aos 3 *pools* representativos de cada grupo experimental com destaque para diferença significativa encontrada entre os grupos que não receberam qualquer tratamento com glicose. A consulta a tabela 4.3 revela que a proteína HSP27, apesar de apresentar peso molecular experimental

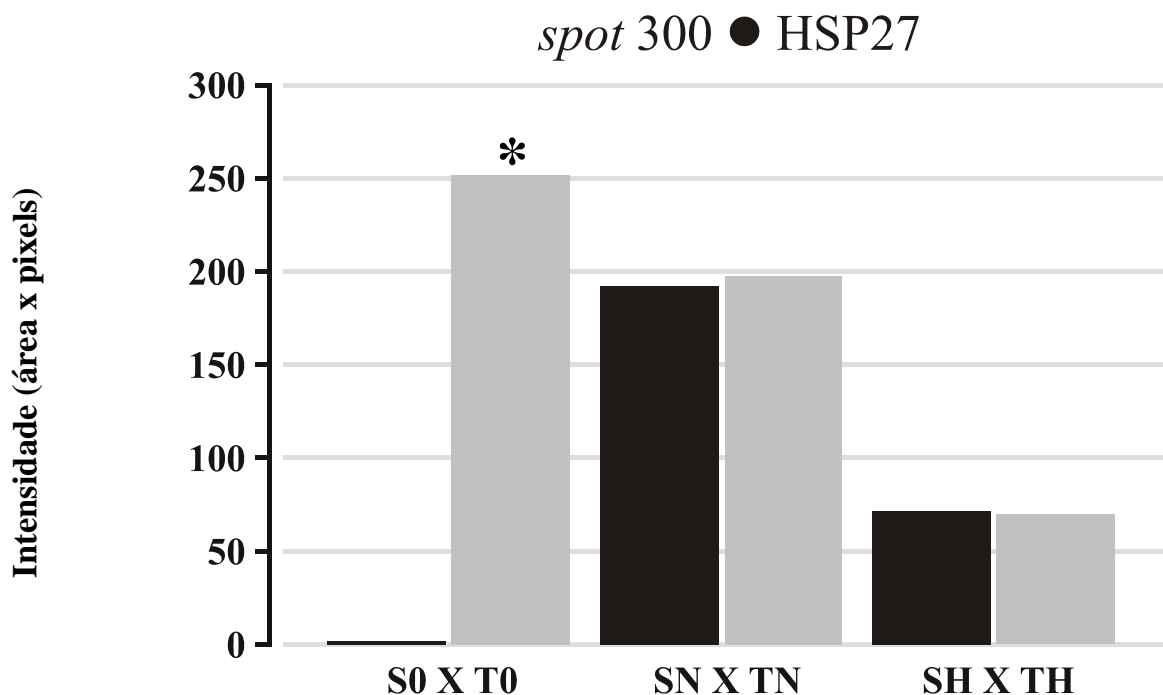


Figura 5.1. Intensidade da HSP27 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína de estresse de 27kDa (HSP27; *spot* 300). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs S0.

semelhante ao teórico, possui desvio de seu ponto isoelétrico para o lado mais ácido sugerindo a existência de fosforilação que conforme discutido anteriormente, é capaz de promover efeito protetor sobre as células endoteliais contra a ação deletéria do estresse oxidativo.

A ausência de diferença significativa sobre a expressão da HSP27 nos grupos sedentário e treinado, tratados com concentração normal (SN e TN) ou elevada de glicose (SH e TH) pode indicar a formação de agregados oligoméricos passíveis existir diante de situações que ameaçam a integridade celular. Neste contexto, é possível que o maior número de proteínas HSP27, encontradas no córtex renal de animais treinados (T0), tenha permitido a formação de grandes agregados oligoméricos que não podem ser visualizados por seu elevado peso molecular. Este fenômeno poderia proteger o citoesqueleto das células do córtex renal, incluindo as células endoteliais, frente ao estresse oxidativo provocado pela glicose elevada e também, pelas próprias condições experimentais que mimetizam breve período de isquemia e reperfusão.

5.2.1.1- Vilina

Em nossos resultados, foi identificada outra proteína com importante participação na estabilização do citoesqueleto de actina frente a desafios da homeostasia celular. Trata-se da proteína vilina, com expressão significativamente aumentada no córtex renal de animais treinados em efeito que continua a ser observado mesmo diante do tratamento da circulação renal com concentração normal de glicose. A figura 5.2 mostra a intensidade média da proteína relativa em cada grupo experimental.

A vilina (ou ezrina) é uma proteína que faz parte da família das ERM (ezrin/radixin/moesin) que atuam na conexão entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina e desempenham importante papel na modulação do formato e da motilidade celular, assim como na sinalização de eventos que se processam neste ambiente (334). Ao lado da fimbrina, participa da estrutura das microvilosidades, alvo de ataque de agentes oxidantes que ao induzirem sua fragmentação, contribuem para o processo apoptótico verificado nas estruturas renais durante a nefropatia diabética (335).

A migração de proteínas ERM desfosforiladas para o plasmalema, facilita o rompimento estrutural das microvilosidades e contribui para a rápida dissolução do citoesqueleto de actina associado à membrana. De fato, a vilina quando fosforilada em seu resíduo Thr-567 pode ser encontrada fortemente associada com a actina contribuindo para a estabilização das vilosidades nos túbulos proximais do córtex renal (336), porém, quando glicada pelos AGEs, sua fosforilação é impedida e a desorganização do citoesqueleto se

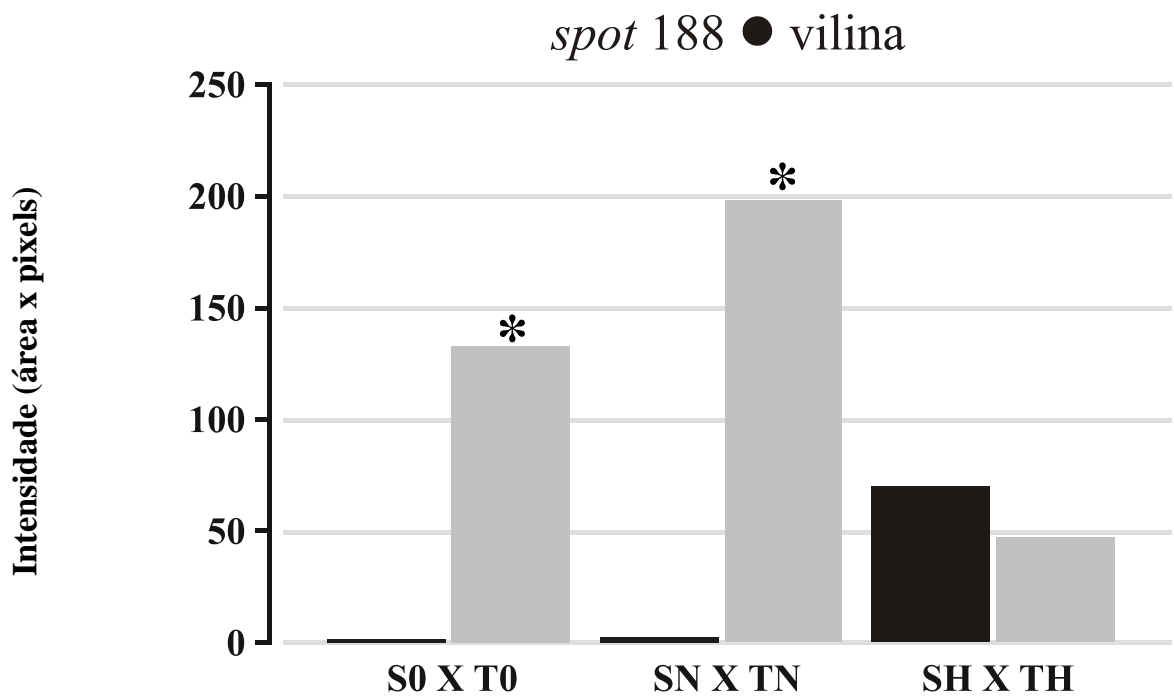


Figura 5.2. Intensidade da vilina entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína vilina (*spot 188*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs grupos S0, SN.

sucedendo contribuindo para as alterações morfológicas renais associadas a nefropatia diabética (337).

A análise dos resultados expostos na tabela 4.3 indica desvio do ponto isoelétrico da proteína para o lado ácido do gel sugerindo que esta proteína, com expressão significativamente mais elevada no córtex renal de animais treinados, esteja a semelhança do proposto para HSP27 igualmente fosforilada.

Desta forma, os aumentos na expressão de HSP27 e vilina podem contribuir para citoproteção renal através do aperfeiçoamento da dinâmica de estabilização e reorganização dos filamentos de actina. De fato, a HSP27 também pode exercer efeito protetor, desempenhando sua função chaperona sobre a vilina, já que também é encontrada nas regiões da borda em escova do túbulo proximal e previne a dissociação da vilina do citoesqueleto verificada após a hipóxia (337,338).

A análise da figura 5.2 demonstra que a semelhança do que ocorre com a HSP27, quando a circulação dos animais é tratada com glicose elevada, não existe diferença significativa entre os grupos sedentário e treinado. Além do mais, nestas condições experimentais, existe clara tendência de redução na expressão destas proteínas (HSP27 e vilina) em ambos os grupos sedentário e treinado.

Alternativamente, o efeito verificado da glicose elevada sobre a expressão de proteínas no córtex renal de animais sedentários e treinados pode indicar que o estresse osmótico e oxidativo associado ao tratamento com concentração de glicose de 50mM é excessivo e capaz de provocar alterações na expressão de proteínas que asseguram a integridade do citoesqueleto. De qualquer forma, o efeito adaptativo associado ao treinamento físico e observado nas preparações experimentais sem tratamento com glicose (S0 e T0) ou após perfusão com concentração fisiológica de glicose (SN e TN) pode conferir importante melhoria sobre a integridade das membranas celulares do córtex renal, incluindo o tecido endotelial, e prevenir eventos apoptóticos associados ao estresse oxidativo crônico já descrito em modelos de diabetes ou tratamentos prolongados com soluções contendo elevada concentração de glicose.

Interessantemente, foi recentemente descrito em células endoteliais, importante associação entre o citoesqueleto de actina, proteínas ERM (incluindo a vilina) e pequenas invaginações da membrana plasmática destas células, conhecidas como cavéolos (339). Tais microdomínios abrigam as enzimas eNOS e atuam como mecanosensores em resposta ao estresse físico exercido na superfície da membrana e podem hipoteticamente, representar indícios para elucidação de mecanismo da regulação positiva da eNOS mediada pelo estresse de cisalhamento vascular.

De fato, a regulação positiva de longo prazo da eNOS é quase sempre acompanhada por alterações morfológicas de alongamento da célula endotelial sugerindo que as mesmas vias de sinalização que mediam a regulação do gene da eNOS mediam também, a regulação do citoesqueleto de actina. Tal processo é acompanhado pela fosforilação da HSP27 e ocorre durante a ativação da eNOS induzida por H₂O₂, que inicializa o processo, ativando a cinase dependente de cálcio/calmodulina 2 (CaMKII) e a cinase janus 2 (JAK 2) (340).

Estas adaptações provocadas pelo treinamento físico no córtex renal de coelhos poderiam explicar não apenas a maior resposta de vasodilatação dependente de endotélio encontrada na circulação renal destes animais em virtude da maior biodisponibilidade de NO mas também, o já mencionado efeito protetor associado ao exercício dinâmico crônico sobre a ação deletéria da glicose elevada.

5.2.2- HSP60

A proteína de estresse de 60kDa (HSP60), a semelhança de outras proteínas de estresse, apresenta genes que são regulados por diferentes fatores perturbadores da homeostasia celular como o aumento da temperatura, a hipóxia e o estresse oxidativo (341,342). Encontrada em todos os tecidos do organismo, aonde participa de processos citoprotetores prevenindo a desnaturação e promovendo o reparo de proteínas danificadas (343), esta proteína desempenha importante função, ao lado da proteína de estresse de 70kDa (HSP70), no processamento de polipeptídeos importados pela mitocôndria (341).

De fato, sua modificação provocada por estresse oxidativo severo pode resultar em defeitos na biogênese mitocondrial e declínio na função respiratória como já foi estabelecido em células de pacientes portadores da doença de Parkinson e Alzheimer (344). Por outro lado, o aumento de sua expressão tem sido associado a vantagens no crescimento e na proteção celular, em parte devido a sua capacidade de inativar a proteína supressora de tumor p53 e outras moléculas inicializadoras do processo apoptótico (345).

Neste contexto, diversos autores consideram a HSP60 uma proteína com ação anti-apoptótica (343,346,347), efeito que já foi evidenciado em células do endotélio vascular (348) e também, na vasculopatia renal (349). Ao lado da HSP27, esta proteína vem sendo considerada indispensável à proteção celular contra os insultos oxidativos provocados pela isquemia e reperfusão e também, associadas a melhorias funcionais pós insulto durante a recuperação do tecido (350).

A incubação de linfócitos humanos com HSP60 e HSP70 induz a regulação negativa do indutor de apoptose celular (Fas) em mecanismo que depende da liberação de NO

levantando suspeitas de que as duas proteínas também estejam de alguma forma, associadas à ativação da NOS (351). Tal efeito foi posteriormente comprovado em células da área ventrolateral rostral da medula (RVLM) provenientes do tronco cerebral de ratos e também resultava na inibição da apoptose mitocondrial (352).

Alguns estudos realizados com indivíduos diabéticos demonstram redução na expressão das proteínas HSP60 e HSP70 em tecidos como o músculo esquelético e cardíaco e sugerem a existência, nestes pacientes, de falência dos mecanismos celulares associados à resposta ao estresse (353,354,355,356). De fato, foi recentemente proposto que o aumento do estresse oxidativo e a incapacidade de síntese de proteínas de estresse, contribui para o desenvolvimento da nefropatia diabética o que incentiva o desenvolvimento de terapias alternativas que aumentem a expressão da proteína (357). Neste contexto, a suplementação com ácido alfa-lipóico, que exerce sua ação anti-oxidante através da presença em sua molécula de grupo tiol ativado, mostrou-se capaz de aumentar a expressão de HSP60 no rim de ratos diabéticos reduzindo o estresse oxidativo e revertendo parcialmente os marcadores histológicos associados a glomeruloesclerose (355).

Neste contexto, demonstramos em nossos resultados, que o treinamento físico é capaz de elevar de forma significativa no córtex renal de coelhos, a expressão da proteína HSP60 podendo representar importante mecanismo de proteção das células do córtex renal frente ao estresse oxidativo mediado pela glicose elevada. A análise da figura 5.3 demonstra que o treinamento físico promove aumentos consistentes na expressão desta proteína que permanecem significativamente maiores em relação ao grupo sedentário mesmo diante de tratamento da circulação renal com concentração elevada de glicose.

Algumas evidências demonstram que condições fisiopatológicas associadas ao estresse oxidativo, como é o caso da nefropatia diabética, promovam semelhante aumento na expressão de proteínas de estresse (358). Este fenômeno seria coerente com o fato da transcrição gênica destas proteínas estar associada a perturbações homeostáticas como, por exemplo, o estresse oxidativo.

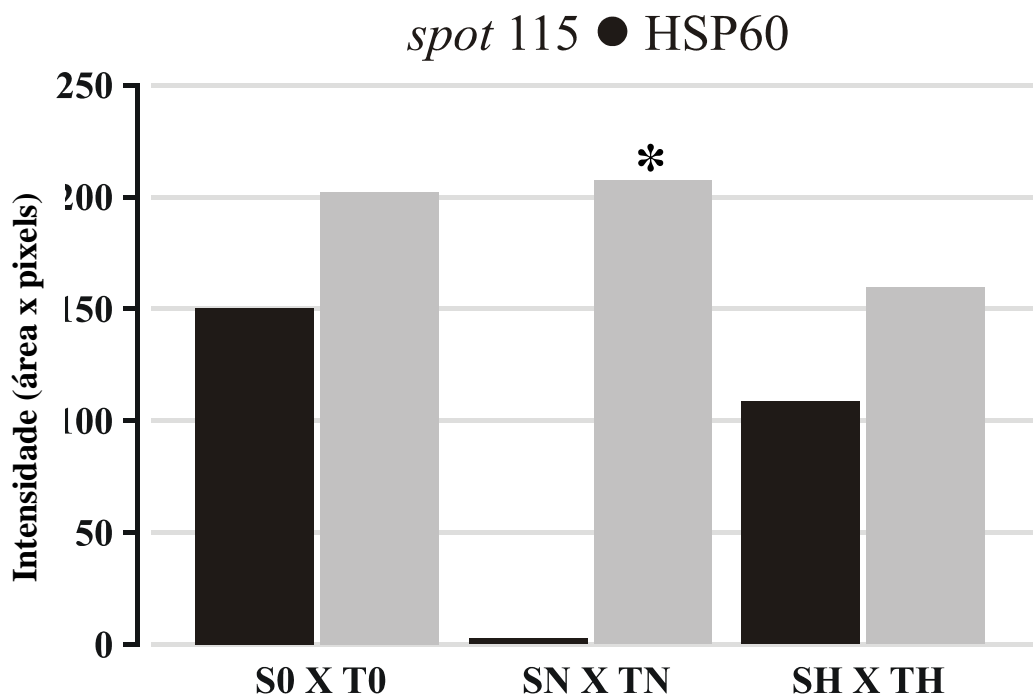


Figura 5.3. Intensidade da HSP60 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína de estresse de 60kDa (Heat Shock Protein 60, HSP60; *spot 115*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs SN.

Neste sentido, já foi evidenciado associação entre os danos protéicos mediados por ROS e a resposta celular ao estresse induzida pelo estresse oxidativo. Calabresi e colaboradores (358) reportaram a existência de correlação positiva entre a formação de proteínas carbonila e dicarbonila, produzidas a partir da glicação protéica mediada por AGEs, e os níveis de HSP60 presentes nos linfócitos de pacientes diabéticos (358,359). Da mesma forma, em modelo experimental que investigou o efeito de elevada concentração de glicose sobre as células tubulares renais, verificou-se aumento significativo da expressão de HSP90 e HSP70 (360). A indução das proteínas de estresse parece ocorrer sempre que existe aumento na danificação protéica pelo estresse oxidativo, o que requer a participação das HSPs para regenerá-las ou conduzi-las a degradação (361).

Assim, é possível que tanto o treinamento físico quanto condições fisiopatológicas promovam estímulos que induzam aumentos na expressão de proteínas associadas a defesa tecidual. Tal discussão deve levar em consideração os conceitos de hormese discutidos no primeiro capítulo desta tese aonde pequenos estímulos agressores permitem a adaptação da célula enquanto que estímulos exagerados promovem a destruição da mesma. É razoável que mesmo diante de estresse oxidativo extremo, como o proporcionado pela glicose elevada, as células procurem responder adequadamente ao evento agressor, aumentando a expressão de proteínas de estresse (HSP). Entretanto, a falência destes mecanismos, provocada pelo próprio estresse oxidativo pode ser responsável por algumas divergências nos resultados de estudos que investigam a questão.

Recentemente se especulou que as respostas teciduais ao evento agressor, só existem após o acontecimento do insulto, muitas vezes impossibilitando a recuperação do tecido (331). Neste sentido, o treinamento físico, de intensidade moderada pode ser um importante recurso para aumentar a expressão destas proteínas e proteger preventivamente o tecido contra o insulto agressor.

Encontra-se bem evidenciado que o treinamento físico é capaz de aumentar a expressão de proteínas de HSP em tecidos como o músculo esquelético e cardíaco, ambos diretamente expostos aos sucessivos aumentos de temperatura e ROS associados a várias sessões agudas de exercício físico (362,363). No entanto, tais efeitos também já foram relatados em órgão não contráteis como o fígado e o baço (364,365,366) e podem estar presentes também no córtex renal de coelhos treinados conforme apresentado em nossos resultados.

O efeito cardioprotetor atribuído a proteínas de estresse induzidas após o pré-condicionamento isquêmico, também pode ser alcançado por melhorias no condicionamento

físico (331). Este fenômeno, já relatado em indivíduos com DM-2 (367), encontra-se em parte associado ao papel da HSP60 e da já mencionada HSP27 (368) e pode, conferir também proteção às células do rim.

Tais proteínas podem ter igualmente, participação nos mecanismos associados a maior resposta de vasodilatação na circulação renal de coelhos treinados descrita em nossos experimentos anteriores. Uma vez que a HSP60 é capaz, ao lado de outras proteínas de estresse, de aumentar a sobrevivência de células endoteliais e deprimir a apoptose mitocondrial no tronco cerebral de ratos em mecanismo mediado pelo NO é possível que também tenha participação no aumento da biodisponibilidade de NO relatada em nossos experimentos anteriores.

Conforme evidenciado na figura 5.3, apesar do tratamento da circulação renal com glicose elevada reduzir a expressão da HSP60 no córtex renal de animais treinados, tal efeito não é estatisticamente significativo e não abole completamente o efeito protetor do treinamento físico. Desta forma, o aumento da expressão da HSP60 pode ser parcialmente responsável pelo efeito protetor desempenhado pelo treinamento físico sobre a circulação renal protegendo-a contra os efeitos deletérios da glicose elevada.

A maior expressão das proteínas de estresse, HSP27 e HSP60, é capaz de aperfeiçoar a resposta celular renal frente a agentes agressores e pode fazer parte dos mecanismos preventivos associados ao exercício físico contra o desenvolvimento de doenças renais, que muitas vezes evoluem lentamente e somente se manifestam clinicamente após anos de alterações morfológicas acumulativas nos tecidos. Por outro lado, a indução da expressão da HSP60 poderá conferir efeito protetor às células do córtex renal de coelhos treinados mesmo diante do elevado estresse oxidativo normalmente associado a concentração elevada de glicose.

5.2.3- Outras alterações na expressão de proteínas de estresse

Uma outra proteína de estresse conhecida como **GRP75** (*glucose regulated protein* de 75kDa) ou **mortalina**, que integra a família das HSP de 70kDa, foi identificada em nossos experimentos e, apesar da verificação de expressão diferencial significativamente maior no córtex renal de coelhos treinados que tiveram a circulação renal tratada com concentração fisiológica de glicose não identificamos a mesma coerência nas modificações da expressão da proteína observada nas outras condições experimentais.

Aumentos na expressão da GRP75 são capazes de reverter marcadores histológicos associados a nefropatia diabética (357) e contribuir para aumentos na atividade da eNOS

(369) e inibir a apoptose em células do músculo liso (370) e do endotélio vascular (371). Além do mais, a indução de proteínas da família das HSP70 é capaz de proteger as células endoteliais da aorta de ratos, contra os efeitos deletérios do H₂O₂ (372) aumentando a biodisponibilidade de NO e evitando a formação de peroxinitrito.

Conforme apresentado na figura 5.4, a inconsistência dos resultados encontrados para GRP75 decorre do fato de que apesar da existência de diferença significativa na expressão desta proteína nos rins de animais sedentários e treinados tratados com concentração normal de glicose nenhum efeito adaptativo pode ser evidenciado na circulação renal de animais que não receberam qualquer tratamento de glicose. Além do mais, existe uma tendência de redução da expressão desta proteína quando a circulação renal de animais treinados é tratada com concentração elevada de glicose. Por outro lado, no córtex renal de animais sedentários, existe contrariamente, uma tendência de aumento na expressão desta proteína, quando a circulação renal é tratada com concentração elevada de glicose.

Tais resultados aparentemente desconexos, não permitem interpretações precisas para as modificações encontradas na expressão da GRP75 no córtex renal de coelhos e associadas ao efeito do treinamento físico e da glicose elevada. Conforme ressaltado anteriormente, é possível que alguns efeitos adaptativos do treinamento físico sobre o córtex renal não resistam ao elevado estresse associado ao tratamento com glicose elevada. A concentração de 50mM é incompatível com a prática clínica e pode representar agressão excessiva mesmo para células condicionadas. Interessantemente, existem evidências de que a ativação da enzima glicogênio sintase cinase (GSK-1) em situações de hiperglicemia, possa contribuir para repressão do fator de transcrição HSF-1, impedindo em determinadas condições, a adequada resposta celular frente ao estresse (373).

5.3- Proteínas antioxidantes

Demonstramos que o treinamento físico é capaz de aumentar de forma significativa no córtex renal de animais treinados, a expressão de proteínas antioxidantes como a peroxiredoxina-6, a glutathione transferase, a albumina e a proteína ligante de selênio, representando importante mecanismo de defesa endógena capaz de manter a integridade tecidual dos rins frente a estímulos agressores como o estresse oxidativo.

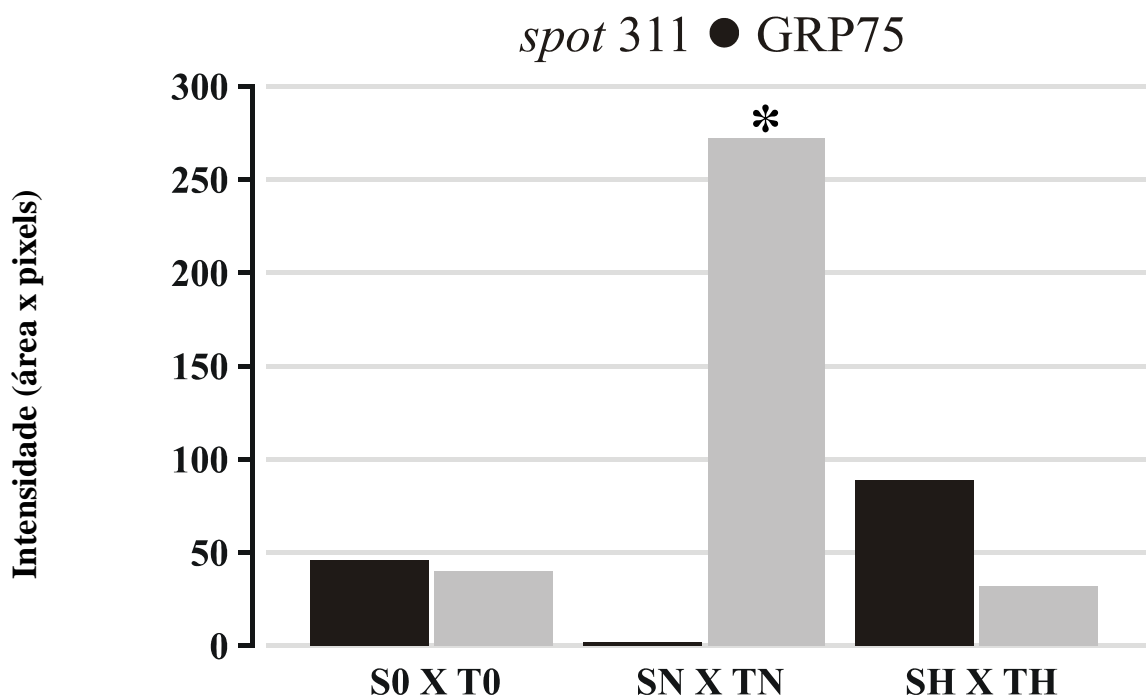


Figura 5.4. Intensidade da GRP75 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína regulada por glicose de 75kDa (*glucose regulated protein de 75kDa*, GRP75; *spot 311*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SN.

5.3.1- Peroxiredoxina-6

Anteriormente conhecida como Aop-2, a peroxiredoxina-6 (PRDX-6), é o único dos seis membros de uma família de antioxidantes (peroxiredoxinas) que apresenta, em seu sítio ativo, apenas um resíduo cisteína (1-Cys47) tiol-ativado (Cys-SH) envolvido na redução de peróxidos (374). A oxidação deste sítio concretiza sua ação antioxidante e resulta na formação de ácido sulfênico (Cys-SOH) haja visto que não existe, como ocorre nos outros membros da família, a presença de resíduo Cys-SH adicional que possibilitaria a formação de uma ponte disulfeto (375).

As peroxiredoxinas reduzem peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos derivados de fosfolipídios respectivamente a água e álcool com a utilização de equivalentes redutores derivados de moléculas que contenham grupamentos tiol (-SH), como é o caso da tioredoxina (376, 377). A PRDX-6, entretanto, apesar de poder ser reduzida por tiols não fisiológicos como o DTT, é regenerada *in vivo* através de elétrons provenientes da glutathiona reduzida (GSH) muito embora, também a **ciclofilina** (378), tenha sido envolvida nesta função (374).

Além da atividade peroxidase dependente de glutathiona, a PRDX-6 possui também atividade de fosfolipase A_2 e portanto, pode estar envolvida na sinalização intracelular mediada por prostaglandinas (379). Além disso, tem sido envolvida também, na proteção nuclear o que, ao lado de sua atividade antioxidante, contribui para a manutenção do estado redox reduzido essencial para o adequado funcionamento celular (380).

A abundância relativa das peroxiredoxinas em células de mamíferos parece proteger seus componentes celulares através da remoção de baixos níveis de peróxidos produzidos em decorrência do metabolismo celular normal. Por exemplo, além de remover hidroperóxidos derivados de fosfolipídios que se acumulam na membrana plasmática (381), em órgãos como o fígado, é capaz de inativar oxidantes circulantes e nos pulmões e epitélio gastrointestinal, compor linha de defesa inicial contra oxidantes tóxicos presentes no ar e nos alimentos (380).

Animais transgênicos que não expressam PRDX-6 apresentam níveis significativamente mais elevados de ROS, que são capazes de induzir apoptose celular e levar o organismo ao colapso (382,383,384). Neste contexto, sabe-se que o gene da PRDX-6 é altamente reponsivo a ROS sendo a enzima positivamente regulada diante de condições que envolvam estresse oxidativo celular (385).

Os peróxidos formados durante o estresse oxidativo podem funcionar como sinalizadores celulares para a produção de citocinas e fatores de transcrição como o TGF- α ,

que reconhecidamente eleva a produção de ROS através da regulação negativa de genes antioxidantes (386). Neste contexto, já foi demonstrado em células epiteliais da retina de camundongos, que o aumento da expressão da PRDX-6 é capaz de reduzir os ROS que seriam gerados em resposta a liberação de TGF- α (387).

A análise da figura 5.5 evidencia aumento significativo da expressão da proteína peroxiredoxina-6 no córtex renal de animais treinados que não receberam qualquer tratamento com glicose, tendência que se mantém em todas as outras condições experimentais que envolveram diferentes concentrações de glicose. Tal incremento da expressão da PRDX-6 poderá aumentar a capacidade renal de coelhos treinados de neutralização dos ROS e ao lado das já mencionadas proteínas de estresse que apresentaram expressão significativamente maior no córtex renal de coelhos treinados, exercer efeito citoprotetor e anti-apoptótico sobre este tecido.

Neste sentido, a rápida neutralização de peróxidos e hidroperóxidos poderia evitar o acúmulo de ROS e impedir a formação de peroxinitrito que, como já mencionamos, decorre da interação do ânion superóxido com o NO e ocorre durante a exposição tecidual a glicose elevada. Cumpre salientar no entanto, que esta alteração na expressão da PRDX-6, apesar de proteger o rim de animais treinados durante a exposição da circulação renal com glicose elevada também sofre alterações importantes nestas condições experimentais.

A figura 5.5 nos mostra que, apesar de não existir diferença estatisticamente significativa entre a expressão observada no córtex de animais treinados que tiveram a circulação renal tratada com glicose elevada (TH) e a expressão observada no córtex de animais sedentários que tiveram a circulação renal tratada com concentração fisiológica de glicose (SN), o que indicaria um efeito protetor associado ao treinamento, tanto em animais treinados como em sedentários, o tratamento da circulação renal com glicose elevada, reduziu de forma significativa a expressão da PRDX-6.

De qualquer forma, o treinamento físico é capaz de promover efeito consistente que induz aumento da expressão ou tendência de aumento em todas condições experimentais capaz de influenciar positivamente na atividade da enzima eNOS.

Por suas características anti-oxidantes dependentes de tiol, a PRDX-6 parece especializada em preservar o estado reduzido de grupos tiol presentes em outras proteínas. A eNOS apresenta dois domínios catalíticos. O primeiro deles possui atividade reductase (C-terminal) mediada por NADPH, FMN e FAD, enquanto que o segundo (N-terminal), possui atividade oxidase aonde heme, tetrahydrobiopterina (BH₄), oxigênio e L-arginina se ligam. O mecanismo catalítico da NOS envolve o transporte de elétrons mediado por flavina do C-

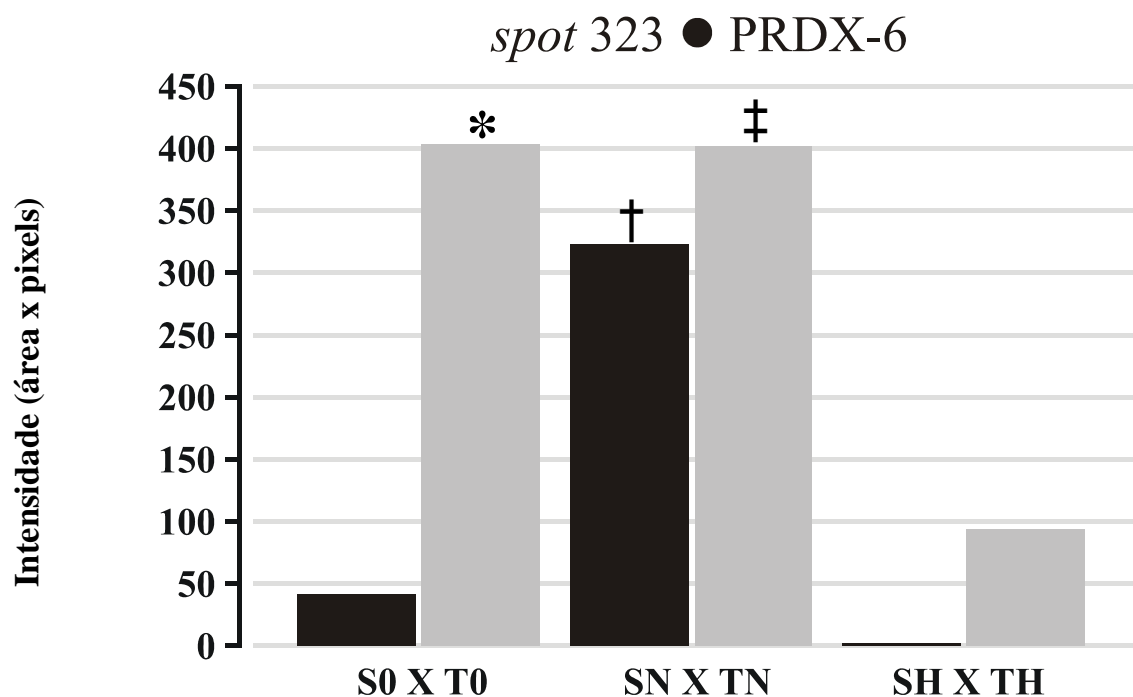


Figura 5.5. Intensidade da PRDX-6 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma 6 da proteína peroxiredoxina (PRDX-6; *spot 323*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs S0; † P<0,05 vs SH; ‡ P<0,05 vs TH.

terminal ao centro heme localizado no N-terminal aonde o oxigênio é reduzido e incorporado ao grupo guanidino da L-arginina para formar NO e L-citrulina (388).

No fundo de sua estrutura dimérica, existe um núcleo de zinco tetratiolato ($Zn[SH]_4$) com dois resíduos cisteína em cada subunidade (389). Estudos de cristalografia de raios-X demonstram que este núcleo precisa ser mantido em sua forma reduzida para assegurar a funcionalidade da enzima. A oxidação dos resíduos Cys precipita a formação de pontes disulfeto que impedem a ligação de zinco, BH_4 ou mesmo de L-arginina com a NOS (390). Este evento, de ocorrência facilitada em situações de estresse oxidativo, desestabiliza a organização dimérica da enzima desacoplando-a de sua atividade produtora de NO para transformá-la paradoxalmente, em fonte de ROS (96,391).

Já foi demonstrado em investigações realizadas para compreender os efeitos citotóxicos da glicose elevada, que o peroxinitrito é capaz de oxidar a enzima eNOS desacoplando-a de sua função produtora de NO e transformando-a em molécula produtora de ânion superóxido que contribui ainda mais para elevação do estresse oxidativo presente em condições fisiopatológicas como a nefropatia diabética (96,392).

Neste contexto, a PRDX-6 parece quimicamente preparada para desempenhar importante papel na manutenção do estado reduzido no núcleo de zinco tetratiolato da enzima impedindo sua oxidação por peróxidos e hidroperóxidos. A preservação da integridade da eNOS é assegurada também, por proteínas chaperona especialmente relacionadas com a redução do grupamento tiol presente em proteínas celulares. De forma análoga a PRDX-6, algumas proteínas bifuncionais que apresentam ao mesmo tempo atividade antioxidante e função chaperona, são capazes de reduzir diretamente o núcleo da eNOS e conservar sua função produtora de NO.

5.3.1.1- Outras alterações na expressão de proteínas bifuncionais

Em complemento a hipótese anteriormente descrita, foi recentemente proposto que a proteína disulfeto isomerase (PDI) é capaz de, em condições oxidantes, atuar como enzima redutase que restabelece a formação de grupamentos tiol em proteínas revertendo a formação de pontes disulfeto. Conforme evidenciado na figura 5.6, esta proteína também apresenta expressão significativamente maior no córtex renal de coelhos treinados que tiveram a circulação renal tratada com concentração fisiológica de glicose e pode, ao lado da PRDX-6, contribuir para manutenção da atividade da eNOS e por sua ação antioxidante participar dos mecanismos de aumento da biodisponibilidade de NO associados ao exercício físico e igualmente verificadas em nossos experimentos.

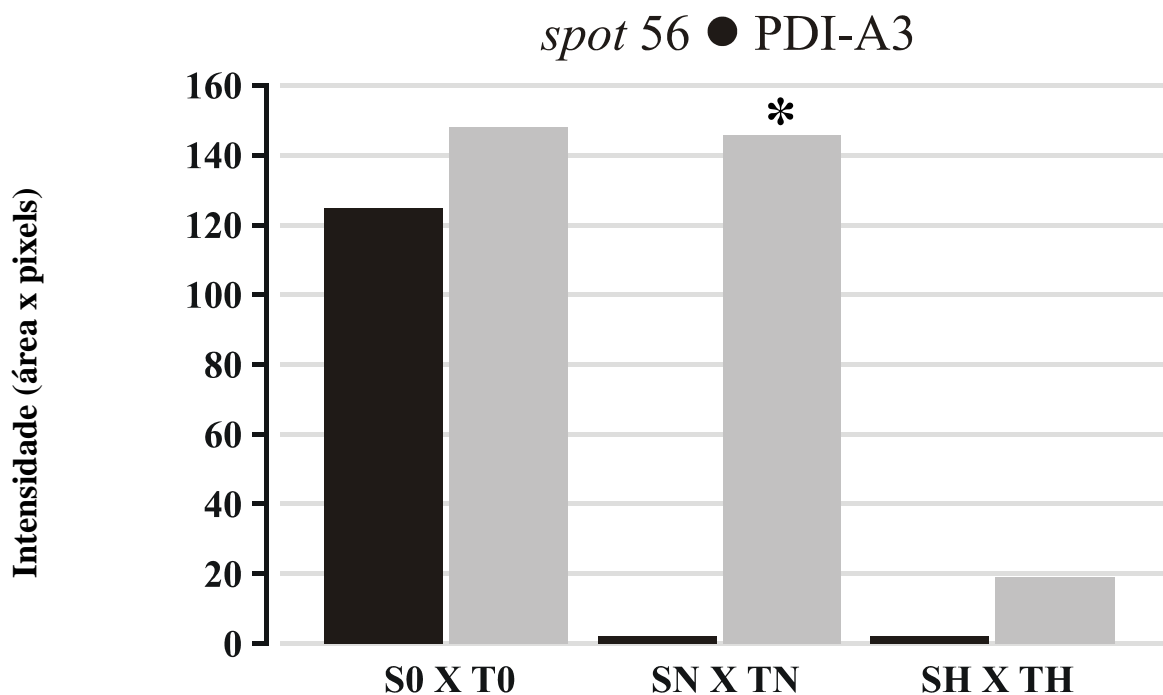


Figura 5.6. Intensidade da PDI-A3 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma A3 da proteína disulfeto isomerase (PDI-A3; *spot 56*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs SN.

A proteína disulfeto isomerase é um membro da superfamília das tioredoxinas abundantemente localizada no retículo endoplasmático de células mamíferas, que é encontrada em vários tecidos e altamente conservada entre as espécies. Com cerca de 510 aminoácidos é uma proteína multifuncional capaz de ao mesmo tempo, catalizar a formação e a redução de ligações disulfeto intra e inter moleculares. Sua atividade redutase, a semelhança das tioredoxinas, depende da reatividade de seus resíduos cisteína no tetrapeptídeo (-Cys-Gly-His-Cys-) localizado no N-terminal da molécula (393).

Sua isoforma A3, também conhecida como Erp57/GRP58 pode ser induzida por estresse e, sua maior expressão no córtex renal de animais treinados pode contribuir para a manutenção do estado reduzido dos resíduos cisteína do núcleo de zinco tetratiolato da eNOS o que representaria maior ativação da enzima e aumento da biodisponibilidade de NO no córtex renal de coelhos.

Coerente com sua multifuncionalidade, a PDI integra também, uma família de chaperonas conhecidas como foldases que aperfeiçoam o enovelamento protéico reorganizando pontes disulfeto incorretamente formadas em outras proteínas (394). Desta forma, atua como uma molécula chaperona catalizando reações de troca de grupos tiol em proteínas recém-sintetizadas. Apesar de existir predominantemente no retículo endoplasmático, a PDI também pode ser secretada pelas células endoteliais assim como, ser depositada em sua superfície, havendo atualmente, indícios de seu envolvimento no influxo de NO a partir da desnitrosilação da molécula de albumina (395,396).

O NO pode ser transportado no plasma na forma de nitrosotiois envolvendo tanto sua ligação com tiois de baixo peso molecular como a glutatona e a cisteína, ou com a albumina sérica (397). A PDI faz parte do *pool* dos tiois presentes na membrana, com capacidade para extrair o NO da albumina e regular a entrada deste gás no interior das células (398). Sua maior expressão no córtex renal de animais treinados poderá assegurar a maior biodisponibilidade do NO na circulação renal além de garantir, através de sua função chaperone, a integridade conformacional das proteínas.

De forma semelhante ao que ocorreu com a PRDX-6, o tratamento da circulação renal dos animais treinados com glicose elevada reduziu significativamente os aumentos de expressão provocados pelo treinamento físico sobre a PDI. Semelhante redução também foi verificada no córtex de animais sedentários quando a circulação renal recebeu tratamento com glicose ficando a expressão da proteína reduzida a valores indetectáveis através da tecnologia proteômica utilizada.

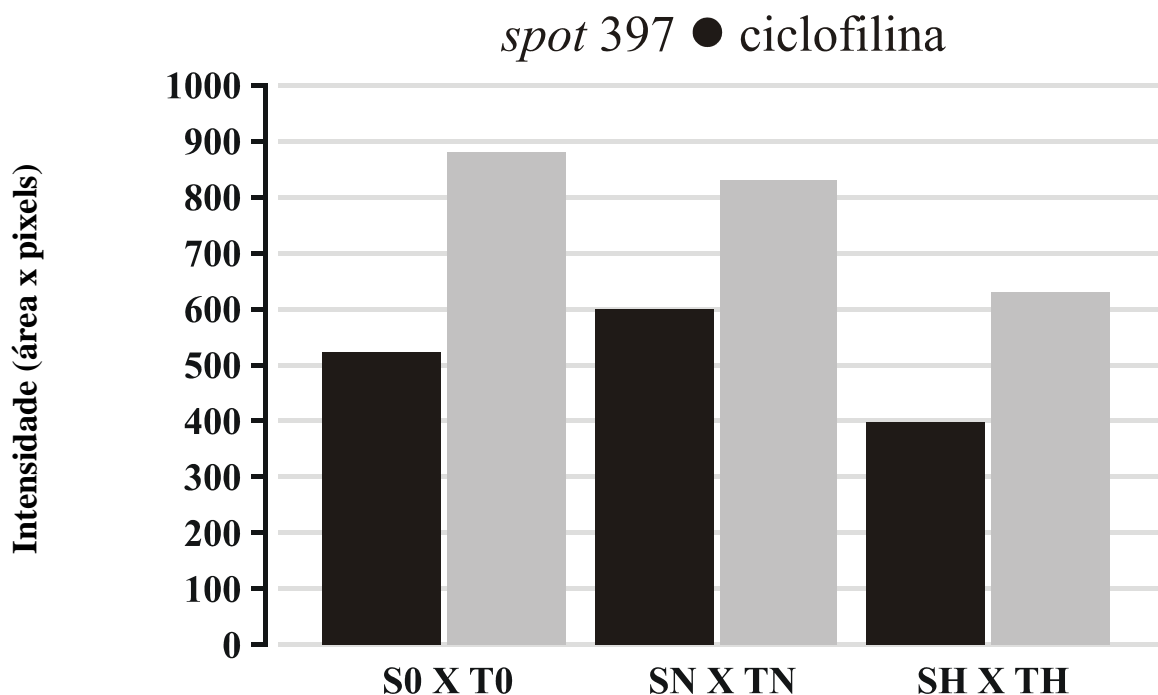


Figura 5.7. Intensidade da ciclofilina entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína ciclofilina (ciclofilina; *spot 397*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose.

Outra foldase de importância funcional em nossos resultados é a **ciclofilina 18** que cataliza a isomerização cis-trans de ligações peptídicas Xaa-Pro (aonde Xaa é o aminoácido precedente), em diversos oligopeptídeos, o que acelera o processo de redobramento de proteínas (399). Em nossos experimentos, conforme verificado na figura 5.7, observamos uma tendência de elevação na expressão desta proteína no córtex renal de animais treinados que pode contribuir para aumento da produção de NO pela enzima eNOS.

Interessantemente, a ciclofilina encontra-se envolvida em associações com a proteína caveolina-1 no cavéolo da membrana endotelial (400,401). Neste contexto, Ito e colaboradores demonstraram que a ligação da enzima pela droga imunossupressora ciclosporina A, reduz o conteúdo de colesterol do cavéolo e promove a dissociação do complexo ciclofilina-caveolin-1 reduzindo a atividade da eNOS em processo que também inibe a função da APO-A1 (402).

A função chaperone da ciclofilina no rim tem sido associada à reativação da anidrase carbônica e da creatino cinase e também, a estimulação da síntese, em células endoteliais, do co-fator para eNOS, BH₄ (403). Além do mais, conforme exposto anteriormente, pode participar da redução e ativação da PRDX-6 (378) e contribuir ao lado da PDI no processo de ativação da eNOS. Este conjunto de adaptações verificadas no córtex renal após o treinamento físico, certamente pode contribuir para uma maior produção e biodisponibilidade de NO na circulação renal conforme verificado em nossos experimentos farmacológicos.

Nesta linha de raciocínio, identificamos aumento da expressão de outra proteína com ação antioxidante, pertencente à família das glutationa-S-transferases (GSTs), que pode apresentar ação conjunta com as já mencionadas modificações na expressão da PRDX-6, PDI e ciclofilina, protegendo o ambiente intracelular da ação de agentes oxidantes e portanto, aumentando a biodisponibilidade de NO.

5.3.2- Glutationa-S-transferase (GST)

As GSTs, fazem parte da família de enzimas multi-gênicas envolvidas no metabolismo de xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) transferindo e catalizando a conjugação destas substâncias com a GSH (404). A isoforma alfa II, é uma proteína citosólica e dimérica, abundantemente encontrada no fígado e no pâncreas, mas também presente nos rins, que apresenta duas regiões funcionais distintas que permitem a ligação com o GSH no seu lado hidrofílico (sítio G) e a ligação com diversos substratos eletrofílicos no seu lado hidrofóbico (sítio H).

No sítio G, encontra-se presente a região catalítica que contém a cisteína que irá interagir com o grupo tiol do GSH reduzindo o pK_a desta molécula de 9 para 6, o que diminui sua reatividade com macromoléculas celulares. Após transportar o substrato e ligá-lo ao sítio ativo da GSH, a enzima ativa o grupo sulfidrila presente na glutatona a fim de permitir seu ataque nucleofílico sobre substrato eletrofílico. No entanto, apesar de sua função desintoxicadora, presente em vários organismos e baseada na solubilização de substratos (fase II do processo de desintoxicação de xenobióticos), já ser conhecida há muito tempo, a enzima parece capaz de metabolizar também, quinonas endógenas reativas formadas a partir da oxidação das catecolaminas, cujos níveis aumentam em doenças crônicas que se desenvolvem a partir de danos oxidativos teciduais (404).

Da mesma forma, além de suas atividades de conjugação, acredita-se que, em células mamíferas, estas enzimas desempenhem também, importante papel antioxidante e citoprotetor. De fato, estas proteínas são capazes de metabolizar aldeídos tóxicos produzidos durante a peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) ou apresentar atividade semelhante ao da GPx catalizando a reação de peróxidos orgânicos, como os hidroperóxidos de fosfolipídios, com o GSH para formar glutatona reduzida (GSSG) e álcoois (55), sendo neste caso, chamadas de glutatona peroxidase independentes de selênio. A recém descoberta atividade peroxidase da GST sobre hidroperóxidos lipídicos confere resistência celular aos efeitos citotóxicos do H_2O_2 e o aumento de sua expressão tem se mostrado capaz de atenuar a peroxidação lipídica e proteger a célula contra a apoptose reduzindo os níveis de JNK e do indutor de apoptose capase-3 (405).

A transcrição do gene da GST envolve o elemento ARE (*antioxidant response element*) em sua região regulatória que pode ser ativado pelo fator de transcrição Nrf2, centralmente envolvido na proteção celular contra o estresse oxidativo. Tanto xenobióticos quanto agentes oxidantes são capazes de liberar Nrf2 e induzir aumentos na expressão da GST e proteger as células renais contra os efeitos deletérios de agentes oxidantes. Interessantemente, vários polimorfismos no gene da GST encontram-se associados com o risco elevado de nefropatia (406).

Em células endoteliais, os genes mediados por ARE são positivamente regulados através do fluxo hemodinâmico laminar e exercem efeito ateroprotetor através de mecanismo dependente de Nrf-2 (407). Neste contexto, foi recentemente descrito, que o aumento da expressão de GST em células endoteliais protege o tecido vascular dos danos provocados por aldeídos, como o 4-HNE, através de aumento da expressão da NOS, envolvendo a proteína também na maior biodisponibilidade de NO (408).

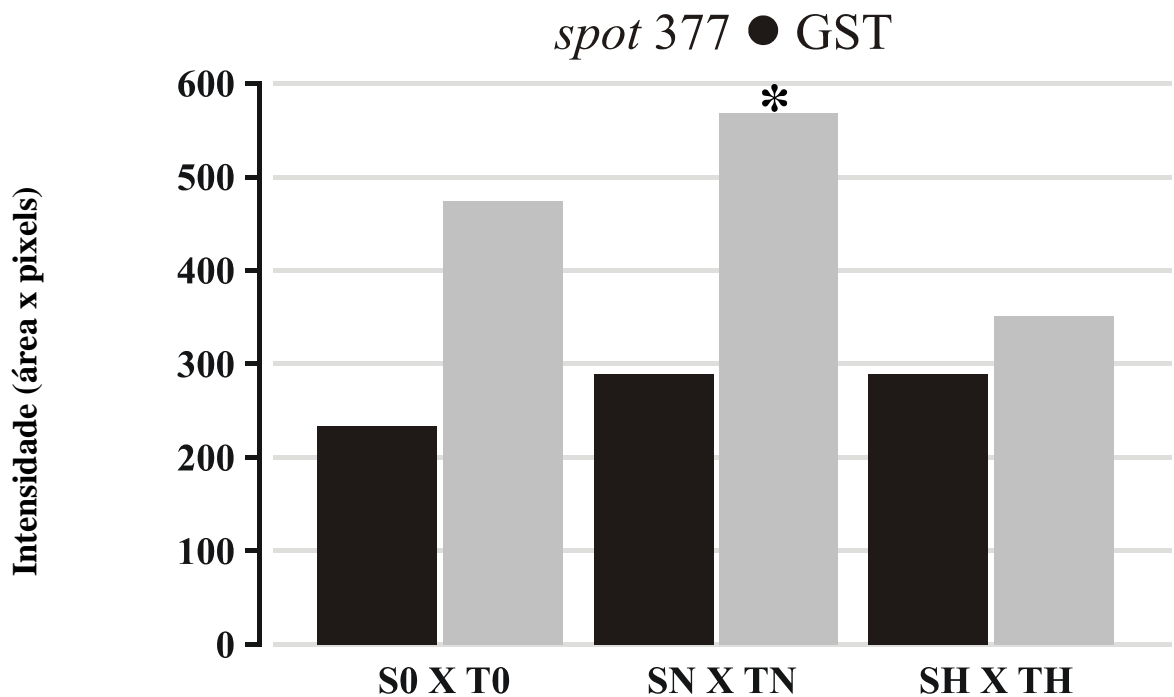


Figura 5.8. Intensidade da GST entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína glutathione transferase (GST; *spot 377*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vsS0,SN.

A análise da figura 5.8 demonstra que a GST apresenta expressão significativamente maior no córtex renal de animais treinados que receberam tratamento da circulação renal com concentração fisiológica de glicose. Entretanto, parece existir tendência semelhante de maior expressão da proteína no córtex renal de animais treinados, em relação a seus congêneres sedentários quando a circulação renal de ambos não recebe qualquer tratamento com glicose ou são tratados com concentração elevada de glicose tornando possível que o efeito antioxidante da GST participe do aumento da disponibilidade de NO na circulação renal de animais treinados mesmo diante da ação tóxica e oxidante exercida pelo excesso de glicose.

5.3.2.1- Outras proteínas envolvidas no metabolismo de xenobióticos que tiveram a expressão alterada

Nesta linha de raciocínio e em coerência com a observação de que o treinamento físico é capaz de produzir um fenótipo renal com elevado potencial antioxidante e capacidade de resposta ao estresse, identificamos no córtex de animais treinados que tiveram a circulação renal tratada durante 3 horas com concentração fisiológica de glicose (TN) aumento significativo da isoforma A1 da proteína Aldo ceto redutase (AKR1A1) em efeito que, conforme revela a figura 5.9, tende a se reproduzir quando a circulação renal não recebe qualquer tratamento com glicose.

A AKR1A1 também conhecida como aldeído redutase, pode ser abundantemente encontrada no córtex renal e se encontra envolvida na redução de aldeídos biogênicos e xenobióticos (409). O potencial tóxico de aldeídos e cetonas reside na possibilidade química iminente de reagirem covalentemente com grupamentos amina e tiol presentes nas proteínas. Este fenômeno altera a conformação de um conjunto de proteínas alterando a função celular e encontra-se presente em inúmeras condições fisiopatológicas (410).

Como a glicose se comporta quimicamente como um aldeído, a AKR1A1 protege as células e tecidos dos danos associados aos excessos desta molécula. Neste sentido, a enzima é capaz de catalizar a redução dependente de NADPH de AGEs formados no metabolismo, como a 3-deoxiglicosona e o metilglioxal, que como vimos no primeiro capítulo desta tese, são produzidos diante de elevada concentração de glicose e participam das modificações protéicas e disfunção celular que ocorrem durante a nefropatia diabética.

A AKR1A1 também é capaz de reduzir 4-HNE e malondialdeído que são produzidos durante a peroxidação lipídica, quando a célula se encontra sob estresse oxidativo sendo

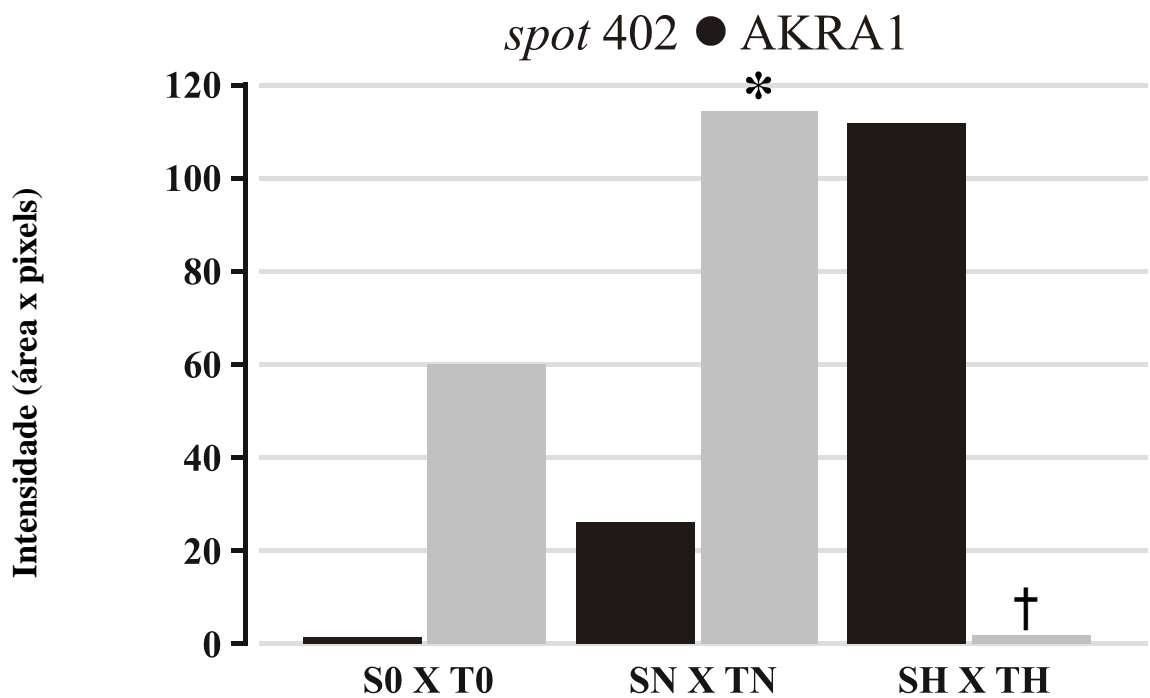


Figura 5.9. Intensidade da AKRA1 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma A1 da proteína aldo-ceto redutase (AKRA1; *spot 402*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SN. † P<0,05 vs SH,TN.

portanto, considerada importante proteína antioxidante e principalmente desintoxicadora dos efeitos deletérios associados especificamente a glicose (410).

Desta forma, sua maior expressão no córtex renal de animais treinados poderá assegurar importante papel citoprotetor ao tecido renal protegendo o órgão contra a ação tóxica associada à hiperglicemia. Neste contexto, tal adaptação provocada pelo treinamento físico poderá apresentar importante papel na prevenção contra as complicações clínicas associadas a nefropatia diabética que quase sempre envolvem a síntese excessiva de aldeídos tóxicos.

Conforme exposto na figura 5.9, o tratamento da circulação renal com concentração elevada de glicose aboliu o efeito adaptativo provocado pelo treinamento físico e nesta mesma condição experimental, aumentou a expressão da proteína no córtex renal de coelhos sedentários, fenômenos que ainda não podem ser adequadamente compreendidos.

5.3.3- Albumina

A análise das figuras 5.10, 5.11 e 5.12 demonstra que a albumina apresenta expressão significativamente mais elevada no córtex renal de animais treinados (spots 40,43 e 50) e revela importante contribuição deste órgão para o aumento das reservas tiol do organismo. No spot 43 (figura 5.11), podemos verificar que o efeito do treinamento físico não parece ser alterado com o tratamento da circulação renal de animais treinados com glicose elevada. No entanto, o mesmo não ocorre com animais sedentários revelando que o tratamento com glicose elevada pode influenciar negativamente a expressão da proteína nestas condições experimentais.

Por outro lado, a análise das figuras 5.10 e 5.12 revelam que nos *spots* 40 e 50 apesar do tratamento com glicose elevada determinar tendência de redução da expressão da proteína no córtex de animais treinados, os níveis da mesma no córtex de animais sedentários não são detectáveis pela tecnologia proteômica utilizada sugerindo que o treinamento é capaz de consistentemente aumentar a expressão desta proteína. Conforme evidencia a tabela 4.5, foram observadas outras cinco identificações da albumina e em todas elas, o córtex renal de animais treinados apresenta expressão significativamente maior da proteína efeito que a semelhança com o que foi descrito anteriormente poderá em alguns casos, ser ligeiramente reduzido, mas não abolido, pelo tratamento com glicose elevada.

A albumina é uma pequena proteína solúvel com massa molecular em torno de 65kDa, que apresenta 585 aminoácidos com 17 pontes dissulfeto e um grupamento sulfidril livre no resíduo Cys34. Principal proteína plasmática é responsável pela manutenção da pressão

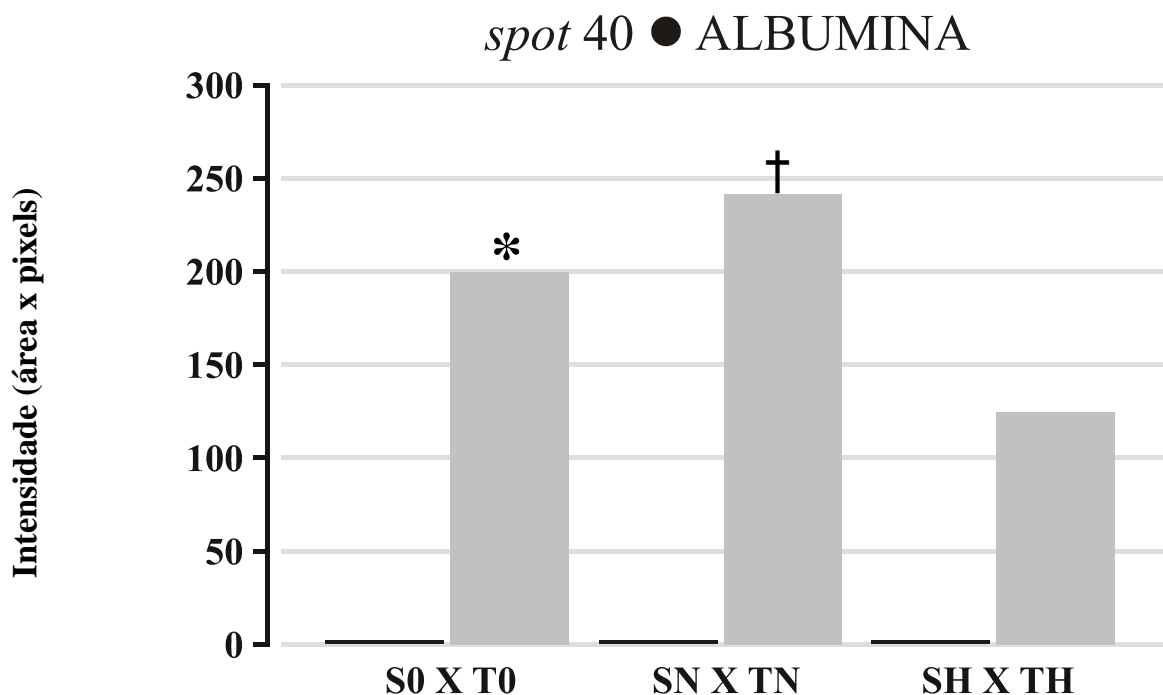


Figura 5.10. Intensidade da albumina (*spot40*) entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína albumina (*spot 40*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs S0; + $P < 0,05$ vs SN.

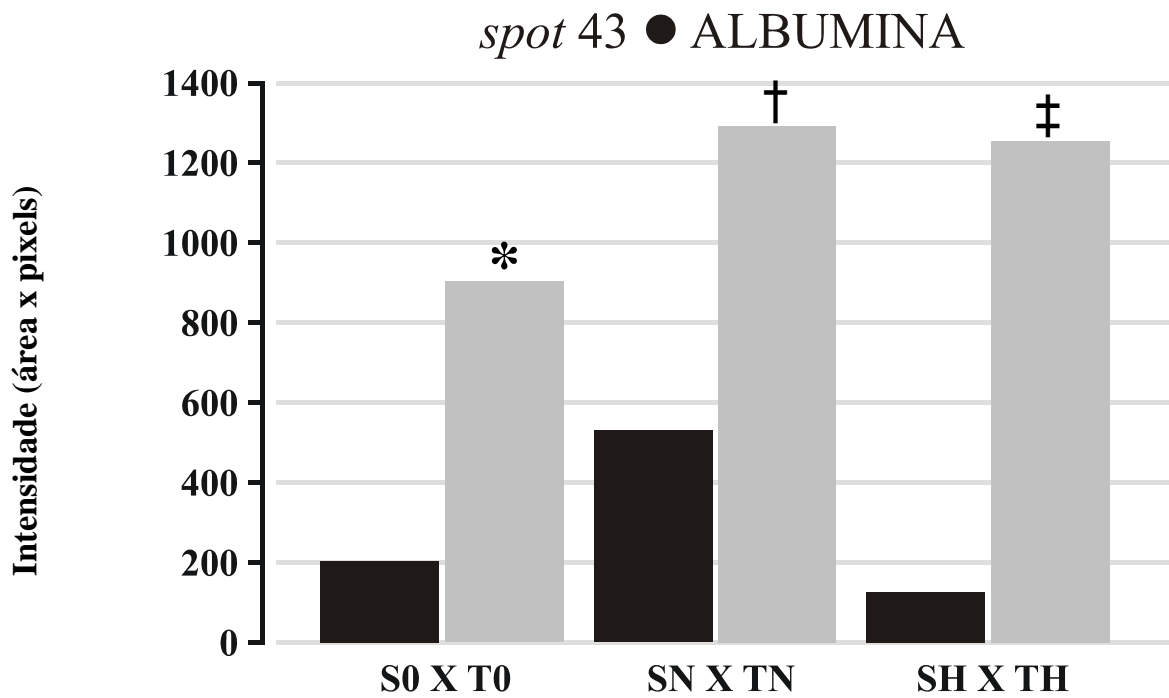


Figura 5.11. Intensidade da albumina (*spot43*) entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína albumina (*spot 43*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs S0, † $P < 0,05$ vs SN, ‡ $P < 0,05$ vs SH.

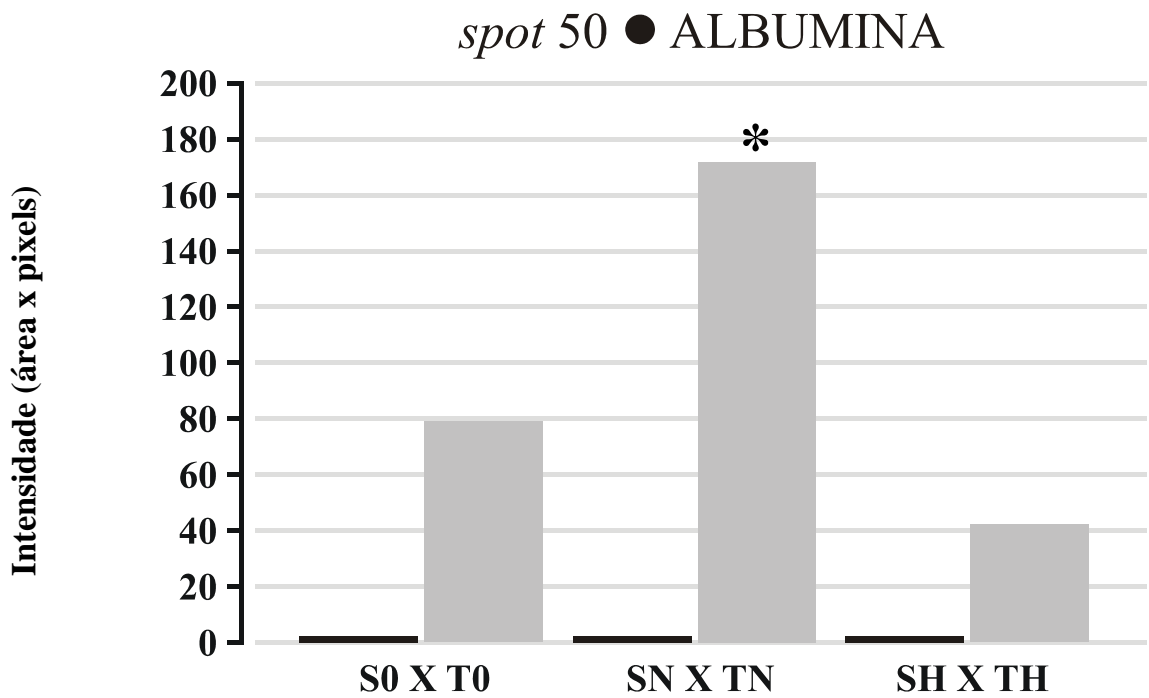


Figura 5.12. Intensidade da albumina (*spot50*) entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína albumina (*spot 50*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * P<0,05 vs SN.

oncótica nos vasos, transporte de múltiplas drogas, hormônios e ácidos graxos presentes no plasma, mas desempenha também, importante papel antioxidante extracelular (411).

A ação antioxidante da albumina é potencializada por sua abundante concentração plasmática (0,5mM) garantindo capacidade quelante de íons heme e cobre e possibilidade de transporte de outros antioxidantes como a bilirrubina. No entanto, sua principal característica antioxidante é a presença de resíduo cisteína reduzido (ativado) e exposto em sua superfície (Cys34), que representa a maior reserva de tiols em toda a circulação (411).

Para Roche e colaboradores (411), a albumina representa a principal defesa antioxidante do plasma e evidencia o fato de que o compartimento vascular encontra-se potencialmente exposto ao estresse oxidativo. Por outro lado, as constantes variações na permeabilidade vascular, permitem que a albumina tenha acesso ao interstício expandindo sua ação antioxidante para além dos limites intravasculares.

Neste contexto, a proteção antioxidante extracelular parece ser diferente da existente no interior das células. Durante a resposta inflamatória, os ROS liberados por fagócitos nos fluidos extracelulares devem funcionar não apenas como destruidores das células dos agentes infecciosos, mas também, como sinalizadores para atração e recrutamento de outros fagócitos, procedimento que seria inviabilizado diante da abundante presença de enzimas antioxidantes como a SOD que, no interior das células, remove agentes oxidantes de forma excessivamente rápida. (55).

Em indivíduos saudáveis, cerca de 70% da albumina circulante (HSA) contém o resíduo Cys34 no estado reduzido (HSA-SH) sendo nesta condição conhecida como mercaptalbumina. A fração não-mercaptalbumina contém a maior parte dos disulfetos mistos (HSA-S-S-R) formados de forma reversível com a cisteína, a glutatona e outros tiols de baixo peso molecular presentes no plasma, mas possui também, estados de oxidação mais elevados que originam o ácido sulfinico e sulfônico (412).

Neste sentido, a albumina é capaz de reduzir ânion superóxido e ácido hipocloroso (413) além de H_2O_2 e peroxinitrito (414), e a semelhança da PRDX-6, quando oxidada, formar o ácido sulfênico para a partir daí, provisoriamente se organizar em disulfetos mistos, e depois ser novamente convertida a mercaptoalbumina sugerindo importante participação no controle do estado redox dos compartimentos extracelulares (415).

No entanto, a glicação da albumina induz uma perda acentuada em sua capacidade antioxidante. A albumina de pacientes diabéticos encontra-se altamente oxidada e modificada por AGEs o que contribui para agravar os danos vasculares decorrentes do estresse oxidativo e pode acelerar o desenvolvimento da nefropatia diabética (416,417). Interessantemente, o

tratamento com metformina é capaz de exercer proteção significativa sobre a albumina destes pacientes (418).

Danos oxidativos da albumina já foram descritos em inúmeras condições fisiológicas como o exercício intenso (419) e fisiopatológicas (420) como disfunção renal (421), doença arterial coronariana (422) e DM (423), sendo a elevada mortalidade entre estes pacientes diretamente associadas a hipoalbuminemia (424).

Apesar dos mecanismos precisos ainda não serem conhecidas, as elevações da excreção de albumina na urina encontram-se associadas com aumentos do risco de doença cardiovascular e desenvolvimento de aterosclerose (425). Da mesma forma, a sensibilidade a insulina encontra-se associada à taxa de excreção de albumina e a redução dos seus níveis plasmáticos, por diminuir sua ação antioxidante no plasma, reduz a possibilidade de defesa da célula endotelial contra o estresse oxidativo (425).

Encontra-se bem evidenciado que o NO possui capacidade de se ligar a tiols intra e extracelulares, formando compostos chamados nitrosotiols, que representam importante reserva deste gás para as necessidades do organismo (426). Interessantemente, a principal forma de nitrosotiol no plasma é a nitrosoalbumina (SNO-albumina) que tem sido considerada como uma reserva de NO na circulação, transportando e liberando este gás em diferentes leitos vasculares e contribuindo no controle da reatividade vascular. A SNO-albumina circulante é capaz de realizar reação de transnitrosilação com outros tiols de baixo peso molecular encontrados no plasma para formar compostos menos estáveis como a nitrosoglutationa ou a nitrosocisteína, que através de outras reações mais simples, é capaz de liberar NO (426). Por exemplo, estudos de Scharfstein e colaboradores, já demonstraram que a infusão intravenosa de N-acetilcisteína, um tiol de baixo peso molecular, é acompanhada de redução acentuada das concentrações plasmáticas de SNO-albumina, da formação de nitroso-N-acetilcisteína e da liberação aguda de NO (427).

Conforme mencionado anteriormente, existem evidências de que os nitrostiols formados no plasma podem liberar o NO na superfície da célula através da interação com tiols celulares presentes na membrana. Neste sentido, Zai e colaboradores já demonstraram que a proteína disulfeto isomerase é capaz de catalizar a transnitrosilação e regular a transferência de NO para o interior da célula (428).

No interior das células, praticamente todas as enzimas contêm resíduos cisteína que podem sofrer nitrosilação. Recentemente foi demonstrado que a tioredoxina e o ácido dihidrolióico catalizam a desnitrosilação da nitrosoglutationa, nitrosocaspase, nitrosolalbumina e nitrosometalotioneína aos seus respectivos estados reduzidos com a concomitante liberação do NO (396). Desta forma, é possível que também a peroxiredoxina-6 assim como a proteína

disulfeto isomerase, ambas proteínas da família das tioredoxinas, sejam capazes de reduzir a albumina nitrosilada e aumentar a biodisponibilidade de NO.

5.3.4- Proteína ligante de selênio (SBP-1)

A análise da figura 5.13 revela consistente efeito do treinamento físico em aumentar a expressão da proteína ligante de selênio (SBP-1) no córtex renal de animais treinados que tiveram a circulação renal tratada com concentração fisiológica de glicose. Tendência semelhante pode ser observada no córtex renal de animais que tiveram a circulação renal tratada com concentração elevada de glicose ou que não receberam qualquer tratamento neste leito vascular. O aumento da expressão desta proteína no córtex renal de coelhos treinados pode conferir importante efeito renoprotetor contra o insulto oxidativo associado a glicose elevada já que em nosso modelo experimental, o pré-tratamento da circulação renal com concentração de glicose de 50mM não modificou a tendência induzida pelo treinamento físico.

A proteína ligante de selênio (selenium binding protein-SBP-1) é um polipeptídeo que apresenta selênio externamente ligado a sua molécula e encontra-se predominantemente expressa no citosol de tecidos como fígado e rins desempenhando importante papel no metabolismo de xenobióticos. Neste contexto, a proteína já foi envolvida em processos de desintoxicação associadas ao metabolismo do paracetamol, mas parece participar também, na regulação do crescimento celular podendo estar envolvida na proteção celular em vários tipos de câncer (429).

Vários estudos demonstram não apenas redução da expressão da SBP-1 em células tumorais provenientes de carcinomas da mama (430), pulmão (431) e ovários (432), mas principalmente, associação entre os níveis teciduais da proteína e o prognóstico da doença (430). Por outro lado, em condições fisiopatológicas que se caracterizam pela disfunção renal progressiva, como na nefropatia alogênica crônica, apresenta expressão significativamente reduzida nas células do músculo liso vascular estando associada ao espessamento da camada íntima e ao estreitamento do lúmen dos vasos que ao lado da fibrose intersticial, atrofia tubular e glomerulosclerose caracterizam clinicamente a doença (433).

A proteína apresenta também, elevada atividade de transporte entre as membranas dos compartimentos celulares estando neste sentido, diretamente relacionada ao transporte intra-Golgi (430). No entanto, é a sua capacidade de ligar o antioxidante selênio, o fator que desperta maior interesse por seu papel intracelular.

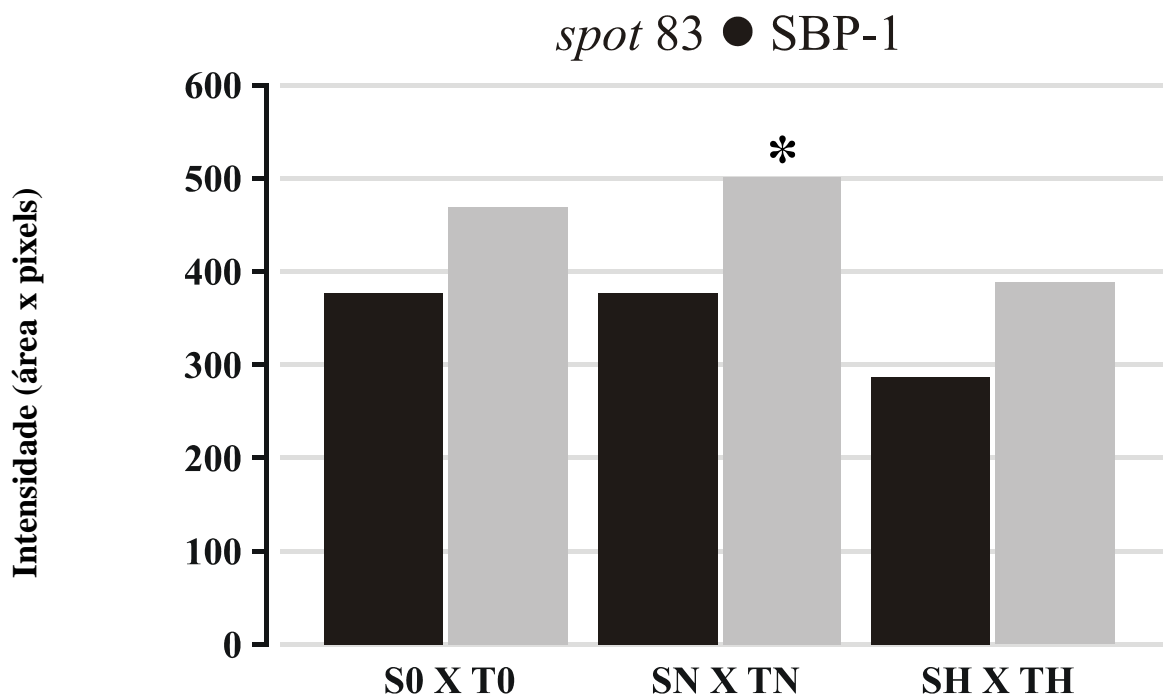


Figura 5.13. Intensidade da SBP-1 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína ligante de selênio (selenium binding protein, SBP-1; *spot 83*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs SN.

O selênio é um importante elemento envolvido em diferentes funções fisiológicas no organismo humano. Em coerência com os estudos acima mencionados, dados clínicos e experimentais suportam o efeito protetor deste micro nutriente essencial sobre vários tipos de câncer bem como na redução do estresse oxidativo (434) e descrevem seu potencial inibitório sobre os efeitos deletérios associados à elevada concentração de glicose em células endoteliais (435). Neste sentido, a SBP-1 pode representar importante reserva de selênio intracelular contribuindo também, para impedir aumentos indiscriminados deste micro nutriente que, quando presente em concentrações muito elevadas, também pode exercer efeitos citotóxicos.

Assim, apesar de ainda pouco conhecida e da necessidade de investigações mais precisas acerca do papel celular desta proteína, existem alguns indícios de sua participação na proteção das estruturas renais em condições de estresse, como o presente diante da exposição à elevada concentração de glicose.

5.4- Proteínas que controlam a atividade da NOS

Demonstramos que o treinamento físico também é capaz de aumentar de forma significativa no córtex renal de animais treinados, a expressão de proteínas que participam da regulação da enzima NOS podendo afetar diretamente a biodisponibilidade do óxido nítrico em condições fisiológicas e fisiopatológicas.

5.4.1- Dimetilarginina aminohidrolase

Conforme revela a figura 5.14, a isoforma 1 da proteína dimetilaminohidrolase (DDAH-1), apresenta expressão significativamente mais elevada no córtex renal de animais treinados que tiveram a circulação tratada com concentração fisiológica de glicose em efeito que apresenta a mesma tendência quando a circulação dos animais é tratada com concentração elevada de glicose.

Interessantemente, o tratamento com glicose elevada na circulação renal de animais treinados não promove qualquer redução na expressão da enzima o que pode contribuir de forma decisiva para maior biodisponibilidade de óxido nítrico mesmo diante do desafio oxidativo imposto pela glicose elevada. Apesar desta condição promover aumentos não significativos na expressão da DDAH-1 no córtex renal de animais sedentários, o efeito do treinamento parece substancialmente maior e pode explicar porque a reatividade vascular dependente de endotélio na circulação renal de animais treinados é significativamente mais

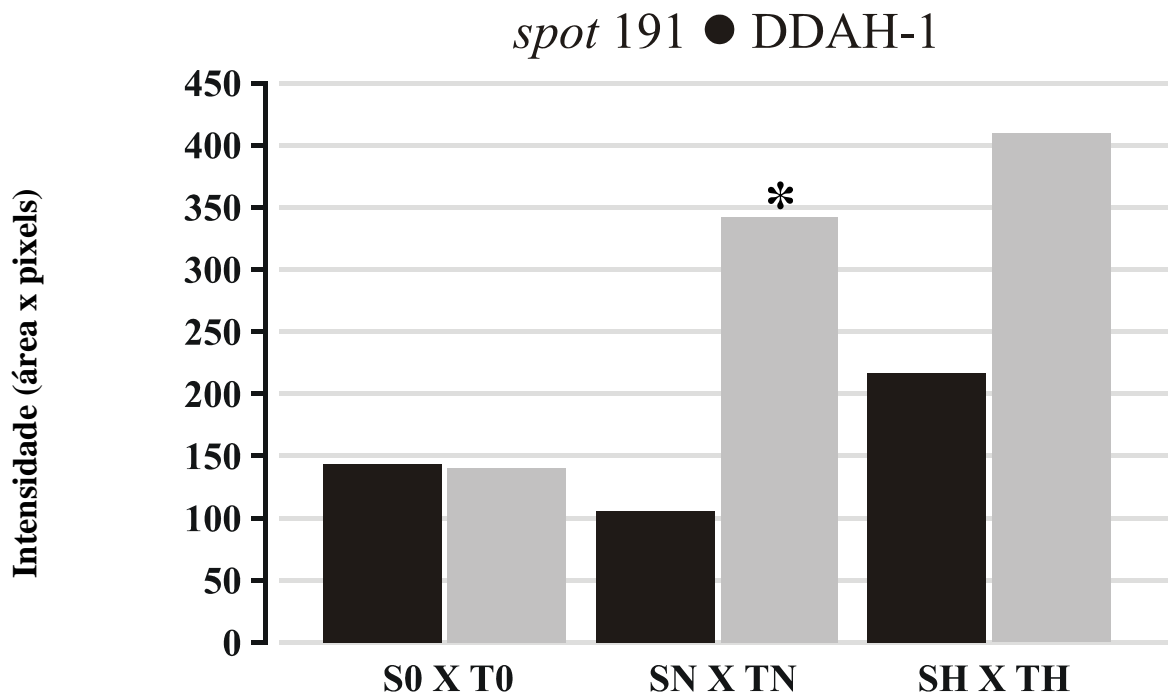


Figura 5.14. Intensidade da DDAH-1 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma 1 da proteína dimetilarginina aminohidrolase (DDAH-1; *spot 191*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SN.

alta do que a observada na circulação de animais sedentários quando ambos os leitos vasculares são tratados com glicose elevada. Este resultado encontra-se em concordância com nossos achados durante a fase de experimentos farmacológicos aonde a circulação renal de coelhos treinados apresentava resposta de vasodilatação dependente de endotélio significativamente mais elevada que a observada na circulação renal de animais sedentários em efeito que era em grande parte dependente da maior biodisponibilidade de NO.

Esta proteína representa a principal forma de eliminação da ADMA, um aminoácido naturalmente formado a partir do catabolismo de proteínas metiladas, que apresenta elevado potencial inibitório sobre a enzima eNOS (436,437). A ADMA é uma molécula capaz de inibir todas as três isoformas da NOS (neuronal, endotelial e indutível) e a elevação de seus níveis plasmáticos pode contribuir para a fisiopatologia vascular observada na aterosclerose, hipertensão, hipercolesterolemia e falência renal (438), sendo atualmente, considerada fator de risco independente para mortalidade cardiovascular (439). Em concentrações muito elevadas, é responsável pelo desacoplamento da eNOS capaz de transformar a enzima, conforme já mencionado, em produtora de ânions superóxido (440).

Entre pacientes com síndrome metabólica, quanto maior o grau de resistência a insulina, maior parecem ser os níveis plasmáticos de ADMA (441). Neste sentido, os níveis plasmáticos de ADMA encontram-se significativamente elevados em modelos clínicos e experimentais, respectivamente realizados com pacientes com DM-2 e animais diabéticos (442). Em todos eles, existe redução significativa da resposta de vasodilatação dependente de endotélio em processo que decorre da interferência desta molécula na produção de NO (443,444,445).

Mesmo em indivíduos saudáveis, a infusão intra-arterial de ADMA é capaz de provocar esse efeito (446) que, se mantido cronicamente, conforme demonstrado em pacientes com falência renal, é capaz de aumentar a resistência sistêmica e alterar morfológicamente a estrutura de órgãos como o coração e os rins (447). Neste pacientes, a crônica elevação dos níveis plasmáticos de ADMA correlaciona-se inversamente com a taxa de filtração glomerular que reconhecidamente depende da disponibilidade de NO (448). Entre pacientes com nefropatia diabética, os elevados níveis plasmáticos de ADMA podem contribuir para acelerar a progressão da doença renal e são capazes de determinar a probabilidade de ocorrência de eventos cardiovasculares fatais (106).

A metilação de resíduos arginina em proteínas é um processo desempenhado por enzimas metil-transferases (PMRTs), que adicionam 1 ou 2 grupamentos metil (CH₂) aos nitrogênios da L-arginina incorporada às proteínas. Desta forma, poderão ser formadas as dimetilargininas simétricas (SDMA) ou assimétricas como a ADMA e a monometil arginina

(L-NMMA) (437). Apesar de ambas argininas assimetricamente metiladas serem capazes de inibir a enzima NOS, os níveis plasmáticos de ADMA são cerca de 10 vezes superiores aos de L-NMMA e portanto, fisiologicamente mais relevantes (437).

O fato de não existirem outras vias conhecidas para síntese de ADMA livre no citosol, implica que toda ADMA produzida é dependente da metilação da arginina em proteínas que foram degradadas. Neste contexto, assume-se que os níveis intracelulares de ADMA em geral, são governados pela atividade da PMRT e o *turn-over* de proteínas (436). Desta forma, a aceleração no processo de degradação de proteínas, comum em condições fisiopatológicas como isquemia tecidual e diabetes, e já identificada em órgãos como coração e rins, poderá contribuir para elevação dos níveis de argininas metiladas livres (449).

No sistema vascular, a PMRT é amplamente expressa no músculo liso e nas células endoteliais. Interessantemente, neste último tecido, a síntese desta enzima parece ser dependente do *shear stress* exercido pelas forças hemodinâmicas, efeito que pode ser bloqueado pela ativação do receptor ativado de proliferação do peroxissomo (450).

A DDAH é uma enzima predominantemente citosólica amplamente localizada em tecidos com alta expressão de proteínas como fígado, cérebro, pâncreas e rins que é capaz de realizar sua atividade catalítica na ausência de qualquer co-fator (451). No córtex renal, o posicionamento da enzima é vicinal à enzima eNOS (452) e o aumento da expressão de ambas parece estar associada a ativação dos receptores de angiotensina AT1 (453), que paradoxalmente também aumenta a produção de ROS através da indução dos genes que expressam a NADPH oxidase (454). Sua atividade enzimática depende da presença de um resíduo reativo de cisteína no sítio ativo da enzima (455) e a reação envolve o ataque nucleofílico da porção guanidino da ADMA por elétron proveniente deste grupo tiol ativado (451).

Por suas características químicas, a DDAH apresenta-se amplamente susceptível a reações de oxidação e nitrosilação (456). Neste contexto, a manutenção do estado ativado da cisteína representa um desafio para os mecanismos de manutenção de um ambiente celular reduzido no interior da célula, já que a mesma, freqüentemente se encontra diante de desafios pró-oxidantes. Neste sentido, são muitas as evidências de que o grupamento sulfidril, presente na enzima em estado reduzido, e necessário para o catabolismo da ADMA, poderá ser oxidado diante do acúmulo de ROS reduzindo significativamente a atividade da enzima.

A atividade da DDAH também pode ser reversivelmente inibida pela S-nitrosilação do resíduo cisteína (Cys-249) presente na tríade catalítica da enzima (Cys-His-Glu) em ação que também protege a enzima contra a oxidação mediada por ROS (457). Desta forma, quando a produção de NO aumenta, a atividade da DDAH diminui determinando acúmulo de ADMA e

inibição subsequente da NOS que por sua vez, previne futuros aumentos de NO. Estes resultados explicam porque doadores de NO são capazes de inibir a atividade da DDAH *in vitro* e revelam elegante mecanismo de retrocontrole endógeno capaz de regular a produção de NO (458). Além do mais, esclarecem também, porque a resposta de vasodilatação dependente de endotélio diminui em decorrência da produção excessiva de NO como existe em eventos inflamatórios que induzem a isoforma 2 da NOS (iNOS) (456).

Por outro lado, o estresse oxidativo inibe a atividade catalítica da DDAH e parece ser responsável pelos aumentos de ADMA verificados em condições fisiopatológicas como hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, diabetes melitus, falência renal e outras condições associadas a doença cardiovascular. De fato, a homocisteína é capaz de oxidar a DDAH para formar ponte disulfeto e inativar a enzima (441). Ao oxidar o grupo sulfidrila, crítico para atividade da DDAH, a homocisteína e outros fatores de risco provocam acúmulo de ADMA e suprimem a atividade da NOS.

Conforme mencionado na introdução deste trabalho, existem inúmeras evidências de que a nefropatia diabética inicia-se especificamente com a redução da disponibilidade do NO renal (159), em fenômeno que conta com a participação direta do acúmulo dos níveis de ADMA (162,164,165). Neste contexto, o estresse oxidativo provocado pela hiperglicemia cronicamente mantida em pacientes com nefropatia diabética, contribui para oxidação da DDAH-1 reduzindo a eliminação da ADMA e assegurando sua ação inibitória sobre a isoforma endotelial da NOS. Isto além de condicionar a potencialização das complicações vasculares já existentes, ao reduzir o efeito citoprotetor do NO sobre as estruturas renais, permite que os ROS formados acionem vias pró-apoptóticas induzindo rápidas lesões sobre o glomérulo, células mesangiais e tubulares e em toda extensão do sistema vascular deste órgão (179).

Neste contexto, o conjunto de proteínas com expressão positivamente regulada pelo treinamento físico discutidas anteriormente, poderão subsidiar a integridade da DDAH-1 e proteger o endotélio da circulação renal contra os efeitos agudos deletérios da glicose elevada. Por outro lado, a maior expressão da DDAH-1 verificada em nosso modelo experimental córtex renal de coelhos treinados, ao assegurar maior disponibilidade de NO para o tecido renal destes animais, poderá contribuir para a prevenção das alterações funcionais e morfológicas associadas a nefropatia diabética, que conforme evidenciado, decorrem em grande parte, da reduzida oferta deste gás (180).

Interessantemente, a metformina, droga hipoglicemiante utilizada em indivíduos diabéticos com alta similaridade química a ADMA, é capaz de reduzir os níveis plasmáticos desta molécula e aumentar a biodisponibilidade de NO (459). Este efeito poderia explicar

resultados previamente obtidos em nosso laboratório que demonstraram que o pré-tratamento da circulação renal de animais não diabéticos com esta droga é capaz de, a semelhança do treinamento físico, proteger este leito vascular dos efeitos deletérios da glicose elevada (460).

5.4.2- Regucalcina

Identificamos também, a proteína regucalcina com expressão significativamente maior no córtex de animais treinados em que a circulação renal não recebeu qualquer tratamento com glicose em efeito que, conforme evidenciado na figura 5.15, tende a permanecer mesmo diante da perfusão com as diferentes concentrações de glicose por 3 horas. Esta proteína, abundantemente encontrada no fígado e nos rins, apresenta importante papel na homeostasia do Ca^{++} intracelular participando da sinalização intracelular e da ativação de bombas localizadas na membrana plasmática e nas mitocôndrias que, ao impedirem o aumento excessivo das concentrações deste íon no citosol, previnem a deflagração do processo apoptótico (461,462). Neste contexto, o DM encontra-se associado a aumentos da concentração intracelular de íons cálcio (463) e reduções na expressão da regucalcina (464).

Em células do epitélio tubular renal a regucalcina é capaz de impedir a ação deletéria de lipolissacarídeos (LPS) e do TNF- α que se dá em grande parte devido a ativação da isoforma indutiva da NOS (465). De fato, inibidores da NOS, como o L-NMMA e a aminoguanidina, já se mostraram eficazes na redução do processo inflamatório mediado por LPS- TNF- α reprimindo a apoptose celular (466). Nesta linha de raciocínio, estudos recentes demonstram que aumentos na expressão da regucalcina são capazes de suprimir a apoptose celular induzida por TGF- α e TNF β 1 através da regulação negativa do sistema caspase em órgãos como o fígado, coração e rins em mecanismo que envolve a inibição da NOS (467-469).

O aumento da concentração de íons cálcio no interior das células e a indução dos fatores de transcrição AP-1 e NF-1, aumenta a expressão desta proteína ativando sua ação renoprotetora que também pode ser evidenciada por sua capacidade de inibir a fragmentação do DNA induzida por Ca^{++} (470). Conhecida como *senescence marker protein-30* (SMP-30), a expressão da regucalcina diminui com o tempo de vida do organismo estando diretamente relacionada com as lesões tubulares renais que se processam com a idade (471). Em mamíferos, é capaz de participar da biossíntese do ácido ascórbico que por sua vez apresenta forte potencial redutor sobre a peroxiredoxina 6, podendo estar em nosso modelo experimental, diretamente envolvida nos mecanismos de regeneração da atividade antioxidante desta enzima (471, 472).

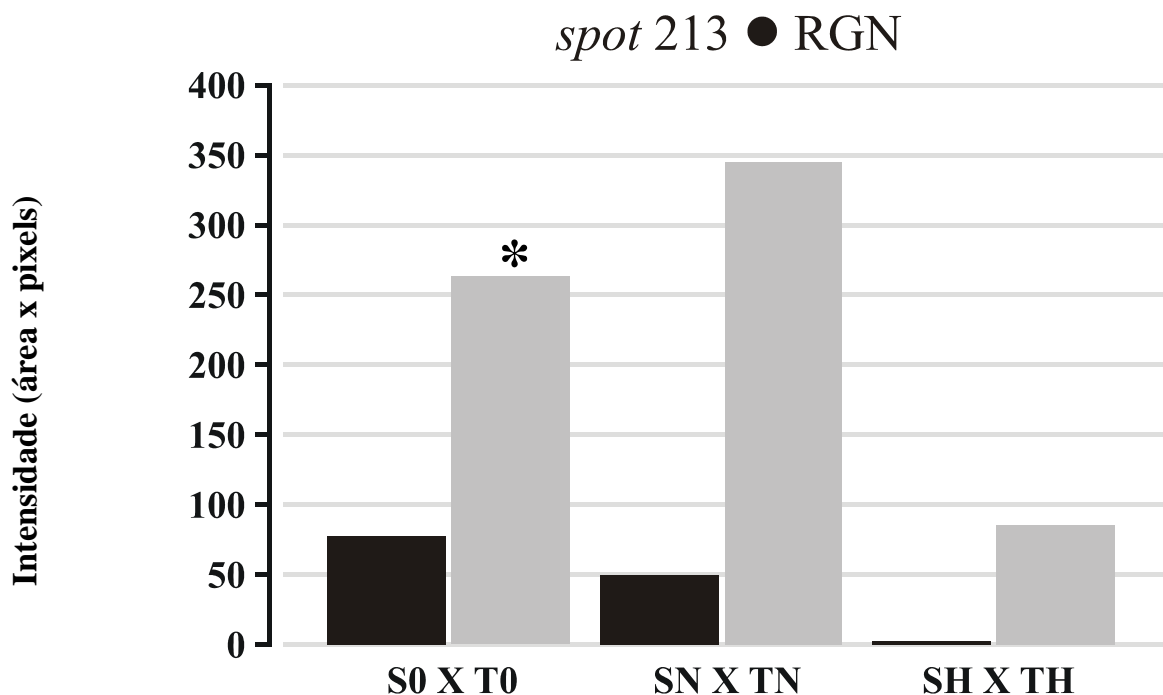


Figura 5.15. Intensidade da RGN entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína regucalcina (RGN; *spot 213*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs S0.

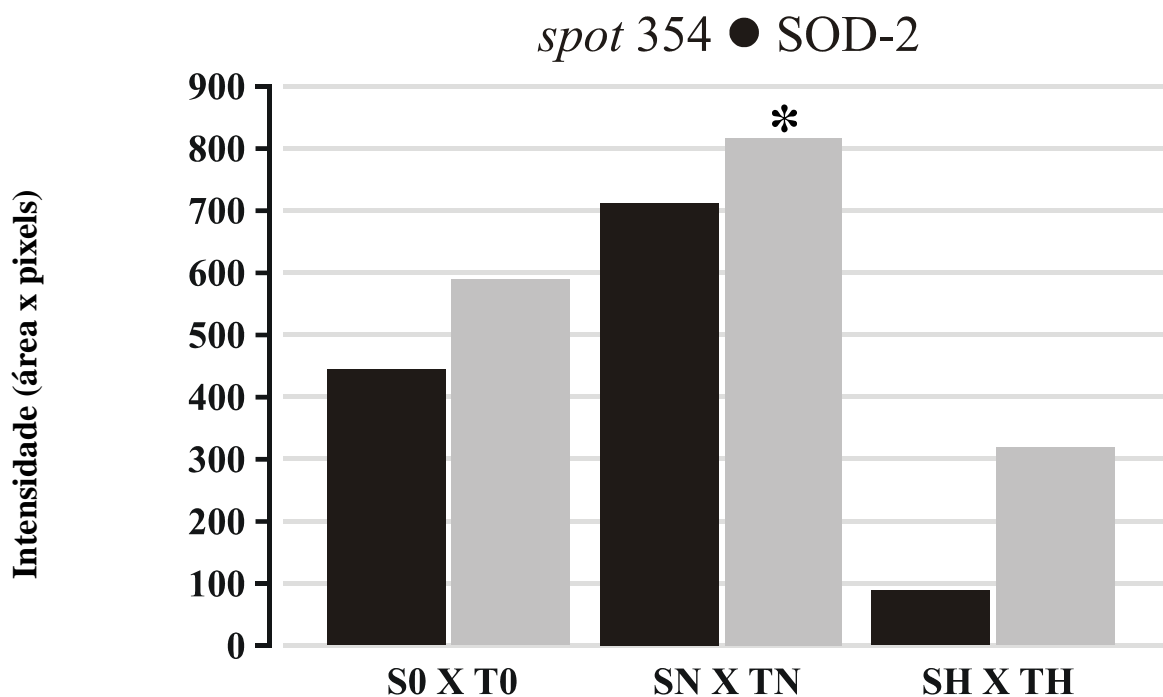


Figura 5.16. Intensidade da SOD-2 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma mitocondrial da proteína superóxido dismutase (SOD-2; *spot 354*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SH.

Enquanto a produção fisiológica de baixos níveis de NO desempenham importante papel na homeostasia celular incluindo a prevenção de disfunção e apoptose endotelial, níveis muito elevados contribuem para a ativação de vias pró-apoptóticas o que torna ambíguo o papel desta molécula no organismo. A já mencionada regulação negativa da DDAH-1 pelo próprio NO, representa um mecanismo fisiológico de controle da disponibilidade deste gás que, apesar de apresentar oferta mais elevada no tecido renal em resposta ao treinamento físico, também deverá ter sua produção controlada a fim de evitar desequilíbrios homeostáticos.

Desta forma, a regucalcina por apresentar efeito inibitório em várias proteínas dependentes de cálcio-calmodulina, como as isoformas constitutivas da NOS, vem sendo considerada importante moduladora da produção de NO, impedindo desta forma, conforme evidenciado em células provenientes do cérebro de ratos, aumentos excessivos na produção desta molécula que poderiam interferir na neurotransmissão ou provocar morte celular (468).

O controle da atividade da NOS interfere também, com a produção de peróxido de nitrito que conforme descrito pode ser formado a partir da interação entre NO e o ânion superóxido. Neste contexto, a superóxido dismutase, outra importante proteína antioxidante com potencial para inativar o ânion superóxido, e capaz de prevenir a apoptose celular, pode ser ativada pela regucalcina reforçando a importância desta proteína na proteção das células renais (473). Assim, por seu efeito anti-apoptótico renal, a regucalcina contribui para manutenção da integridade e funcionalidade deste órgão frente a situações de estresse.

Coerente com a maior expressão da regucalcina no rim de coelhos treinados, e conforme evidenciado na figura 5.16, encontramos tendência de aumento na expressão da isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD-2) no córtex renal destes animais em todas as condições experimentais.

5.5- Proteínas do metabolismo de carboidratos, peptídeos e lipídios

5.5.1- Enzimas da beta-oxidação e da fosforilação oxidativa

As figuras 5.17 a 5.21, mostram as diferentes intensidades associadas a expressão de proteínas da fosforilação oxidativa, cadeia transportadora de elétrons e da beta oxidação. A análise destas figuras evidencia a existência, no córtex renal de animais treinados, de alteração no padrão de expressão de proteínas da fosforilação oxidativa, com redução significativa na expressão da proteína da ubiquinol citocromo c redutase (figura 5.17) e tendência de redução das proteínas ATP sintase (figura 5.18) e flavoproteína transferidora de elétrons (figura 5.19).

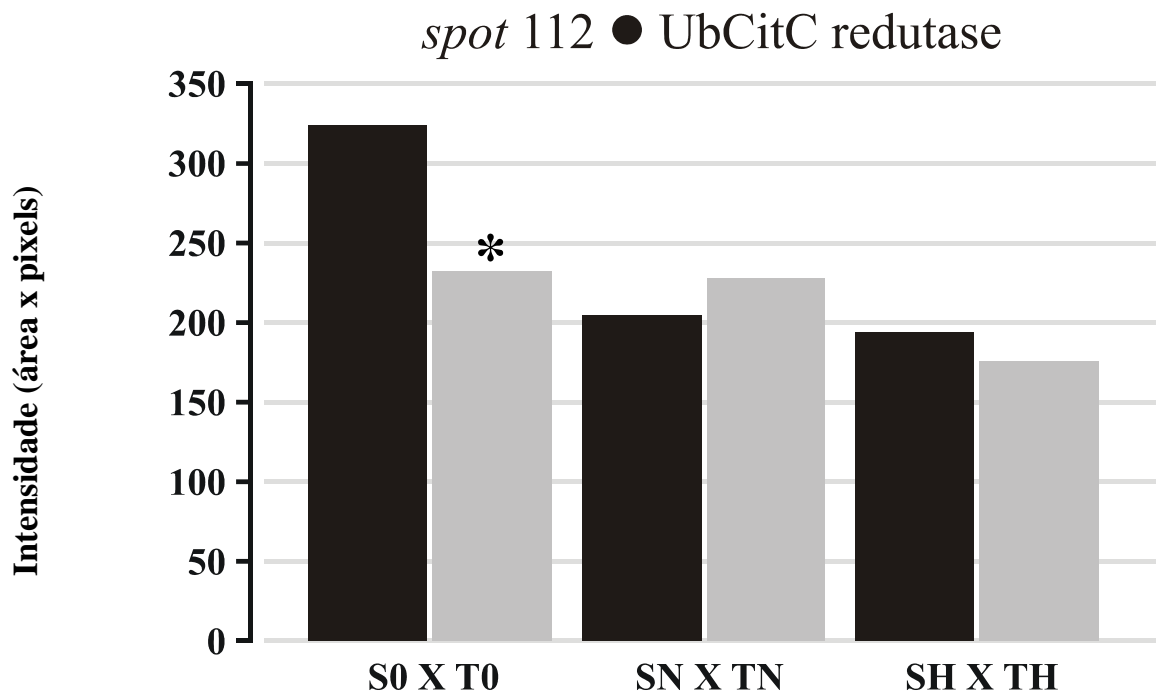


Figura 5.17. Intensidade da UbCitC redutase entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína ubiquinol citocromo c redutase (UbCitC redutase; *spot 112*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs S0.

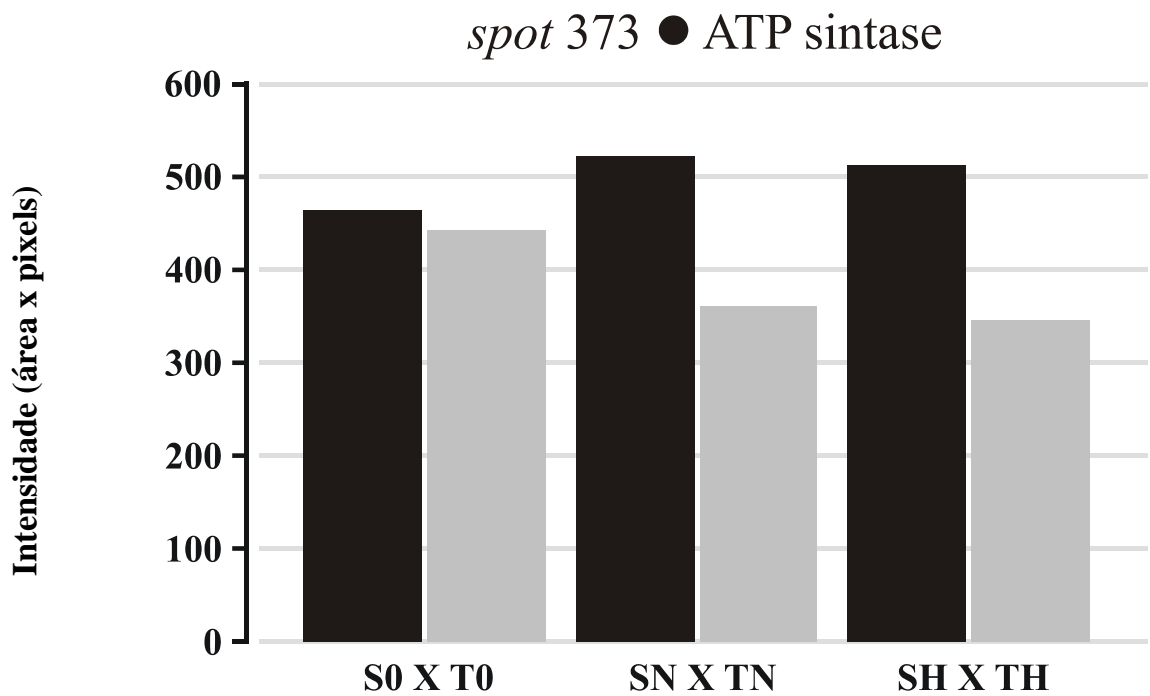


Figura 5.18. Intensidade da ATP sintase entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína ATP sintase (*spot 373*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose.

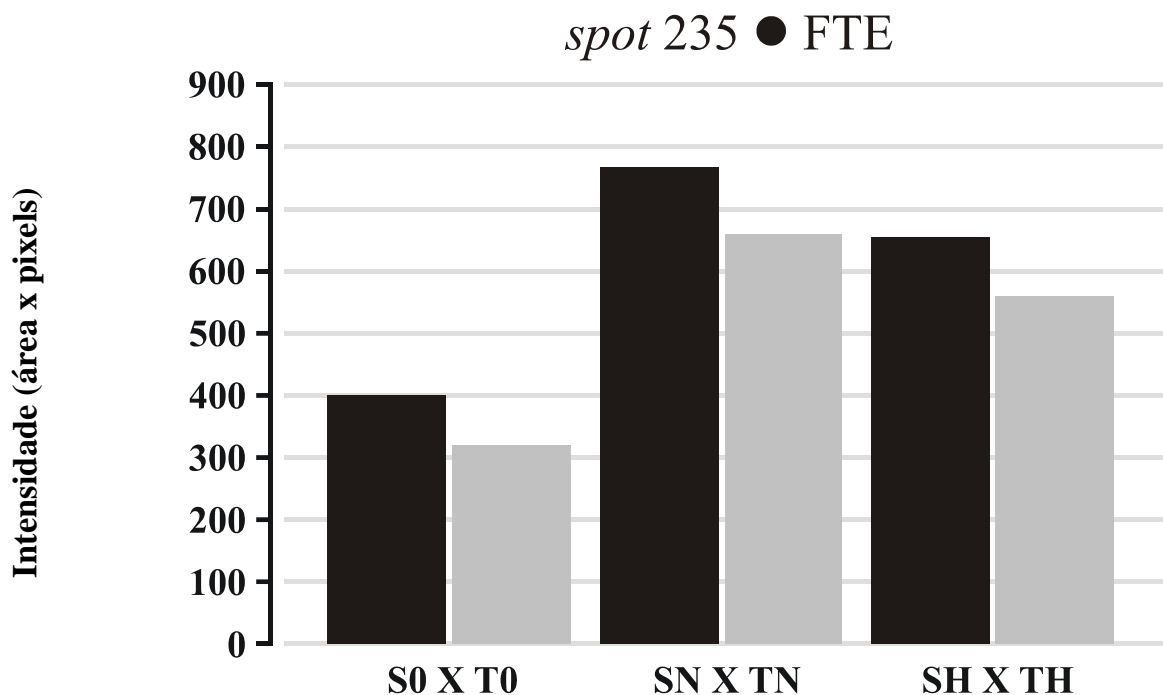


Figura 5.19. Intensidade da FTE entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a flavoproteína transferidora de elétrons (FTE; *spot 235*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose.

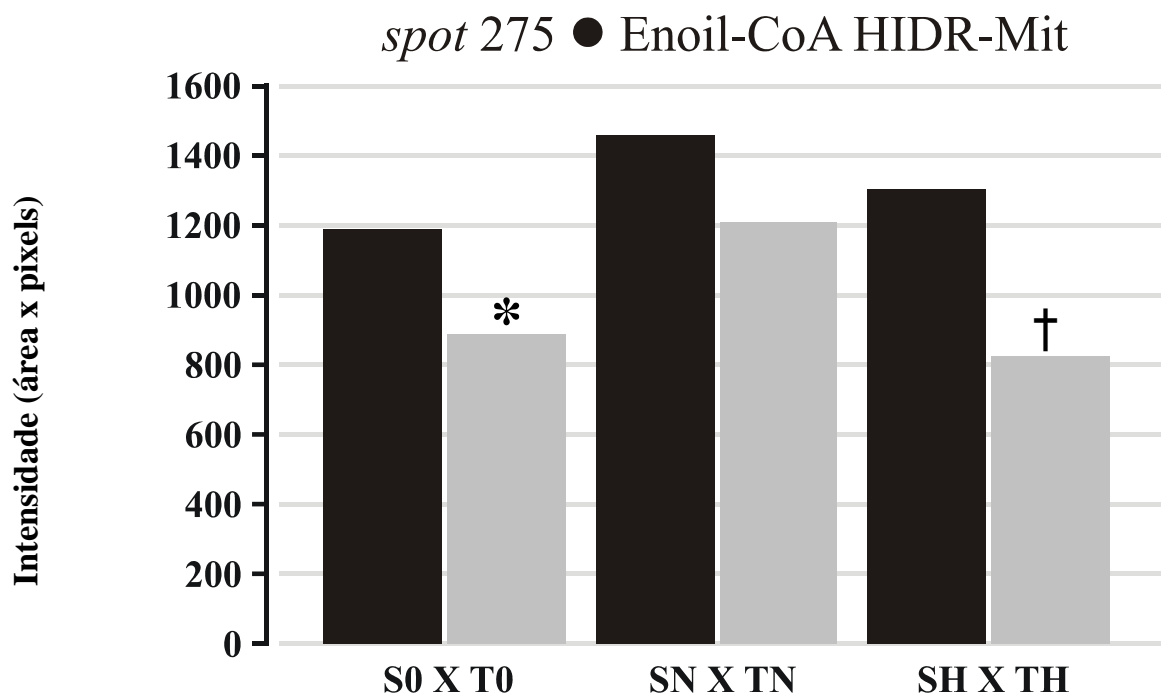


Figura 5.20. Intensidade da Enoil-CoA HIDR-Mit entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma mitocondrial da proteína enoil-CoA hidratase (Enoil-CoA HIDR-Mit; *spot 275*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs S0. † P<0,05 vs SH.

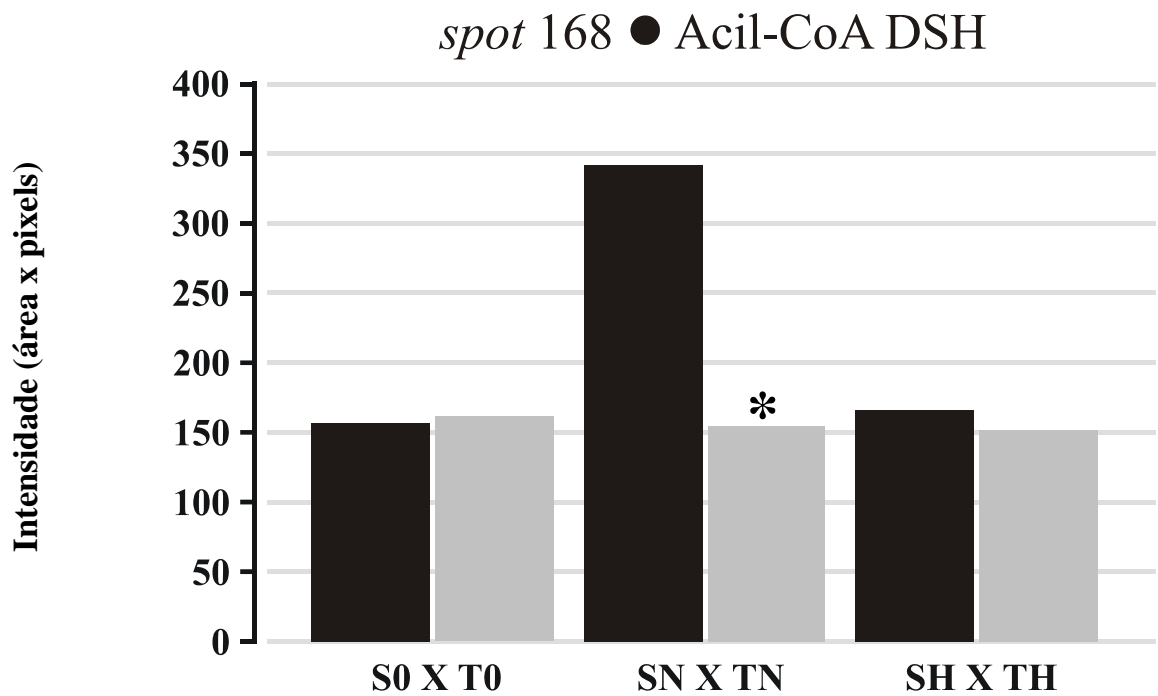


Figura 5.21. Intensidade da Acil-CoA DSH entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína acil-CoA desidrogenase (Acil-CoA DSH; *spot 168*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SN.

Revela também, padrão semelhante na expressão de proteínas associadas a beta oxidação, enoil Co-A hidratase mitocondrial (figura 5.20) e acil Co-A desidrogenase (figura 5.21).

Trata-se de uma adaptação metabólica inusitada para o treinamento físico. Em geral, quando as enzimas da beta oxidação e da fosforilação oxidativa são analisadas em tecidos como o músculo esquelético e cardíaco, parece existir aumento significativo de suas expressões em resposta ao treinamento físico. Isto confere uma maior capacidade de oxidação de lipídios que é subsidiada por um maior consumo de oxigênio destes tecidos. No entanto, a maior atividade das enzimas oxidativas do músculo esquelético deve-se ao aumento da razão NAD/NADH e da presença de íons cálcio, necessários a contração muscular, o que não ocorre nos rins durante o exercício (474). Com cerca de 300g de massa total, os rins recebem, quando o corpo se encontra em repouso, cerca de 22% do débito cardíaco extraindo nestas condições, apenas 6% do oxigênio presente no sangue que lhe é ofertado. Durante o exercício físico, a circulação renal sofre dramática redução do fluxo de sangue de forma proporcional à intensidade do mesmo, mas isto pode não representar, na ausência de condições fisiopatológicas, um evento isquêmico sobre o órgão. Apesar de alguns autores como Podhorska-Okolow e colaboradores (294), sugerirem que o exercício é capaz de mimetizar eventos de isquemia e reperfusão, mesmo quando ocorre redução abrupta da parcela do débito cardíaco que lhe é inerente, como durante o exercício de alta intensidade, os rins simplesmente extraem uma maior quantidade de oxigênio do sangue nestas condições e não parecem ser influenciados nestes termos durante o exercício.

Nos rins, o consumo de oxigênio não aumenta de forma proporcional à intensidade do exercício, mas depende da magnitude das funções reabsortivas que utilizam o potencial eletroquímico gerado pela bomba Na^+/K^+ . Neste contexto, a hiperfiltração glomerular, evento que faz parte da nefropatia diabética e se encontra associado à hiperglicemia, determina aumento da taxa de reabsorção de eletrólitos e consequente elevação do consumo de oxigênio das células tubulares.

Desta forma, é fácil compreender porque o consumo de oxigênio do córtex e da medula renal, isolados de animais diabéticos, se encontra significativamente aumentado (475). No entanto, evidências sugerem que tais alterações independam das modificações na taxa de filtração glomerular e, portanto, não estejam exclusivamente relacionadas à atividade da Na^+/K^+ ATPase (475).

O maior estresse oxidativo, característica do DM, diminui a biodisponibilidade do NO e reduz também, a capacidade deste gás de exercer suas influências desaceleradoras sobre a respiração mitocondrial (475). O potencial do NO em inibir a utilização de oxigênio nos rins,

foi demonstrada em estudo pioneiro de Laycock e colaboradores (476) aonde a administração de inibidor da NOS era capaz de aumentar a utilização de oxigênio nas células deste órgão apesar da redução da taxa de filtração glomerular e do transporte de sódio.

Sabe-se que o NO é capaz de impedir o transporte mitocondrial de elétrons (477) através da inibição reversível da citocromo c oxidase (478). E de fato, tal fenômeno já foi demonstrado em cardiomiócitos de ratos através da indução da HSP90, proteína reconhecidamente envolvida na ativação da eNOS, que aumenta a disponibilidade de NO que por sua vez reduz o consumo de oxigênio mitocondrial nestas células (479).

Da mesma forma, drogas doadoras de NO reduzem o consumo de oxigênio no músculo esquelético e cardíaco enquanto os inibidores da enzima exercem efeito exatamente contrário (480). Mesmo durante o exercício, o consumo de oxigênio aumenta significativamente nestes tecidos após a inibição da eNOS sugerindo que o gás controle continuamente a atividade respiratória mitocondrial (481, 482).

Se considerarmos que o córtex de animais treinados apresenta maior disponibilidade de NO, é razoável especular que este gás exerça efeito crônico inibitório sobre o consumo de oxigênio das mitocôndrias deste tecido e explique também porque, em nosso modelo experimental, a oxidação de gordura pareça diminuir em resposta ao exercício. A crônica disponibilidade de NO poderia reduzir a atividade das enzimas envolvidas na respiração celular sem afetar significativamente a capacidade de produção de energia no órgão.

Tais resultados são conflitantes com as adaptações encontradas por Boveris e Navarro (483) em camundongos treinados aonde apesar dos aumentos na expressão de isoformas da NOS evidenciou-se elevação significativa da atividade do complexo IV mitocondrial em órgãos como o cérebro, o fígado e também, os rins. No entanto, de acordo com as idéias anteriormente expostas, foi recentemente reforçado em células endoteliais humanas provenientes do cordão umbilical, o potencial inibitório do NO sobre o complexo IV mitocondrial (484).

A redução da respiração mitocondrial das células do córtex renal de coelhos pode contribuir para uma menor formação de ROS e conseqüentemente, maior biodisponibilidade de NO na circulação renal destes animais. Desta forma, esta modificação no perfil de expressão de enzimas envolvidas nos processos de oxidação de gordura e fosforilação oxidativa podem contribuir também para explicar porque a resposta de vasodilatação dependente de endotélio na circulação renal de animais treinados é significativamente mais elevada do que o observado em animais sedentários.

5.5.2- Enzimas da via gliconeogênica

As figuras 5.22, 5.23 e 5.24 evidenciam aumento significativo da expressão de enzimas gliconeogênicas no córtex renal de animais treinados. De fato, as enzimas da via glicolítica, triose fosfato isomerase (figura 5.21) e alfa-enolase (figura 5.22) apresentam expressão significativamente mais elevada no córtex renal de animais treinados que tiveram a circulação renal tratada com concentração fisiológica de glicose. Estas enzimas permitem respectivamente, a interconversão entre gliceraldeído-3 fosfato e diidroxiacetona fosfato, assim como a desidratação do 2-fosfoglicerato para formar fosfoenolpiruvato, que na via glicolítica objetiva a formação de piruvato. Entretanto, atuam de forma bifuncional catalizando também, inversamente as mesmas reações e neste contexto, podem ser consideradas enzimas gliconeogênicas.

No processo de formação de glicose conhecido como gliconeogênese, desempenhado predominantemente por órgãos como fígado e rins, existem certas etapas da via glicolítica que precisam ser vencidas. Reações glicolíticas irreversíveis, como a catalizada pela fosfofrutocinase (PFK-1), impedem que precursores gliconeogênicos ascendam diretamente através da via de degradação da molécula de glicose. A PFK-1 cataliza a fosforilação do carbono 1 da molécula frutose-6-fosfato com o dispêndio de uma molécula de ATP para formar frutose 1,6 bifosfato e representa uma importante limitação para a formação de glicose por estes órgãos gliconeogênicos. A hidrólise da frutose 1,6 bifosfato pela enzima frutose 1,6 bifosfatase ultrapassa esta reação irreversível catalisada pela PFK-1 e provê um meio energeticamente favorável para a formação de frutose-6-fosfato sendo considerada uma importante reação reguladora da gliconeogênese.

Neste contexto, conforme evidenciado através da figura 5.24, houve aumento significativo da expressão da enzima frutose 1,6 bifosfatase no córtex renal de animais treinados que não tiveram a circulação renal tratada com glicose que, ao lado dos aumentos na expressão da triose fosfato isomerase e alfa-enolase podem contribuir para o aperfeiçoamento do processo gliconeogênico renal com implicações positivas para a manutenção da glicemia em situações de estresse como durante o exercício físico prolongado, aonde existe constante consumo de glicose por parte do músculo esquelético reduzindo a disponibilidade sanguínea desta molécula.

Entretanto, a identificação de outra proteína, a malato desidrogenase citosólica (figura 5.25), igualmente envolvida na gliconeogênese e com expressão significativamente mais elevada no córtex renal de coelhos sedentários, não corrobora as especulações acima realizadas sugerindo a realização de outras investigações mais aprofundadas para esclarecer a questão.

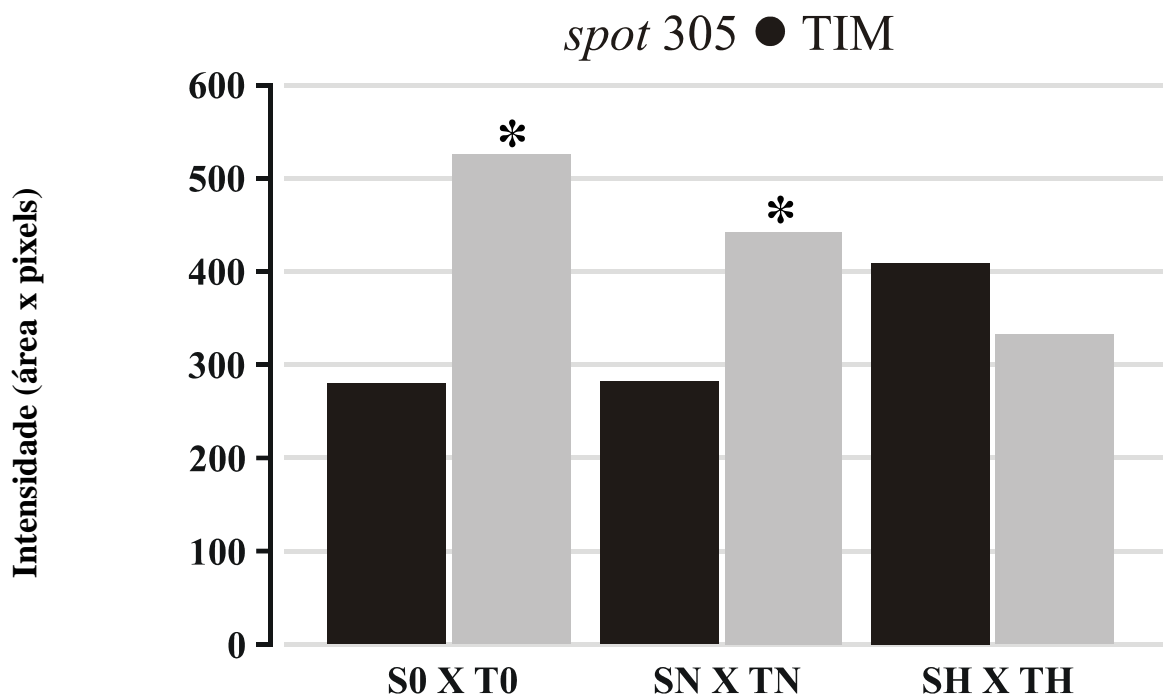


Figura 5.22. Intensidade da TIM entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína triose fosfato isomerase (TIM; *spot 305*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SN.

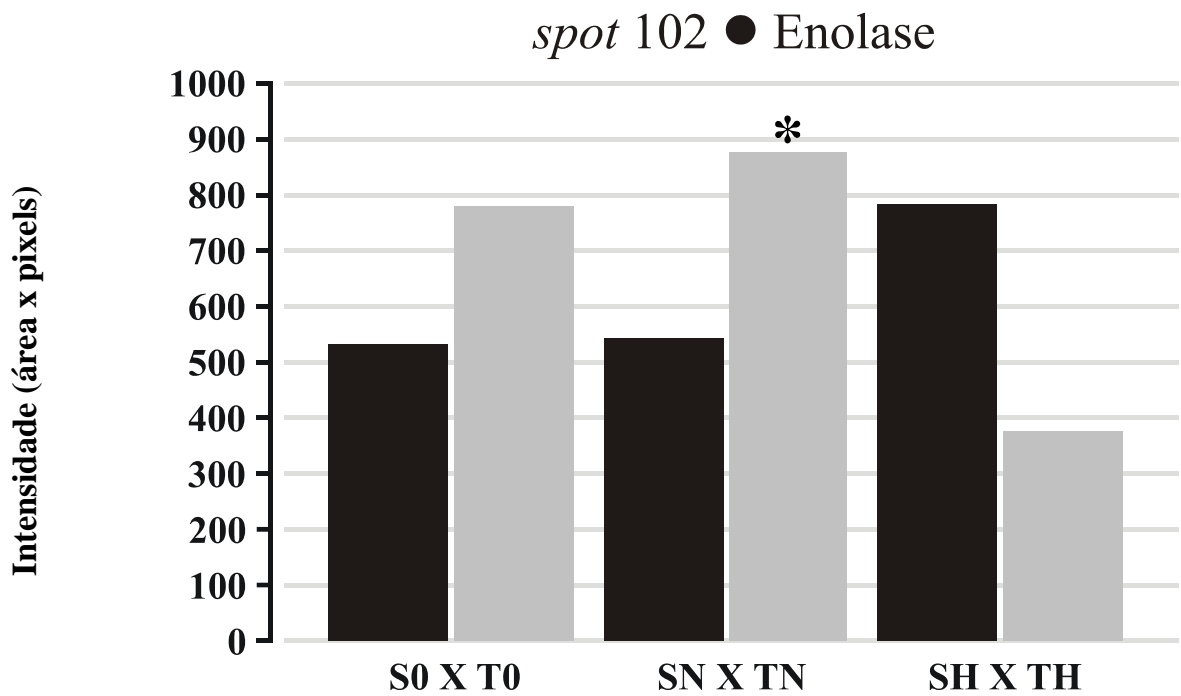


Figura 5.23. Intensidade da enolase entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a proteína enolase (*spot* 102). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. * $P < 0,05$ vs SN.

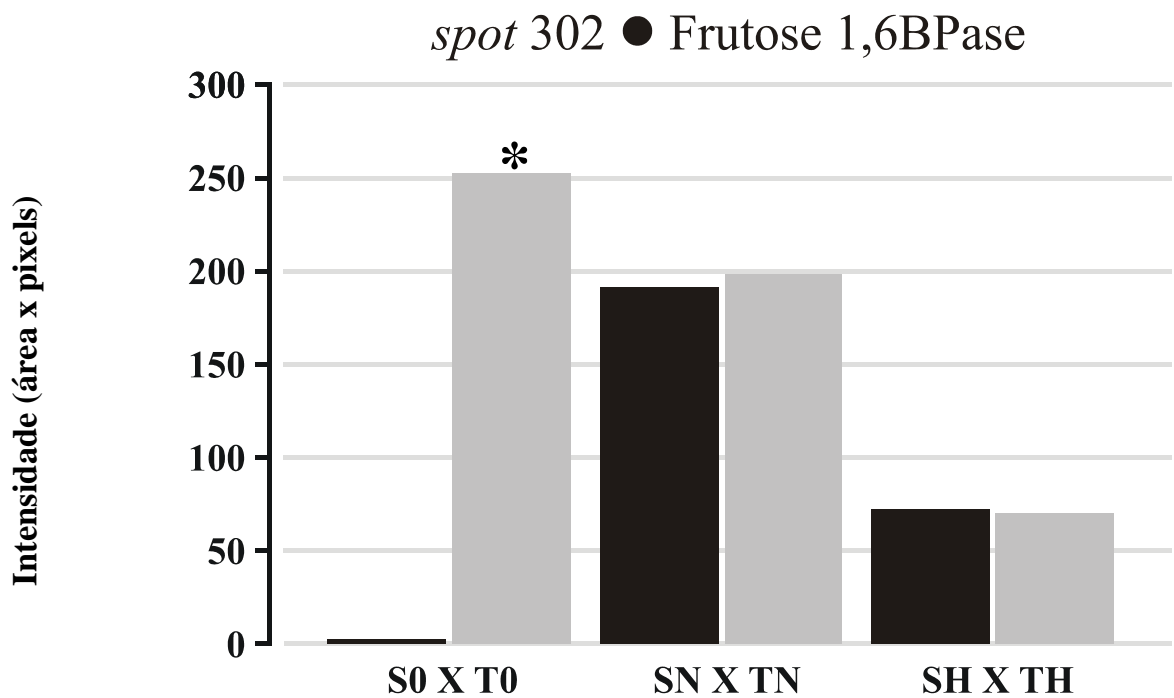


Figura 5.24. Intensidade da Frutose 1,6BPase entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma mitocondrial da proteína frutose 1,6 bifosfatase (Frutose 1,6BPase *spot 302*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs S0.

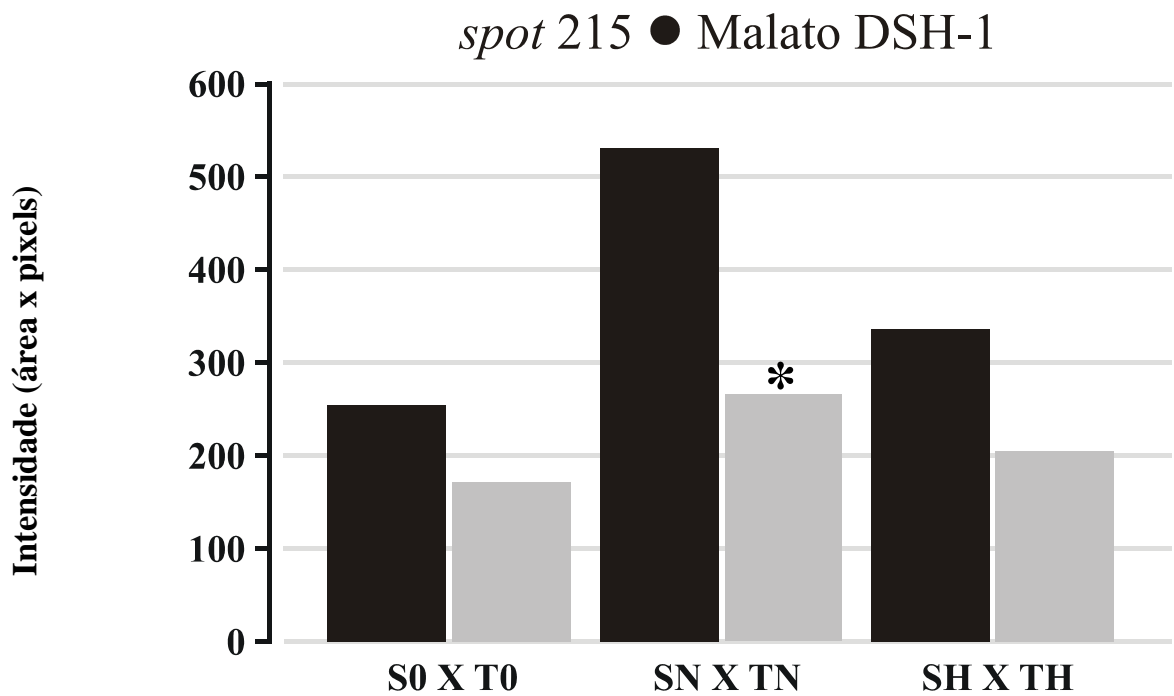


Figura 5.25. Intensidade da Malato DSH-1 entre os grupos do experimento 2. Intensidade média relativa ao *pool* de proteínas separadas por eletroforese bidimensional em cada grupo experimental e identificadas por espectrometria de massa como sendo a isoforma citosólica da proteína malato desidrogenase (Malato DSH-1; *spot 215*). As proteínas são provenientes do córtex renal de coelhos sedentários (S) e treinados (T) nas seguintes condições experimentais: i) circulação renal isenta de pré-tratamento com glicose (S0 e T0), ii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração normal (5mM) de glicose (SN e TN), iii) circulação renal com pré-tratamento durante 3 horas com concentração elevada (50mM) de glicose. *P<0,05 vs SN.

5.6- Considerações Finais

O conjunto de adaptações proporcionadas pelo treinamento físico revela pelo menos quatro rotas metabólicas principais que contribuem para o aprimoramento dos mecanismos de resposta celular frente ao estresse e aumento da biodisponibilidade de NO. Neste contexto, existem fortes indícios de que o exercício dinâmico crônico seja capaz de induzir modificações renais que incluem: i) aceleração do transporte de colesterol para os cavéolos e conseqüente migração e ativação da enzima eNOS nestas localidades da membrana; ii) expressão do potencial de exportação de albumina e importação de NO proveniente da nitrosoalbumina plasmática; iii) aperfeiçoamento das defesas de proteção celular contra a ação deletéria dos ROS e xenobióticos; e iv) melhoria no controle da atividade da enzima NOS.

A maior expressão da apolipoproteína A-1 e a tendência de aumento da proteína ciclofilina identificados no córtex renal de coelhos treinados, parecem revelar importante aperfeiçoamento no sistema de transporte de colesterol para os cavéolos que é necessário para a ativação da enzima eNOS e manutenção de sua localização geográfica vicinal a membrana. A possibilidade desta enzima ser diretamente ativada pela apolipoproteína A-1 e a participação da ciclofilina na síntese de BH₄, podem contribuir ainda, para a maior produção de NO e aprimoramento de seu papel na manutenção da homeostasia celular. Por outro lado, as evidências de que a migração da eNOS para os cavéolos, diretamente relacionada ao conteúdo de colesterol neste microdomínio, é dependente da dinâmica do citoesqueleto e envolve a polimerização da actina, revela a existência de outros mecanismos integrados que asseguram a adequada ativação da enzima. Neste contexto, identificamos aumentos na expressão das proteínas HSP27 e vilina que além de seus papéis estabilizadores do citoesqueleto, protegendo-o contra a fragmentação provocada por agentes oxidativos, são capazes de controlar a polimerização dos monômeros de actina que, mediante estímulos de cisalhamento vascular, transportam a eNOS desde as regiões perinucleares até o cavéolo membranar contribuindo também, para a recuperação celular pós-insulto oxidativo.

Os aumentos na expressão das proteínas de estresse HSP60 e GRP75, também identificados no córtex renal de coelhos treinados, representam outro importante mecanismo de preservação da função das proteínas e bloqueio das vias pró-apoptóticas ativadas diante do estresse oxidativo. Além do mais, estas chaperonas moleculares encontram-se envolvidas na ativação da NOS e podem contribuir para o aumento da disponibilidade de NO, que no rim, também possui ação anti-apoptótica. Por outro lado, os aumentos na expressão de enzimas antioxidantes como peroxiredoxina 6, proteína disulfeto isomerase e glutathione transferase, induzidos pelo treinamento físico no córtex renal de coelhos, poderão da mesma forma, além

de neutralizarem a ação dos ROS, assegurar a atividade de enzimas cujo funcionamento depende da manutenção de seus grupamentos tiol como é o caso da eNOS.

O fato da proteína disulfeto isomerase se encontrar diretamente envolvida em reações de transnitrosilação com a albumina, proteína abundantemente encontrada no córtex renal de animais treinados, revela interessante mecanismo exercido pelos rins na produção de mercaptoalbumina, indispensável para atividade antioxidante do plasma e de nitrosotiois que armazenam e transferem o NO para outros leitos vasculares. Este conjunto de alterações na expressão de proteínas pode contribuir determinadamente para proteção de estruturas renais como os glomérulos, túbulos e vasos sangüíneos, freqüentemente danificados durante a nefropatia diabética. Além do mais, revelam potencial renal de exportação de moléculas antioxidantes e nitrosiladas que participam da homeostasia vascular.

Da mesma forma, a Aldo-ceto redutase, igualmente identificada com maior expressão no córtex renal de coelhos treinados, pode representar, ao lado da maior expressão da glutathione transferase, o aprimoramento dos mecanismos de solubilização de xenobióticos e, juntamente com a peroxiredoxina 6, a apuração dos processos de remoção do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos, como o MDO e o 4HNE, diretamente envolvidos na propagação do estresse oxidativo celular e associados aos danos de diferentes estruturas renais.

Finalmente, a descoberta de que o treinamento físico é capaz de aumentar a expressão renal da dimetilaminohidrolase, além de criar boas perspectivas para metodologias terapêuticas que utilizam o exercício físico na prevenção de doenças renais relacionadas a distúrbios metabólicos, que quase sempre se caracterizam por elevação dos níveis de ADMA, é coerente com o conjunto de adaptações observadas que parecem aumentar a resistência ao estresse das células renais e consolidar sua atividade fisiológica.

Estas adaptações, realizadas em resposta ao exercício físico e verificadas no córtex renal de coelhos, podem explicar também, porque o treinamento de corrida de 12 semanas em intensidade moderada é capaz de aumentar a resposta de vasodilatação dependente de endotélio na circulação renal destes animais e proteger este leito vascular contra o efeito deletério da glicose elevada em mecanismo predominantemente associado a maior disponibilidade de NO.

A ampliação das propriedades antioxidantes e chaperona das células renais e os mecanismos envolvidos na maior ativação da eNOS além de justificarem os aumentos da disponibilidade de NO, permitem a percepção de outros mecanismos adaptativos associados ao treinamento físico. Coerente com a proposta da proteômica funcional, que revela novas hipóteses a serem investigadas, propusemos que o treinamento físico seria capaz de através da

maior disponibilidade de NO, reduzir, dentro dos limites fisiológicos, a respiração celular nas células do córtex renal. Tal premissa deriva da observação de que enzimas associadas com a beta oxidação, fosforilação oxidativa e cadeia transportadora de elétrons, parecem apresentar expressão mais reduzida no córtex renal de animais treinados e é coerente com a produção de estado redox celular reduzido, já que a desaceleração mitocondrial induzida por NO, diminui a possibilidade de produção de ROS por esta organela.

Depreende-se do exposto que todas as vias moleculares potencialmente modificadas pelo treinamento físico, convergem para um aumento da biodisponibilidade de NO que apesar da participação na manutenção da homeostasia celular já foi envolvido em processos pró-apoptóticos. Acredita-se que a fisiologia celular dependa da produção fisiológica de quantidades moderadas de NO, o que é assegurado pela ativação das isoformas constitutivas da NOS. No entanto, aumentos excessivos de NO, associados não apenas a ativação de isoformas indutivas da NOS, mas também a hiperativação das isoformas constitutivas, podem produzir danos celulares irreversíveis. Neste sentido, verificamos no córtex renal de animais treinados, aumento da expressão da proteína regucalcina, diretamente envolvida na prevenção de eventos apoptóticos que participa também da redução na atividade das isoformas da NOS, desvendando indícios de mecanismo de retrocontrole celular relacionado à disponibilidade do NO.

Como indicam as estatísticas, o DM-2 é uma das doenças que mais cresce em todos os países industrializados, contextos em que a cultura tende a reforçar os hábitos de sedentarismo e super-alimentação. Como consequência, enfrenta-se o desenvolvimento da obesidade, com diferentes níveis de intolerância à glicose e resistência à insulina. Em grande parte, a prevenção das doenças crônico-degenerativas depende de modificação no estilo de vida populacional nas sociedades modernas, com lugar de destaque para a incorporação de exercícios aeróbicos regulares, eis que essa prática pode representar importante estímulo para manutenção da homeostase vascular e da integridade das células renais.

6- CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados neste estudo, podemos concluir que o exercício dinâmico crônico de intensidade moderada é capaz de modificar o fenótipo renal aprimorando mecanismos moleculares que conferem proteção celular contra os efeitos deletérios associados ao estresse oxidativo e aumentam a biodisponibilidade de óxido nítrico.

Estas adaptações induzidas pelo treinamento físico podem aumentar a resistência das estruturas renais frente aos desafios impostos por condições fisiopatológicas como hipertensão e diabetes mellitus que envolvem o desequilíbrio de forças oxidantes e antioxidantes com o predomínio da primeira sobre a segunda. Se considerarmos que a produção de ROS aumenta moderadamente durante os estímulos agudos de exercício físico, baseados no conceito de hormese, é razoável especular que estas moléculas representem importante estímulo para indução das respostas adaptativas mediadas pelo exercício físico. Neste contexto, os extremos de ROS produzidos em inúmeras condições fisiopatológicas podem ultrapassar o limiar de adaptabilidade tecidual e contribuir para o desenvolvimento da doença renal. Assim, indivíduos treinados mesmo quando expostos a perturbação excessiva da homeostasia, poderão apresentar respostas defensivas mais eficazes provenientes de mecanismos previamente aperfeiçoados.

Por outro lado, os aumentos diários e intermitentes do estresse de cisalhamento na circulação renal, associados aos estímulos agudos de exercício físico, podem incitar da mesma forma, após o período de treinamento, respostas adaptativas representadas pelas alterações na expressão de diferentes grupos de proteínas no córtex renal. Tal potencial adaptativo dos rins frente aos estímulos do exercício físico é inédito na literatura e abre perspectivas de investigação dos efeitos protetores do treinamento aeróbico sobre as alterações teciduais desencadeadas por outras condições fisiopatológicas como hipertensão e insuficiência cardíaca. Além disso, os ajustes moleculares induzidos pelo treinamento físico, e verificadas em nossos estudos nas células do córtex renal, podem induzir alterações no metabolismo energético e do colesterol, ambos diretamente relacionados com o aumento da biodisponibilidade de NO.

Diante dos resultados encontrados, podemos inferir que a prática regular de atividade física aeróbica, de intensidade moderada, representa necessidade imperiosa para a expressão do pleno potencial fenotípico renal, fator que pode possibilitar a prevenção das complicações renais associadas à hiperglicemia. Mais do que necessidade, a prática regular de exercícios físicos pode representar característica fisiológica do ser humano incorporada no genoma e assegurada por milhares de anos de pressão evolutiva, que foi capaz de transformar primatas

vegetarianos em carnívoros caçadores, prontos e projetados para a luta física diária pela sobrevivência.

Perspectivas

Os resultados instigam novos interesses e possibilidades de futuras investigações na área da fisiologia do exercício e da etiopatogenia da disfunção vascular mediada pelo desafio hiperglicêmico. Sob esse enfoque, é fundamental a identificação molecular dos níveis de eNOS na circulação renal de coelhos sedentários e treinados tratados com diferentes concentrações de glicose, com o intuito de verificar eventuais alterações na expressão, atividade e quantidade dessa enzima. Tal procedimento não foi possível em nosso modelo experimental uma vez que a eNOS apresenta massa molecular de 133kDa (a isoforma neuronal possui massa molecular de 161kDa) e portanto, além dos limites de peso molecular estabelecidos em nossas condições experimentais (390). Além do mais, o pI da enzima é de 7,26 e portanto, além da faixa utilizada em nosso experimento (pI de 3-7NL).

Da mesma forma, faz-se necessária a confirmação dos resultados encontrados no presente estudo, o que poderá ser obtido através da realização de técnicas de quantificação do RNAm (DNA microarray) ou imunomarcação de cada uma das proteínas envolvidas nos mecanismos adaptativos associados ao treinamento físico e investigação mais aprofundada de cada uma das vias metabólicas identificadas em nossos experimentos.

7- REFERÊNCIAS

- (1) Lee ET, Keen H, Bennett PH, Fuller JH, Lu M. Follow-up of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia*. 2001;44(2):S3-S13.
- (2) Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. 2001 Sep;44 Suppl 2:S14-21.
- (3) Barnett P, Braunstein GD. Diabetes Mellitus. In: Carpenter CJ, Griggs RC, Loscalzo J. editors. *Cecil Essentials of Medicine*. 5 ed. New York: Saunders Company, 2001. p. 583-598.
- (4) Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
- (5) Hu G, Lakka TA, Kilpeläinen TO, Tuomilehto J. Epidemiological studies of exercise in diabetes prevention. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007 Jun;32(3):583-95.
- (6) World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization; 1999.
- (7) Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*. 2001 Feb;22(1):36-52.
- (8) Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003 May;26(5):1589-96.
- (9) De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000 Jul;130(5):963-74.
- (10) Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Nov-Dec;22(6):423-36.
- (11) Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2007 Jun;4(2):89-102.
- (12) Schmidt-Nielsen K. *Fisiologia Animal. Adaptação e meio-ambiente*. 2nd ed. São Paulo: Santos editora; 1999. p.93-108.
- (13) Marfella R, Quagliaro L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(4):635-6.
- (14) Kim SH, Park KW, Kim YS, Oh S, Chae IH, Kim HS, Kim CH. Effects of acute hyperglycemia on endothelium-dependent vasodilation in patients with diabetes mellitus or impaired glucose metabolism. *Endothelium*. 2003;10(2):65-70.

- (15) Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract.* 2006 Jan-Feb;12 Suppl 1:60-2.
- (16) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):837-53.
- (17) Higgins GT, Khan J, Pearce IA. Glycaemic control and control of risk factors in diabetes patients in an ophthalmology clinic: what lessons have we learned from the UKPDS and DCCT studies? *Acta Ophthalmol Scand.* 2007 Nov;85(7):772-6.
- (18) Hammersen F, Hammersen E, Osterkamp B. Structure and Function of the Endothelial Cell. In: Messmer K, Hammersen F editors. *Structure and Function of Endothelial Cells.* 1ed. Lindau, (Germany): Karger; 1983. p. 1-16.
- (19) Carvalho MHC, Scivoletto R, Nigro D, Fortes ZB. Funções fisiológicas do endotélio vascular. *Rev Soc Cardiol Est SP.* Mar;1996 2: 121-128.
- (20) Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood.* 2008 Jun 1;111(11):5271-5281.
- (21) Khazaei M, Moien-Afshari F, Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology.* 2008 Jun;15(1):49-67.
- (22) Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Sep;291(3):H985-1002.
- (23) Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J.* 2003 Jul;67(7):572-5.
- (24) Zilla P, von Oppell U, Deutsch M. The endothelium: a key to the future. *J Card Surg.* 1993 Jan;8(1):32-60.
- (25) Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: Modulator of cardiovascular function.* Boca Raton: CRC Press Inc; 1990.
- (26) Esper RJ, Vilariño JO, Machado RA, Paragano A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol.* 2008;45:17-43.
- (27) Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes.* 2003 Nov;52(11):2795-804.
- (28) Ho FM, Lin WW, Chen BC, Chao CM, Yang CR, Lin LY, Lai CC, Liu SH, Liao CS. High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through

NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal*. 2006 Mar;18(3):391-9.

(29) Esper RJ, Vilariño JO, Machado RA, Paragano A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol*. 2008;45:17-43.

(30) Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacol Res*. 2004 Jun;49(6):565-80.

(31) Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Jul;18(7):252-6.

(32) Coleman HA, Tare M, Parkington HC. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004 Sep;31(9):641-9.

(33) Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*. 1998 Mar-Apr;35(2):73-84.

(34) Lely AT, Luik PT, Navis G. Angiotensin I-converting enzyme: a pathogenetic role in diabetic renal damage? *Curr Diabetes Rev*. 2007 Feb;3(1):41-52.

(35) Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. A possible involvement of crosstalk between advanced glycation end products (AGEs) and asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor in accelerated atherosclerosis in diabetes. *Med Hypotheses*. 2007;69(4):922-4.

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

(37) Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007 Jan;3(1):46-56.

(38) Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Jun;10(6):1115-26.

(39) Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005 Feb;144(4):449-58.

(40) Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol*. 2008;45:1-16.

(41) Bell DS, O'Keefe JH, Jellinger P. Postprandial dysmetabolism: the missing link between diabetes and cardiovascular events? *Endocr Pract*. 2008 Jan-Feb;14(1):112-24.

- (42) Tanne D. Impaired glucose metabolism and cerebrovascular diseases. *Adv Cardiol.* 2008;45:107-13.
- (43) Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation.* 1998 May 5;97(17):1695-701.
- (44) Xiang GD, Sun HL, Hou J, Yue L, Xu L. Acute hyperglycemia rapidly suppresses endothelium-dependent arterial dilation in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008 Feb;116(2):112-7.
- (45) Ceriello A, Davidson J, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Owens D, Tajima N, Tuomilehto J; International Prandial Glucose Regulation Study Group. Postprandial hyperglycaemia and cardiovascular complications of diabetes: an update. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Oct;16(7):453-6.
- (46) Leiter LA, Ceriello A, Davidson JA, Hanefeld M, Monnier L, Owens DR, Tajima N, Tuomilehto J; International Prandial Glucose Regulation Study Group. Postprandial glucose regulation: new data and new implications. *Clin Ther.* 2005;27 Suppl B:S42-56.
- (47) Gerich JE. Postprandial hyperglycemia and cardiovascular disease. *Endocr Pract.* 2006 Jan-Feb;12 Suppl 1:47-51.
- (48) Gerich JE. Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Arch Intern Med.* 2003 Jun 9;163(11):1306-16.
- (49) Barr CC. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive insulin therapy, by The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N. Engl. J. Med* 342:381-9, 2000.
- (50) Vaag AA. Glycemic control and prevention of microvascular and macrovascular disease in the Steno 2 study. *Endocr Pract.* 2006 Jan-Feb;12 Suppl 1:89-92.
- (51) Fioretto P, Bruseghin M, Berto I, Gallina P, Manzato E, Mussap M. Renal protection in diabetes: role of glycemic control. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Apr;17(4 Suppl 2):S86-9.
- (52) Meeuwisse-Pasterkamp SH, van der Klauw MM, Wolffenbuttel BH. Type 2 diabetes mellitus: prevention of macrovascular complications. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008 Mar;6(3):323-41.
- (53) Wagner PD. The biology of oxygen. *Eur Respir J.* 2008 Apr;31(4):887-90.
- (54) Voeikov VL. Biological oxidation: over a century of hardship for the concept of active oxygen. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005 Dec 14;51(7):663-75.
- (55) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3ed. Oxford: University Press London; 2000.

- (56) Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, Zorkani MA. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006 Jul;4(3):215-27.
- (57) Voeikov VL. Reactive oxygen species (ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J Altern Complement Med*. 2006 Mar;12(2):111-8.
- (58) Mancuso C, Scapagini G, Currò D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:1107-23.
- (59) Voeikov VL. Reactive oxygen species (ROS): pathogens or sources of vital energy? Part 2. Bioenergetic and bioinformational functions of ROS. *J Altern Complement Med*. 2006 Apr;12(3):265-70.
- (60) Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*. 2006 Nov;34(Pt 5):960-4.
- (61) Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008 Mar;23(3):381-90.
- (62) Haidara MA, Yassin HZ, Rateb M, Ammar H, Zorkani MA. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006 Jul;4(3):215-27.
- (63) Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):153-9.
- (64) Son SM, Whalin MK, Harrison DG, Taylor WR, Griending KK. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep*. 2004 Aug;4(4):247-52.
- (65) Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Sep;77 Suppl 1:S65-70.
- (66) Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2007 Aug;262(2):173-83.
- (67) Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131-42.
- (68) Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther*. 2005 Nov-Dec;12(6):562-72.
- (69) Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006 Jun;29(6):1420-32.

- (70) Amore A, Cirina P, Conti G, Cerutti F, Bagheri N, Emancipator SN, Coppo R. Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jan;19(1):53-60.
- (71) Schleicher E, Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int Suppl*. 2007 Aug;(106):S17-26.
- (72) Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The RAGE axis and endothelial dysfunction: maladaptive roles in the diabetic vasculature and beyond. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Oct;15(7):237-43.
- (73) Yamamoto H, Watanabe T, Yamamoto Y, Yonekura H, Munesue S, Harashima A, Ooe K, Hossain S, Saito H, Murakami N. RAGE in diabetic nephropathy. *Curr Mol Med*. 2007 Dec;7(8):752-7.
- (74) Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract*. 2006 Jan-Feb;12 Suppl 1:60-2.
- (75) Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
- (76) Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):380-92.
- (77) Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Horio T, Yoshikawa J. Aldose reductase inhibitor prevents hyperproliferation and hypertrophy of cultured rat vascular smooth muscle cells induced by high glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 2207–2212.
- (78) Haneda M, Koya D, Kikkawa R. Cellular mechanisms in the development and progression of diabetic nephropathy: activation of the DAG-PKC-ERK pathway. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S178-81.
- (79) Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A, Srivastava SK. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 2005 Mar;54(3):818-29.
- (80) Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*. 2007 Jun;55(6):498-510.
- (81) Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2007 Aug;(106):S49-53.
- (82) Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of

- ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):531-40.
- (83) Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Curr Diabetes Rev.* 2005 Feb;1(1):59-63.
- (84) Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S227-32.
- (85) Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001 Feb 2;88(2):E14-22.
- (86) Chan WH, Wu HJ. Methylglyoxal and high glucose co-treatment induces apoptosis or necrosis in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2008 Mar 1;103(4):1144-57.
- (87) Clarke M, Dodson PM. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Dec;21(4):573-86.
- (88) Frey RS, Gao X, Javaid K, Siddiqui SS, Rahman A, Malik AB. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling through protein kinase C zeta induces NADPH oxidase-mediated oxidant generation and NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006 Jun 9;281(23):16128-38.
- (89) Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, King GL. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes.* 2000 Jul;49(7):1239-48.
- (90) Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2007 Aug 31;101(5):455-64.
- (91) Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2008 Feb 29;102(4):488-96.
- (92) Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002 May 15;287(19):2570-81.
- (93) Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium.* 2004 Mar-Apr;11(2):89-97.
- (94) Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007 Jan;82(1-4):119-27.

- (95) Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4003-8.
- (96) Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):817-26.
- (97) Quijano C, Romero N, Radi R. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radic Biol Med*. 2005 Sep 15;39(6):728-41.
- (98) Lin LY, Lin CY, Ho FM, Liao CS. Up-regulation of the association between heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase prevents high glucose-induced apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2005 Jan 1;94(1):194-201.
- (99) Ding H, Aljofan M, Triggle CR. Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2007 Sep;212(3):682-9.
- (100) Zhang W, Wang R, Han SF, Bu L, Wang SW, Ma H, Jia GL. Alpha-linolenic acid attenuates high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells via PI3K/Akt/eNOS pathway. *Nutrition*. 2007 Oct;23(10):762-70.
- (101) Moens AL, Kass DA. Therapeutic potential of tetrahydrobiopterin for treating vascular and cardiac disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007 Sep;50(3):238-46.
- (102) Hirata K, Kuroda R, Sakoda T, Katayama M, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Yokoyama M. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension*. 1995 Feb;25(2):180-5.
- (103) Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endothelium*. 2005 Jan-Apr;12(1-2):21-39.
- (104) Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia*. 2004 Oct;47(10):1727-34.
- (105) Polytaichou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol*. 2005 Mar 7;510(1-2):31-8.
- (106) Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Teerlink T, Parving HH, Rossing P. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2008 Apr;31(4):747-52.

- (107) Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Fukami K, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2007 Jun;11(2):115-21.
- (108) Yin QF, Xiong Y. Pravastatin restores DDAH activity and endothelium-dependent relaxation of rat aorta after exposure to glycated protein. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 Jun;45(6):525-32.
- (109) Xin HY, Jiang DJ, Jia SJ, Song K, Wang GP, Li YJ, Chen FP. Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):830-8.
- (110) Dayoub H, Rodionov RN, Lynch C, Cooke JP, Arning E, Bottiglieri T, Lentz SR, Faraci FM. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation. *Stroke*. 2008 Jan;39(1):180-4.
- (111) Zou MH. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007 Jan;82(1-4):119-27.
- (112) Nie H, Wu JL, Zhang M, Xu J, Zou MH. Endothelial nitric oxide synthase-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in diabetes in vivo. *Diabetes*. 2006 Nov;55(11):3133-41.
- (113) Fernandes R, Girão H, Pereira P. High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):27219-24.
- (114) Lin D, Harris R, Stutzman R, Zampighi GA, Davidson H, Takemoto DJ. Protein kinase C-gamma activation in the early streptozotocin diabetic rat lens. *Curr Eye Res*. 2007 Jun;32(6):523-32.
- (115) Piconi L, Corgnali M, Da Ros R, Assaloni R, Piliago T, Ceriello A. The protective effect of rosuvastatin in human umbilical endothelial cells exposed to constant or intermittent high glucose. *J Diabetes Complications*. 2008 Jan-Feb;22(1):38-45.
- (116) Ahmed FN, Naqvi FN, Shafiq F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1084:481-9.
- (117) Konukoglu D, Dogan E, Turhan MS, Husrev Hatemi H. Impaired glucose tolerance: its relevance to early endothelial dysfunction. *Horm Metab Res*. 2003 Oct;35(10):607-10.
- (118) Osawa T, Kato Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:440-51.

- (119) Johansen OE, Birkeland KI. Defining the role of repaglinide in the management of type 2 diabetes mellitus: a review. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2007;7(5):319-35.
- (120) Sarafidis PA. Thiazolidinedione derivatives in diabetes and cardiovascular disease: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008 Jun;22(3):247-64.
- (121) Matsumoto M, Tanimoto M, Gohda T, Aoki T, Murakoshi M, Yamada K, Yamazaki T, Kaneko S, Horikoshi S, Tomino Y. Effect of pitavastatin on type 2 diabetes mellitus nephropathy in KK-A(y)/Ta mice. *Metabolism*. 2008 May;57(5):691-7.
- (122) Hays NP, Galassetti PR, Coker RH. Prevention and treatment of type 2 diabetes: Current role of lifestyle, natural product, and pharmacological interventions. *Pharmacol Ther*. 2008 May;118(2):181-91.
- (123) Higashi Y, Jitsuiki D, Chayama K, Yoshizumi M. Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*. 2006 Jan;1(1):85-93.
- (124) Joy SV, Scates AC, Bearely S, Dar M, Taulien CA, Goebel JA, Cooney MJ. Ruboxistaurin, a protein kinase C beta inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Ann Pharmacother*. 2005 Oct;39(10):1693-9.
- (125) Desai K, Wu L. Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: new therapeutic horizons? *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*. 2007 Jun;2(2):89-99.
- (126) Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Jan;65(1):51-9.
- (127) Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2006 Jan;47(1):87-94.
- (128) d'Uscio LV, Milstien S, Richardson D, Smith L, Katusic ZS. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. 2003 Jan 10;92(1):88-95.
- (129) Chung SS, Chung SK. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets*. 2005 Jun;6(4):475-86.
- (130) Battle D, Soler MJ, Wysocki J. New aspects of the renin-angiotensin system: angiotensin-converting enzyme 2 - a potential target for treatment of hypertension and diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008 May;17(3):250-7.
- (131) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial

superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787-90.

(132) Hu G, Lakka TA, Barengo NC, Tuomilehto J. Physical activity, physical fitness, and risk of type 2 diabetes mellitus. *Metab Syndr Relat Disord*. 2005;3(1):35-44.

(133) Schäfer S, Kantartzis K, Machann J, Venter C, Niess A, Schick F, Machicao F, Häring HU, Fritsche A, Stefan N. Lifestyle intervention in individuals with normal versus impaired glucose tolerance. *Eur J Clin Invest*. 2007 Jul;37(7):535-43.

(134) Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemiö K, Hämäläinen H, Härkönen P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Manninen M, Paturi M, Sundvall J, Valle TT, Uusitupa M, Tuomilehto J; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet*. 2006 Nov 11;368(9548):1673-9.

(135) Simşek M, Nazıroğlu M, Erdiñç A. Moderate exercise with a dietary vitamin C and e combination protects against streptozotocin-induced oxidative damage to the kidney and lens in pregnant rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005 Jan;113(1):53-9.

(136) De Moraes R, Gioseffi G, Lopes Ndo N, Gomes MB, Nóbrega AC, Tibiriçá E. Exercise training protects the renal circulation against high glucose challenge. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005 Oct;19(5):537-43.

(137) Schernthaner G. Kidney disease in diabetology: lessons from 2007. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Apr;23(4):1112-5.

(138) Schmieder RE, Schrader J, Zidek W, Tebbe U, Paar WD, Bramlage P, Pittrow D, Böhm M. Low-grade albuminuria and cardiovascular risk : what is the evidence? *Clin Res Cardiol*. 2007 May;96(5):247-57.

(139) O'Connor AS, Schelling JR. Diabetes and the kidney. *Am J Kidney Dis*. 2005 Oct;46(4):766-73.

(140) Segó S. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Nephrol Nurs J*. 2007 Nov-Dec;34(6):631-3.

(141) Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007 Mar;27(2):195-207.

(142) Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol*. 2007;106(2):p26-31.

(143) Herrera-Pombo JL, Aguilar-Diosdado M, Hawkins F, Campos MM, Moreno A, Garcia-Hernandez A, Castro E, García-Doncel LG, Serraclara A, Sánchez-Malo C, Escobar-Jiménez F. Is increasing urinary albumin a better marker for microvascular than for macrovascular complication of type 2 diabetes mellitus? *Nephron Clin Pract*. 2005;101(3):c116-21.

- (144) De Cosmo S, Minenna A, Ludovico O, Mastroianno S, Di Giorgio A, Pirro L, Trischitta V. Increased urinary albumin excretion, insulin resistance, and related cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes: evidence of a sex-specific association. *Diabetes Care*. 2005 Apr;28(4):910-5.
- (145) Dalla Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab*. 2000 Jul;26 Suppl 4:8-14.
- (146) Menini S, Iacobini C, Oddi G, Ricci C, Simonelli P, Fallucca S, Grattarola M, Pugliese F, Pesce C, Pugliese G. Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia*. 2007 Dec;50(12):2591-9.
- (147) Fornoni A, Ijaz A, Tejada T, Lenz O. Role of inflammation in diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev*. 2008 Feb;4(1):10-7.
- (148) Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Mar;19(3):433-42.
- (149) Manea A, Raicu M, Simionescu M. Expression of functionally phagocyte-type NAD(P)H oxidase in pericytes: effect of angiotensin II and high glucose. *Biol Cell*. 2005 Sep;97(9):723-34.
- (150) Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia*. 2008 May;51(5):714-25.
- (151) Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2008 Feb;4(1):39-45.
- (152) Remuzzi G, Macia M, Ruggenti P. Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Apr;17(4 Suppl 2):S90-7.
- (153) Furlong F, Crean J, Thornton L, O'Leary R, Murphy M, Martin F. Dysregulated intracellular signaling impairs CTGF-stimulated responses in human mesangial cells exposed to high extracellular glucose. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jun;292(6):F1691-700.
- (154) Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007 Mar;27(2):130-43.
- (155) Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Nov;18(11):2945-52.
- (156) Diaz-Buxo JA, Woods HF. Protecting the endothelium: a new focus for management of chronic kidney disease. *Hemodial Int*. 2006 Jan;10(1):42-8.

- (157) Lagranha CJ, Fiorino P, Casarini DE, Schaan BD, Irigoyen MC.[Molecular bases of diabetic nephropathy]Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007 Aug;51(6):901-12.
- (158) Marin E, Sessa WC.Role of endothelial-derived nitric oxide in hypertension and renal disease.Curr Opin Nephrol Hypertens. 2007 Mar;16(2):105-10.
- (159) Goligorsky MS, Chen J, Brodsky S.Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide.Hypertension. 2001 Feb;37(2 Part 2):744-8.
- (160) Lee HB, Seo JY, Yu MR, Uh ST, Ha H.Radical approach to diabetic nephropathy.Kidney Int Suppl. 2007 Aug;(106):S67-70.
- (161) Coughlan MT, Mibus AL, Forbes JM. Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. Ann N Y Acad Sci. 2008 Apr;1126:190-3.
- (162) Khamaisi M, Keynan S, Bursztyn M, Dahan R, Reinhartz E, Ovadia H, Raz I.Role of renal nitric oxide synthase in diabetic kidney disease during the chronic phase of diabetes. Nephron Physiol. 2006;102(3-4):p72-80
- (163) Hohenstein B, Hugo CP, Hausknecht B, Boehmer KP, Riess RH, Schmieder RE. Analysis of NO-synthase expression and clinical risk factors in human diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2008 Apr;23(4):1346-54.
- (164) Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS.Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems.Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Dec;293(6):H3227-45.
- (165) Baylis C.Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease.Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Jan;294(1):F1-9.
- (166) Schlaich MP, Oehmer S, Schneider MP, Delles C, Schmidt BM, Schmieder RE. Effects of nitric oxide synthase inhibition and L-arginine on renal haemodynamics in young patients at high cardiovascular risk. Atherosclerosis. 2007 May;192(1):155-60.
- (167) Yamamizu K, Shinozaki K, Ayajiki K, Gemba M, Okamura T.Oral administration of both tetrahydrobiopterin and L-arginine prevents endothelial dysfunction in rats with chronic renal failure.J Cardiovasc Pharmacol. 2007 Mar;49(3):131-9.
- (168) Klahr S, Morrissey J.L-arginine as a therapeutic tool in kidney disease.Semin Nephrol. 2004 Jul;24(4):389-94.
- (169) Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R.Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension.Hypertension. 1992 Sep;20(3):298-303.
- (170) Lima JJG. Rim e Endotélio. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACPO, editores. Endotélio e doenças cardiovasculares. 1ed. SP: Atheneu, 2003. p. 323-328.

- (171) Chuang LY, Guh JY, Wang KA, Huang YJ, Huang JS. Role of nitric oxide in high glucose-induced mitogenic response in renal fibroblasts. *Mol Endocrinol*. 2006 Oct;20(10):2548-58.
- (172) Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M, Yuzawa Y, Atkinson MA, Johnson RJ, Croker B. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):539-50.
- (173) Mohan S, Reddick RL, Musi N, Horn DA, Yan B, Prihoda TJ, Natarajan M, Abboud-Werner SL. *Lab Invest*. Diabetic eNOS knockout mice develop distinct macro- and microvascular complications. 2008 May;88(5):515-28.
- (174) Prabhakar SS. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2004 Jul;24(4):333-44.
- (175) Palm F, Friederich M, Carlsson PO, Hansell P, Teerlink T, Liss P. Reduced nitric oxide in diabetic kidneys due to increased hepatic arginine metabolism: implications for renomedullary oxygen availability. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jan;294(1):F30-7.
- (176) Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. TP receptor-mediated vasoconstriction in microperfused afferent arterioles: roles of O₂(-) and NO. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Aug;279(2):F302-8.
- (177) Zoccali C. The endothelium as a target in renal diseases. *J Nephrol*. 2007 Nov-Dec;20 Suppl 12:S39-44.
- (178) Zhao HJ, Wang S, Cheng H, Zhang MZ, Takahashi T, Fogo AB, Breyer MD, Harris RC. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *J Am Soc Nephrol* 17 : 2664 –2669, 2006
- (179) Quaggin SE, Coffman TM. Toward a mouse model of diabetic nephropathy: is endothelial nitric oxide synthase the missing link? *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):364-6.
- (180) Nakagawa T. Uncoupling of the VEGF-endothelial nitric oxide axis in diabetic nephropathy: an explanation for the paradoxical effects of VEGF in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jun;292(6):F1665-72.
- (181) Kanesaki Y, Suzuki D, Uehara G, Toyoda M, Katoh T, Sakai H, Watanabe T. Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2005 Feb;45(2):288-94.
- (182) Zatz R, Fujihara CK. Mechanisms of progressive renal disease: role of angiotensin II, cyclooxygenase products and nitric oxide. *J Hypertens Suppl*. 2002 Jun;20(3):S37-44.
- (183) Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Sep;18(9):2439-46.

- (184) Delles C, Schneider MP, Oehmer S, Fleischmann I, Fleischmann EF, Schmieder RE. Increased response of renal perfusion to the antioxidant vitamin C in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Oct;19(10):2513-8.
- (185) Ding H, Hashem M, Trigg C. Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *Eur J Pharmacol*. 2007 Apr 30;561(1-3):121-8.
- (186) Raes A, Matthys D, Donckerwolcke R, Craen M, Van Aken S, Vande Walle J. Renal functional changes in relation to hemodynamic parameters during exercise test in normoalbuminuric insulin-dependent children. *Acta Paediatr*. 2007 Apr;96(4):548-51.
- (187) Raes A, Donckerwolcke R, Craen M, Hussein MC, Vande Walle J. Renal hemodynamic changes and renal functional reserve in children with type I diabetes mellitus. *Pediatr Nephrol*. 2007 Nov;22(11):1903-9.
- (188) Nordquist L, Palm F. Diabetes-induced alterations in renal medullary microcirculation and metabolism. *Curr Diabetes Rev*. 2007 Feb;3(1):53-65.
- (189) Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*. 1999 Nov;48(11):1414-7.
- (190) Baccora MH, Cortes P, Hassett C, Taube DW, Yee J. Effects of long-term elevated glucose on collagen formation by mesangial cells. *Kidney Int*. 2007;72(10):1216-25.
- (191) Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998 Nov;44(7):1139-45.
- (192) Himmelfarb J. Oxidative stress in hemodialysis. *Contrib Nephrol*. 2008;161:132-7.
- (193) Cottone S, Lorito MC, Riccobene R, Nardi E, Mulè G, Buscemi S, Geraci C, Guarneri M, Arsenà R, Cerasola G. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure. *J Nephrol*. 2008 Mar-Apr;21(2):175-9.
- (194) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
- (195) Tojo A, Asaba K, Onozato ML. Suppressing renal NADPH oxidase to treat diabetic nephropathy. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(8):1011-8.
- (196) Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, Wilcox CS. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2005 May;67(5):1890-8.

- (197) Xu S, Jiang B, Maitland KA, Bayat H, Gu J, Nadler JL, Corda S, Lavielle G, Verbeuren TJ, Zuccollo A, Cohen RA. The thromboxane receptor antagonist S18886 attenuates renal oxidant stress and proteinuria in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes*. 2006 Jan;55(1):110-9.
- (198) Clarkson MR, Murphy M, Gupta S, Lambe T, Mackenzie HS, Godson C, Martin F, Brady HR. High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):9707-12.
- (199) Merchant ML, Klein JB. Proteomics and diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007 Nov;27(6):627-36.
- (200) Iannello S, Milazzo P, Bordonaro F, Belfiore F. Effect of in vitro glucose and diabetic hyperglycemia on mouse kidney protein synthesis: relevance to diabetic microangiopathy. *MedGenMed*. 2005 Sep 7;7(3):1.
- (201) Cutillas P, Burlingame A, Unwin R. Proteomic strategies and their application in studies of renal function. *News Physiol Sci*. 2004 Jun;19:114-9.
- (202) Janech MG, Raymond JR, Arthur JM. Proteomics in renal research. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Feb;292(2):F501-12.
- (203) Foley RN, Collins AJ. End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Oct;18(10):2644-8.
- (204) Thongboonkerd V. Proteomics. *Forum Nutr*. 2007;60:80-90.
- (205) Thongboonkerd V, Barati MT, McLeish KR, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zheng S, Rovin BH, Pierce WM, Epstein PN, Klein JB. Alterations in the renal elastin-elastase system in type 1 diabetic nephropathy identified by proteomic analysis. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):650-62.
- (206) Thongboonkerd V. Searching for Novel Biomarkers and New Therapeutic Targets of Diabetic Nephropathy Using Proteomics Approaches. *Contrib Nephrol*. 2008;160:37-52.
- (207) Thongboonkerd V. Proteomic analysis of renal diseases: unraveling the pathophysiology and biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2005 Jun;2(3):349-66.
- (208) Bickel CA, Knepper MA, Verbalis JG, Ecelbarger CA. Dysregulation of renal salt and water transport proteins in diabetic Zucker rats. *Kidney Int*. 2002 Jun;61(6):2099-110.
- (209) Kim SW, Hwang HJ, Cho EJ, Oh JY, Baek YM, Choi JW, Yun JW. Time-dependent plasma protein changes in streptozotocin-induced diabetic rats before and after fungal polysaccharide treatments. *J Proteome Res*. 2006 Nov;5(11):2966-76.

- (210) Remold-O'Donnell E, Chin J, Alberts M. Sequence and molecular characterization of human monocyte/neutrophil elastase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 15;89(12):5635-9.
- (211) Sooy K, Kohut J, Christakos S. The role of calbindin and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000 Jul;9(4):341-7.
- (212) Thongboonkerd V, Zheng S, McLeish KR, Epstein PN, Klein JB. Proteomic identification and immunolocalization of increased renal calbindin-D28k expression in OVE26 diabetic mice. *Rev Diabet Stud*. 2005 Spring;2(1):19-26.
- (213) Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res*. 2007 Sep;22(9):1317-28.
- (214) Hwang HJ, Baek YM, Kim SW, Kumar GS, Cho EJ, Oh JY, Yun JW. Differential expression of kidney proteins in streptozotocin-induced diabetic rats in response to hypoglycemic fungal polysaccharides. *J Microbiol Biotechnol*. 2007 Dec;17(12):2005-17.
- (215) Suzuki K, Koh YH, Mizuno H, Hamaoka R, Taniguchi N. Overexpression of aldehyde reductase protects PC12 cells from the cytotoxicity of methylglyoxal or 3-deoxyglucosone. *J Biochem*. 1998 Feb;123(2):353-7.
- (216) Nakagawa T, Segal M, Croker B, Johnson RJ. A breakthrough in diabetic nephropathy: the role of endothelial dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Oct;22(10):2775-7.
- (217) Gomes MB, Affonso FS, Cailleaux S, Almeida AL, Pinto LF, Tibiriçá E. Glucose levels observed in daily clinical practice induce endothelial dysfunction in the rabbit macro- and microcirculation. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004 Jun;18(3):339-46.
- (218) Delles C, Jacobi J, Schlaich MP, John S, Schmieler RE. Assessment of endothelial function of the renal vasculature in human subjects. *Am J Hypertens*. 2002 Jan;15(1 Pt 1):3-9.
- (219) Costa e Forti A, Fonteles MC. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. *Horm Metab Res*. 1998 Jan;30(1):55-7.
- (220) Yousif MH. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ-diabetic rats: role of EDNO and EDHF. *Pharmacol Res*. 2005 Jun;51(6):515-21.
- (221) Yousif MH, Cherian A, Oriowo MA. Endothelium-dependent relaxation in isolated renal arteries of diabetic rabbits. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2002 Apr;22(2):73-82.
- (222) Maack T. Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol*. 1980 Feb;238(2):F71-8.
- (223) Fuchsjäger-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE, Quittan M, Nuhr MJ, Francesconi C, Seit HP, Francesconi M, Schmetterer L, Wolzt M. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002 Oct;25(10):1795-801.

- (224) De Filippis E, Cusi K, Ocampo G, Berria R, Buck S, Consoli A, Mandarino LJ. Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec;91(12):4903-10.
- (225) Maiorana A, O'Driscoll G, Cheetham C, Dembo L, Stanton K, Goodman C, Taylor R, Green D. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Sep;38(3):860-6.
- (226) Delp MD. Differential effects of training on the control of skeletal muscle perfusion. *Med Sci Sports Exerc.* 1998 Mar;30(3):361-74.
- (227) Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:424-32.
- (228) Laughlin MH, Pollock JS, Amann JF, Hollis ML, Woodman CR, Price EM. Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree. *J Appl Physiol.* 2001 Feb;90(2):501-10.
- (229) Jasperse JL, Laughlin MH. Endothelial function and exercise training: evidence from studies using animal models. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Mar;38(3):445-54.
- (230) Bowles DK, Woodman CR, Laughlin MH. Coronary smooth muscle and endothelial adaptations to exercise training. *Exerc Sport Sci Rev.* 2000 Apr;28(2):57-62.
- (231) Spier SA, Delp MD, Stallone JN, Dominguez JM 2nd, Muller-Delp JM. Exercise training enhances flow-induced vasodilation in skeletal muscle resistance arteries of aged rats: role of PGI₂ and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jun;292(6):H3119-27.
- (232) Gleim GW. Renal responses to exercise and training. In: Garrett W, Kirkendall D, editors. *Exercise and Sport Science.* 1ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. p.37-64.
- (233) Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Exercise and the coronary circulation—alterations and adaptations in coronary artery disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2006 Jan-Feb;48(4):270-84.
- (234) Johnson LR, Parker JL, Laughlin MH. Chronic exercise training improves ACh-induced vasorelaxation in pulmonary arteries of pigs. *J Appl Physiol.* 2000 Feb;88(2):443-51.
- (235) Boushel R. Metabolic control of muscle blood flow during exercise in humans. *Can J Appl Physiol.* 2003 Oct;28(5):754-73.
- (236) Yang AL, Tsai SJ, Jiang MJ, Jen CJ, Chen HI. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J Biomed Sci.* 2002 Mar-Apr;9(2):149-55.

- (237) Minami A, Ishimura N, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y, Nakaya Y. Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis*. 2002 May;162(1):85-92.
- (238) Haram PM, Kemi OJ, Wisloff U. Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:336-46.
- (239) McAllister RM, Laughlin MH. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. *Essays Biochem*. 2006;42:119-31.
- (240) Mombouli JV, Nakashima M, Hamra M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization evoked by bradykinin in canine coronary arteries: enhancement by exercise-training. *Br J Pharmacol*. 1996 Feb;117(3):413-418.
- (241) McAllister RM, Newcomer SC, Laughlin MH. Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008 Feb;33(1):173-8.
- (242) McAllister RM, Jasperse JL, Laughlin MH. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005 Feb;98(2):753-61.
- (243) Sun MW, Zhong MF, Gu J, Qian FL, Gu JZ, Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res*. 2008 Apr;31(4):805-16.
- (244) Stewart KJ. Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA*. 2002 Oct 2;288(13):1622-31.
- (245) Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*. 2003 Aug 5;108(5):530-5.
- (246) Albinsson S, Nordström I, Swärd K, Hellstrand P. Differential dependence of stretch and shear stress signaling on caveolin-1 in the vascular wall. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jan;294(1):C271-9.
- (247) Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol*. 2008 Mar;104(3):588-600.
- (248) Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Mar;292(3):H1209-24.
- (249) Busse R, Fleming I. Vascular endothelium and blood flow. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 2):43-78.

- (250) Kadi A, de Isla N, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P. Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells (Effect of rate and time of exposure). *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;37(1-2):131-40.
- (251) Wasserman SM, Topper JN. Adaptation of the endothelium to fluid flow: in vitro analyses of gene expression and in vivo implications. *Vasc Med.* 2004 Feb;9(1):35-45.
- (252) Yee A, Bosworth KA, Conway DE, Eskin SG, McIntire LV. Gene expression of endothelial cells under pulsatile non-reversing vs. steady shear stress; comparison of nitric oxide production. *Ann Biomed Eng.* 2008 Apr;36(4):571-9.
- (253) Jones CI 3rd, Zhu H, Martin SF, Han Z, Li Y, Alevriadou BR. Regulation of antioxidants and phase 2 enzymes by shear-induced reactive oxygen species in endothelial cells. *Ann Biomed Eng.* 2007 May;35(5):683-93.
- (254) Warabi E, Takabe W, Minami T, Inoue K, Itoh K, Yamamoto M, Ishii T, Kodama T, Noguchi N. Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jan 15;42(2):260-9.
- (255) Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 2005 Jan;99(1):293-305.
- (256) Miche E, Herrmann G, Nowak M, Wirtz U, Tietz M, Hürst M, Zoller B, Radzewitz A. Effect of an exercise training program on endothelial dysfunction in diabetic and non-diabetic patients with severe chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2006 Jan;95 Suppl 1:i117-24.
- (257) Kwak BR, Silacci P, Stergiopoulos N, Hayoz D, Meda P. Shear stress and cyclic circumferential stretch, but not pressure, alter connexin43 expression in endothelial cells. *Cell Commun Adhes.* 2005 Jul-Dec;12(5-6):261-70.
- (258) Schrage WG, Woodman CR, Laughlin MH. Hindlimb unweighting alters endothelium-dependent vasodilation and eNOS expression in soleus arterioles. *J Appl Physiol.* 2000 Oct;89(4):1483-90.
- (259) Suvorava T, Lauer N, Kojda G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Sep 15;44(6):1320-7.
- (260) Spier SA, Delp MD, Meininger CJ, Donato AJ, Ramsey MW, Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol.* 2004 May 1;556(Pt 3):947-58.
- (261) Papadopoulos A, Delp MD. Effects of hindlimb unweighting on the mechanical and structure properties of the rat abdominal aorta. *J Appl Physiol.* 2003 Feb;94(2):439-45.

- (262) Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jun 26;49(25):2379-93.
- (263) Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*. 2006 Apr;259(4):351-63.
- (264) Bobillier Chaumont S, Maupoil V, Jacques Lahet J, Berthelot A. Effect of exercise training on metallothionein levels of hypertensive rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 May;33(5):724-8.
- (265) Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*. 2001 Jan-Apr;10(1-2):125-40.
- (266) Armstrong RB, Laughlin MH. Exercise blood flow patterns within and among rat muscles after training. *Am J Physiol*. 1984 Jan;246(1 Pt 2):H59-68.
- (267) DiCarlo SE, Bishop VS. Regional vascular resistance during exercise: role of cardiac afferents and exercise training. *Am J Physiol*. 1990 Mar;258(3 Pt 2):H842-7.
- (268) Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*. 2000 Jul;89(1):21-8.
- (269) Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Mar;33(3):393-6.
- (270) Podhorska-Okolów M, Dziegiel P, Murawska-Ciałowicz E, Krajewska B, Ciesielska U, Jethon Z, Zabel M. Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2004 May;63(2):213-6.
- (271) Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2002 Nov;445(2):273-8.
- (272) Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*. 2001;7:90-107.
- (273) Niess AM, Simon P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. *Front Biosci*. 2007 Sep 1;12:4826-38.
- (274) Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*. 2005;6(1):71-5.

- (278) McAllister RM. Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med Sci Sports Exerc.* 1998 Mar;30(3):375-81.
- (279) McAllister RM, Kimani JK, Webster JL, Parker JL, Laughlin MH. Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. *J Appl Physiol.* 1996 Jan;80(1):216-25.
- (280) De Moraes R, Gioseffi G, Nóbrega AC, Tibiriçá E. Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. *J Appl Physiol.* 2004 Aug;97(2):683-8.
- (281) Chade AR, Bentley MD, Zhu X, Rodriguez-Porcel M, Niemeyer S, Amores-Arriaga B, Napoli C, Ritman EL, Lerman A, Lerman LO. Antioxidant intervention prevents renal neovascularization in hypercholesterolemic pigs. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jul;15(7):1816-25.
- (282) Groenendijk BC, Hierck BP, Vrolijk J, Baiker M, Pourquie MJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE. Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo. *Circ Res.* 2005 Jun 24;96(12):1291-8.
- (283) Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):126-31.
- (284) Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):215-23.
- (285) Maeda S, Miyauchi T, Kobayashi T, Goto K, Matsuda M. Exercise causes tissue-specific enhancement of endothelin-1 mRNA expression in internal organs. *J Appl Physiol.* 1998 Aug;85(2):425-31.
- (286) Miyauchi T, Maeda S, Iemitsu M, Kobayashi T, Kumagai Y, Yamaguchi I, Matsuda M. Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung. *J Appl Physiol.* 2003 Jan;94(1):60-8.
- (287) Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007 Jul 15;75(2):247-60.
- (288) Starkie RL, Hargreaves M, Rolland J, Febbraio MA. Heat stress, cytokines, and the immune response to exercise. *Brain Behav Immun.* 2005 Sep;19(5):404-12.
- (289) Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC. Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Aug;293(2):H1115-21.
- (290) Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A, Palomba L, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO, Nisoli E. TNF-alpha downregulates eNOS

- expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest.* 2006 Oct;116(10):2791-8.
- (291) Woods M, Wood EG, Mitchell JA, Warner TD. Signal transduction pathways involved in cytokine stimulation of endothelin-1 release from human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000 Nov;36(5 Suppl 1):S407-9.
- (292) Marsen TA, Egink G, Suckau G, Baldamus CA. Tyrosine-kinase-dependent regulation of the nitric oxide synthase gene by endothelin-1 in human endothelial cells. *Pflugers Arch.* 1999 Sep;438(4):538-44.
- (293) Clarkson PM. Exertional rhabdomyolysis and acute renal failure in marathon runners. *Sports Med.* 2007;37(4-5):361-3.
- (294) Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Gomulkiewicz A, Kisiela D, Dolinska-Krajewska B, Jethon Z, Carraro U, Zabel M. Exercise-induced apoptosis in rat kidney is mediated by both angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Histol Histopathol.* 2006 May;21(5):459-66.
- (295) Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Saczko J, Kulbacka J, Gomulkiewicz A, Rossini K, Jethon Z, Carraro U, Zabel M. Effects of adaptive exercise on apoptosis in cells of rat renal tubuli. *Eur J Appl Physiol.* 2007 Feb;99(3):217-26.
- (296) Zhan Y, van de Water B, Wang Y, Stevens JL. The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene.* 1999 Nov 11;18(47):6505-12.
- (297) Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishanan N, Franki N, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 May;284(5):F955-65.
- (298) Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2005 Feb 8;111(5):555-62.
- (299) Radak Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J.* 2004 Apr;18(6):749-50.
- (300) Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Dolińska-Krajewska B, Dumańska M, Cegielski M, Jethon Z, Rossini K, Carraro U, Zabel M. Expression of metallothionein in renal tubules of rats exposed to acute and endurance exercise. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(3):195-200.
- (301) Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S, Huxley VH, Patumraj S. Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;32(3):217-26.

- (302) Kingwell BA, Sherrard B, Jennings GL, Dart AM. Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 2):H1070-7.
- (303) Laughlin MH, Schrage WG, McAllister RM, Garverick HA, Jones AW. Interaction of gender and exercise training: vasomotor reactivity of porcine skeletal muscle arteries. *J Appl Physiol.* 2001 Jan;90(1):216-27.
- (304) Yates T, Khunti K, Bull F, Gorely T, Davies MJ. The role of physical activity in the management of impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabetologia.* 2007 Jun;50(6):1116-26.
- (305) Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, Fowler S; Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med.* 2005 Apr 19;142(8):611-9.
- (306) Tanabe T, Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Yokota T, Ohmori H, Matsuda M. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol Scand.* 2003 May;178(1):3-10.
- (307) Hayashi T, Juliet PA, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi A. High glucose downregulates the number of caveolae in monocytes through oxidative stress from NADPH oxidase: implications for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Mar;1772(3):364-72.
- (308) Quagliario L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Szabó C, Ceriello A. Primary role of superoxide anion generation in the cascade of events leading to endothelial dysfunction and damage in high glucose treated HUVEC. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 May;17(4):257-67.
- (309) Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2856-60.
- (310) Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem.* 2002 Oct 15;74(20):5383-92.
- (311) Storey, J.D. and R. Tibshirani, Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(16): p. 9440-5.
- (312) De Moraes R, Valente RH, León IR, Trugilho MR, Nóbrega AC, Perales J, Tibiriçá E. Chronic dynamic exercise increases apolipoprotein A-I expression in rabbit renal cortex as determined by proteomic technology. *Br J Sports Med.* 2008 May;42(5):386-8.
- (313) Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(2):119-29.

- (314) Barter PJ, Puranik R, Rye KA. New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep.* 2007 Nov;9(6):493-8.
- (315) Mineo C, Shaul PW. Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 Jul;17(5):156-61.
- (316) Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Aug;13(6):226-31.
- (317) Barter PJ, Rye KA. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med.* 2006 May;259(5):447-54.
- (318) Walldius G, Jungner I. Apolipoprotein A-I versus HDL cholesterol in the prediction of risk for myocardial infarction and stroke. *Curr Opin Cardiol.* 2007 Jul;22(4):359-67.
- (319) Arthur JM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Cai J, Pierce WM, Klein JB. Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. *Kidney Int.* 2002 Oct;62(4):1314-21.
- (320) Westermeier R & Naven T. *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual of Proteomic Analysis.* 2002 Wiley-VCH, Alemanha.
- (321) Simpson RJ. *Proteins and Proteomics. A Laboratory Manual.* 2003 Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA.
- (322) Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 1996;84:359-369.
- (323) Ferns G, Shams S, Shafi S. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int J Exp Pathol.* 2006 Aug;87(4):253-74.
- (324) Kim DW, Langille BL, Wong MKK, Gotlieb AI. Patterns of endothelial F-actin microfilaments by experimental alterations in shear stress. *Arteriosclerosis.* 1989;9:429-445.
- (325) Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):18947-56.
- (326) Arrigo AP. sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol Biol (Paris).* 2000 Apr;48(3):280-8.
- (327) Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E, Garrido C. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J.* 2006 Jun;20(8):1179-81.

- (328) Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 1997 Feb;110 (Pt 3):357-68.
- (329) Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996;56:273-279.
- (330) Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel JB, Jensen ON, Hernandez-Merida S, Tuñón J, Vivanco F, Egido J. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation.* 2004 Oct 12;110(15):2216-9.
- (331) Kabakov AE, Budagova KR, Bryantsev AL, Latchman DS. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis. *Cell Stress Chaperones.* 2003 Winter;8(4):335-47.
- (332) Loktionova SA, Kabakov AE. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells. *FEBS Lett.* 1998 Aug 21;433(3):294-300.
- (333) Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1 Suppl):S43-50.
- (334) Tsukita S, Yonemura S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Feb;9(1):70-5.
- (335) Frickel EM, Frei P, Bouvier M, Stafford WF, Helenius A, Glockshuber R, Ellgaard L. ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18277-87.
- (336) Zhu L, Hatakeyama J, Poon K, Chen C, Shastri A, Forte JG. Comparative study of ezrin phosphorylation among different tissues: more is good; too much is bad. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 May 14.
- (337) Bach LA, Gallicchio MA, McRobert EA, Tikoo A, Cooper ME. Effects of advanced glycation end products on ezrin-dependent functions in LLC-PK1 proximal tubule cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:609-16.
- (338) Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996 Jan 15;56(2):273-9.

- (339) Richter T, Floetenmeyer M, Ferguson C, Galea J, Goh J, Lindsay MR, Morgan GP, Marsh BJ, Parton RG. High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic*. 2008 Jun;9(6):893-909.
- (340) Nguyen A, Chen P, Cai H. Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. *FEBS Lett*. 2004 Aug 13;572(1-3):307-13.
- (341) Wadhwa R, Taira K, Kaul SC. An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones*. 2002 Jul;7(3):309-16.
- (342) Knowlton A. *Heat Shock Proteins and the Cardiovascular System*. Kluwer Academic Publisher, 1997 --- capitulo 1 p. 1-20: An Overview of the Heat Shock Proteins, Their regulation, and function. AA Knowlton – Massachusetts, USA
- (343) Shan YX, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Sep;35(9):1135-43.
- (344) Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*. 2006 Summer;11(2):116-28.
- (345) Strub A, Lim JH, Pfanner N, Voos W. The mitochondrial protein import motor. *Biol Chem*. 2001;381:943–949.
- (346) Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol*. 2000 Sep;2(9):E163-5.
- (347) Yaguchi T, Aida S, Kaul SC, Wadhwa R. Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1100:306-11.
- (348) Jamin C, Dugué C, Alard JE, Jousse S, Saraux A, Guillevin L, Piette JC, Youinou P. Induction of endothelial cell apoptosis by the binding of anti-endothelial cell antibodies to Hsp60 in vasculitis-associated systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):4028-38.
- (349) van Paassen P, Duijvestijn A, Debrus-Palmans L, Damoiseaux J, Vroomen M, Tervaert JW. Induction of endothelial cell apoptosis by IgG antibodies from SLE patients with nephropathy: a potential role for anti-endothelial cell antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1108:147-56.
- (350) Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*. 2001;51:637–646.

- (351) Atre N, Thomas L, Mistry R, Pathak K, Chiplunkar S. Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of gammadeltaT cells. *Int J Cancer*. 2006 Sep 15;119(6):1368-76.
- (352) Chan JY, Cheng HL, Chou JL, Li FC, Dai KY, Chan SH, Chang AY. Heat shock protein 60 or 70 activates nitric-oxide synthase (NOS) I- and inhibits NOS II-associated signaling and depresses the mitochondrial apoptotic cascade during brain stem death. *J Biol Chem*. 2007 Feb 16;282(7):4585-600.
- (353) Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes*. 2003;52:2338–2345.
- (354) Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes*. 2002;51:1102–1109.
- (355) Oksala NK, Laaksonen DE, Lappalainen J, Khanna S, Nakao C, Hanninen O, Sen CK, Atalay M. Heat shock protein 60 response to exercise in diabetes: effects of alpha-lipoic acid supplementation. *J Diabetes Complications*. 2006;20:257–261.
- (356) Suzuki D, Miyata T. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Intern Med*. 1999 Apr;38(4):309-14.
- (357) Oksala NK, Lappalainen J, Laaksonen DE, Khanna S, Kaarniranta K, Sen CK, Atalay M. Alpha-lipoic Acid modulates heat shock factor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Apr;9(4):497-506.
- (358) Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Puleo E, Calafato S, Cornelius C, Finocchiaro M, Mangiameli A, Di Mauro M, Stella AM, Castellino P. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones*. 2007 Winter;12(4):299-306.
- (359) Davì G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:256–268.
- (360) Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Apr;10(4):822-32.
- (361) Söti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P: Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2005, 146:769-780.
- (362) Harris MB and Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2271–H2280, 2001.

- (363) Noble EG, Moraska A, Mazzeo RS, Roth DA, Olsson MC, Moore RL, and Fleshner M. Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol* 86: 1696–1701, 1999.
- (364) Locke M, Noble EG, and Atkinson BG. Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am. J. Physiol.* 258 (Cell Physiol. 27): C723-C729, 1990.
- (365) Campisi J, Leem TH, Greenwood BN, Hansen MK, Moraska A, Higgins K, Smith TP, Fleshner M. Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Feb;284(2):R520-30.
- (366) Hall DM, Xu L, Drake VJ, Oberley LW, Oberley TD, Moseley PL, Kregel KC. Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J Appl Physiol.* 2000 Aug;89(2):749-59.
- (367) Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, and Sen CK. Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care* 19: 569–574, 1996.
- (368) Arnaud C, Laubriet A, Joyeux M, Godin-Ribuot D, Rochette L, Demenge P, Ribuot C. Role of nitric oxide synthases in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol.* 2001 Apr;132(8):1845-51.
- (369) Harris MB, Blackstone MA, Ju H, Venema VJ, Venema RC. Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jul;285(1):H333-40.
- (370) Pshezhetsky AV. Proteomic analysis of vascular smooth muscle cells treated with ouabain. *Methods Mol Biol.* 2007;357:253-69.
- (371) Hamdi HK, Castellon R. ACE inhibition actively promotes cell survival by altering gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 31;310(4):1227-35.
- (372) Leger JP, Smith FM, and Currie RW. Confocal microscopic localization of constitutive and heat shock-induced proteins HSP70 and HSP27 in the rat heart. *Circulation* 102: 1703-1709, 2000.
- (373) Bijur GN and Jope RS. Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3 beta in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 75: 2401–2408, 2000.
- (374) Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem.* 2000 Jul 7;275(27):20346-54.

- (375) Peshenko IV, Shichi H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 2001 Aug 1;31(3):292-303.
- (376) Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jun 15;38(12):1543-52.
- (377) Oberley TD, Verwiebe E, Zhong W, Kang SW, Rhee SG. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Biol Med.* 2001 Feb 15;30(4):412-24.
- (378) Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon KS, Kim HJ, Kim K, Chae HZ. Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem.* 2001 Aug 10;276(32):29826-32.
- (379) Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem.* 2000 Sep 15;275(37):28421-7.
- (380) Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep.* 2002;7(3):123-30.
- (381) Manevich Y, Sweitzer T, Pak JH, Feinstein SI, Muzykantov V, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11599-604.
- (382) Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, Lerner CP, Paigen B. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):25179-90.
- (383) Pak JH, Manevich Y, Kim HS, Feinstein SI, Fisher AB. An antisense oligonucleotide to 1-cys peroxiredoxin causes lipid peroxidation and apoptosis in lung epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49927-34.
- (384) Wang Y, Feinstein SI, Manevich Y, Ho YS, Fisher AB. Peroxiredoxin 6 gene-targeted mice show increased lung injury with paraquat-induced oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Jan-Feb;8(1-2):229-37.
- (385) Fujii T, Fujii J, Taniguchi N. Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. *Eur J Biochem.* 2001 Jan;268(2):218-25.
- (386) Herrera B, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Beltrán J, Fernández M, Fabregat I. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 2004 Jan 1;36(1):16-26.

- (387) Fatma N, Kubo E, Sharma P, Beier DR, Singh DP. Impaired homeostasis and phenotypic abnormalities in Prdx6^{-/-} mice lens epithelial cells by reactive oxygen species: increased expression and activation of TGFβ. *Cell Death Differ*. 2005 Jul;12(7):734-50.
- (388) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.
- (389) Raman CS, Li H, Martásek P, Král V, Masters BS, Poulos TL. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):939-50.
- (390) Li H, et al. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 1999;274:21276–21284.
- (391) Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Dec;26(12):2688-95.
- (392) Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22546-54.
- (393) Ferrari DM, Söling HD. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J*. 1999 Apr 1;339 (Pt 1):1-10.
- (394) Ou WB, Luo W, Park YD, Zhou HM. Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding. *Protein Sci*. 2001 Nov;10(11):2346-53.
- (395) Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9539-44.
- (396) Stoyanovsky DA, Tyurina YY, Tyurin VA, Anand D, Mandavia DN, Gius D, Ivanova J, Pitt B, Billiar TR, Kagan VE. Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc*. 2005 Nov 16;127(45):15815-23.
- (397) Stamler J, Singel D, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258:1898–1902.
- (398) Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(3):393-9.

- (399) Yang HP, Zhong HN, Zhou HM. Catalysis of the refolding of urea denatured creatine kinase by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Apr 4;1338(2):147-50.
- (400) Lungu AO, Jin ZG, Yamawaki H, Tanimoto T, Wong C, Berk BC. Cyclosporin A inhibits flow-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase by altering cholesterol content in caveolae. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):48794-800.
- (401) Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem*. 1998 Mar 13;273(11):6525-32.
- (402) Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R, Yokoyama S. Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid, and caveolin-1 to cytosol in rat astrocytes. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):7929-35.
- (403) Ishii M, Shimizu S, Shiota K, Yamamoto S, Kiuchi Y, Yamamoto T. Stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis by cyclosporin A in mouse brain microvascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Sep;34(9):1134-41.
- (404) Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*. 1999 Jun;49(2):156-64.
- (405) Zhao T, Singhal SS, Piper JT, Cheng J, Pandya U, Clark-Wronski J, Awasthi S, Awasthi YC. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Jul 15;367(2):216-24.
- (406) Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Jozkowicz A, Huebbe P, Blank R, Wolffram S, Dulak J, Rimbach G. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells. *Food Chem Toxicol*. 2008 Apr 25. [Epub ahead of print]
- (407) Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 May;290(5):H1862-70.
- (408) Yang Y, Yang Y, Trent MB, He N, Lick SD, Zimniak P, Awasthi YC, Boor PJ. Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2004 Apr;173(2):211-21.
- (409) Udovikova EA, Wojtczak L. Mitochondrial aldehyde reductase: identification and characterization in rat liver and kidney cortex. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 May;30(5):597-608.
- (410) O'connor T, Ireland LS, Harrison DJ, Hayes JD. Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal

human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J.* 1999 Oct 15;343 Pt 2:487-504.

(411) Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008 Jun 11;582(13):1783-7.

(412) Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1211-9.

(413) Kouoh F, Gressier B, Luyckx M, Brunet C, Dine T, Cazin M, et al. Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Farmacology* 1999; 54: 695-699.

(414) Turell L, Botti H, Carballal S, Ferrer-Sueta G, Souza JM, Durán R, Freeman BA, Radi R, Alvarez B. Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry.* 2008 Jan 8;47(1):358-67.

(415) Carballal S, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R. Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids.* 2007;32(4):543-51.

(416) Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Nov 1;419(1):25-30.

(417) Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J.* 1999 Feb;13(2):233-44.

(418) Faure P, Wiernsperger N, Polge C, Favier A, Halimi S. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clin Sci (Lond).* 2008 Feb;114(3):251-6.

(419) Imai H, Hayashi T, Negawa T, Nakamura K, Tomida M, Koda K et al. (2002). Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn J Physiol* 52: 135–140.

(420) Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 9;334(4):1322-8.

(421) Sogami M, Era S, Nagaoka S, Kuwata K, Kida K, Shigami J, Miura K et al. (1985). High-performance liquid chromatographic studies on non-mercapt - mercapt conversion of human serum albumin II. *J Chromatogr* 332: 19–27.

(422) Kadota K, Yui Y, Hattori R, Murohara Y, Kawai C (1991). Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ J* 55: 937–941.

(423) Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K et al. (1992). Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 18: 153–158.

- (424) Musante L, Bruschi M, Candiano G, Petretto A, Dimasi N, Del Boccio P, Urbani A, Rialdi G, Ghiggeri GM.Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'.*Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 20;349(2):668-73.
- (425) Makino H, Doi K, Hiuge A, Nagumo A, Okada S, Miyamoto Y, Suzuki M, Yoshimasa Y.Impaired flow-mediated vasodilatation and insulin resistance in type 2 diabetic patients with albuminuria.*Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Jan;79(1):177-82.
- (426) Orié NN, Vallance P, Jones DP, Moore KP.S-nitroso-albumin carries a thiol-labile pool of nitric oxide, which causes venodilation in the rat.*Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug;289(2):H916-23.
- (427) Scharfstein JS, Keaney JF Jr, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS, Loscalzo J.In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols.*J Clin Invest.* 1994 Oct;94(4):1432-9.
- (428) Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J.Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide.*J Clin Invest.* 1999 Feb;103(3):393-9.
- (429) Jacob C, Maret W, Vallee BL.Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):1910-4.
- (430) Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK.From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health.*Antioxid Redox Signal.* 2007 Jul;9(7):775-806.
- (431) Chen G, Wang H, Miller CT, Thomas DG, Gharib TG, Misek DE, Giordano TJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG.Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas.*J Pathol.* 2004 Mar;202(3):321-9.
- (432) Huang KC, Park DC, Ng SK, Lee JY, Ni X, Ng WC, Bandera CA, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC, Ng SW.Selenium binding protein 1 in ovarian cancer.*Int J Cancer.* 2006 May 15;118(10):2433-40.
- (433) Torrealba JR, Colburn M, Golner S, Chang Z, Scheunemann T, Fechner JH, Roenneburg D, Hu H, Alam T, Kim HT, Kanmaz T, Oberley T, Knechtle SJ, Hamawy MM.Selenium-binding protein-1 in smooth muscle cells is downregulated in a rhesus monkey model of chronic allograft nephropathy.*Am J Transplant.* 2005 Jan;5(1):58-67.
- (434) Naithani R.Organoselenium compounds in cancer chemoprevention.*Mini Rev Med Chem.* 2008 Jun;8(7):657-68.
- (435) Zheng HT, Zhou LN, Huang CJ, Hua X, Jian R, Su BH, Fang F.Selenium inhibits high glucose- and high insulin-induced adhesion molecule expression in vascular endothelial cells.*Arch Med Res.* 2008 May;39(4):373-9.

- (436) Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dec;4(4):33-40.
- (437) Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1023-30.
- (438) Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*. 2004 Apr 20;109(15):1813-8.
- (439) Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001 Dec 22-29;358(9299):2113-7.
- (440) Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9573-80.
- (441) Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 2002; 287: 1420–1426.
- (442) Xiong Y, Fu YF, Fu SH, Zhou HH. Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 42: 191–196.
- (443) Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002 Aug 20;106(8):987-92.
- (444) Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, et al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 2287–2295.
- (445) Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997; 48: 489–509.
- (446) Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1455–1459.
- (447) Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992; 339: 572–575.

- (448) Krzyzanowska K, Mittermayer F, Shnawa N, Hofer M, Schnabler J, Etmüller Y, Kapiotis S, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetrical dimethylarginine is related to renal function, chronic inflammation and macroangiopathy in patients with Type 2 diabetes and albuminuria. *Diabet Med.* 2007 Jan;24(1):81-6.
- (449) Liu S, Barac-Nieto M. Renal protein degradation in streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract.* 1997 Jan;34(3):143-8.
- (450) Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2003 Nov;42(5):985-90.
- (451) Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem.* 1989 Jun 15;264(17):10205-9.
- (452) Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int.* 1997 Dec;52(6):1593-601.
- (453) Tojo A, Kimoto M, Wilcox CS. Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin. *Kidney Int.* 2000 Nov;58(5):2075-83.
- (454) Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996 Sep 20;271(38):23317-21.
- (455) Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2001; 104: 2569–2575.
- (456) Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13527-32.
- (457) Jaffery S R, Erdjument-Bromage H, Ferris C D, Temps P, Snyder S H. *Nat Cell Biol.* 2001;3:193–197.
- (458) Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, et al. S-Nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 13527–13532.

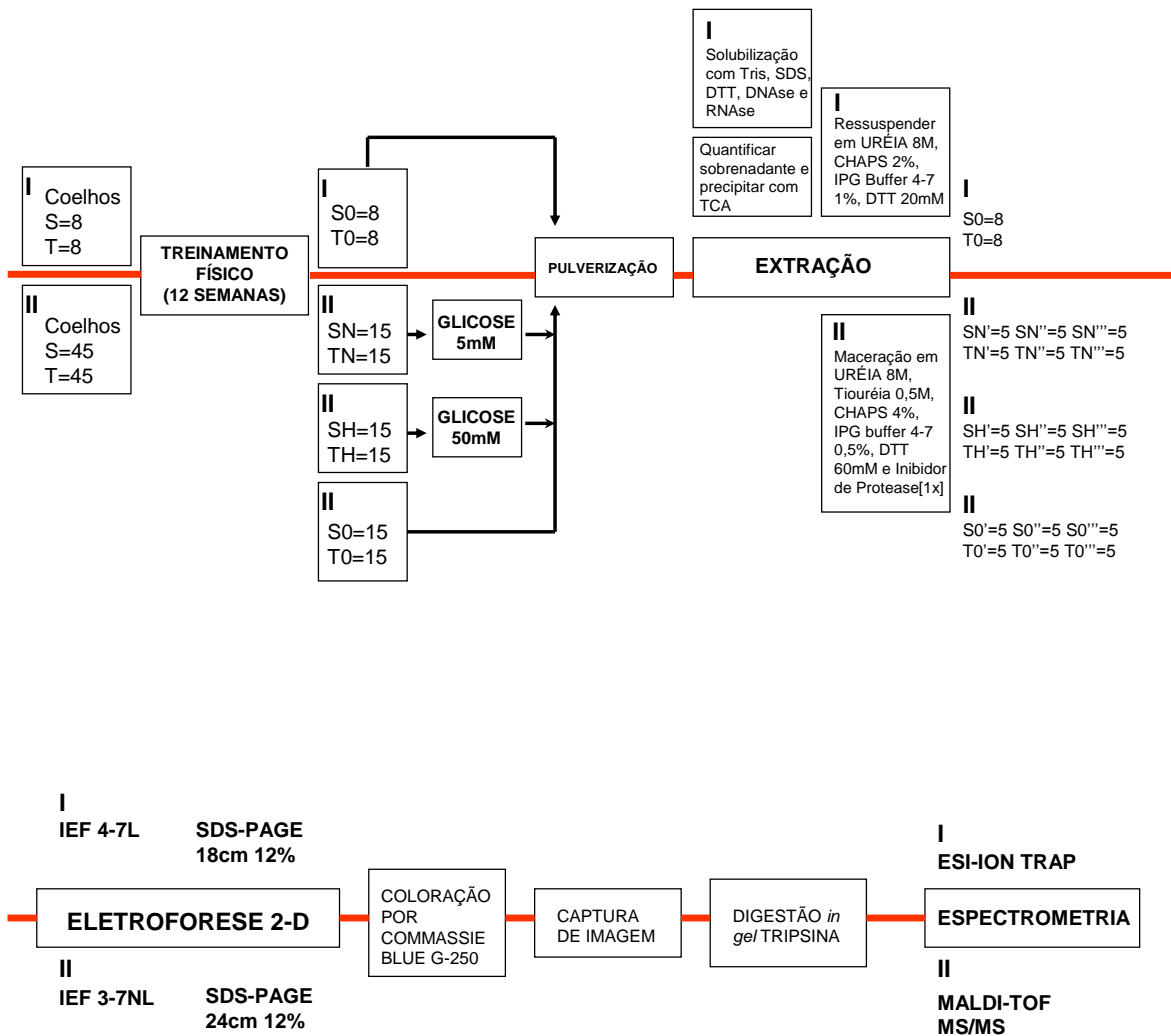
- (459) Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2002; 51: 843–846.
- (460) Gomes MB, Cailleaux S, Tibiriçá E. Effects of metformin on endothelial dysfunction of the renal circulation resulting from acute hyperglycemia in non-diabetic rabbits. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005 Dec;49(6):938-43.
- (461) Xue JH, Takahashi H, Yamaguchi M. Stimulatory effect of regucalcin on mitochondrial ATP-dependent calcium uptake activity in rat kidney cortex. *J Cell Biochem*. 2000 Oct 20;80(2):285-92.
- (462) Fujita T, Inoue H, Kitamura T, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca(2+)-pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 18;250(2):374-80.
- (463) Takahashi H, Murata T, Hanahisa Y, Yamaguchi M. Streptozotocin-induced diabetes increases (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase activity in hepatic plasma membranes of rats: involvement of protein kinase C. *Mol Cell Biochem*. 1998 Jan;178(1-2):311-6.
- (464) Isogai M, Kurota H, Yamaguchi M. Hepatic calcium-binding protein regucalcin concentration is decreased by streptozotocin-diabetic state and ethanol ingestion in rats. *Mol Cell Biochem*. 1997 Mar;168(1-2):67-72.
- (465) Nakagawa T, Yamaguchi M. Overexpression of regucalcin suppresses apoptotic cell death in cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells: change in apoptosis-related gene expression. *J Cell Biochem*. 2005 Dec 15;96(6):1274-85.
- (466) Heneka MT, Löschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wüllner U, Klockgether T. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide. *J Neurochem*. 1998 Jul;71(1):88-94.
- (467) Yamaguchi M. Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function (review). *Int J Mol Med*. 2005 Mar;15(3):371-89.
- (468) Ma ZJ, Yamaguchi M. Regulatory effect of regucalcin on nitric oxide synthase activity in rat kidney cortex cytosol: Role of endogenous regucalcin in transgenic rats. *Int J Mol Med*. 2003 Aug;12(2):201-6.
- (469) Nakagawa T, Yamaguchi M. Overexpression of regucalcin suppresses cell response for tumor necrosis factor- α or transforming growth factor- β 1 in cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells. *J Cell Biochem*. 2007 Apr 1;100(5):1178-90.
- (470) Yamaguchi M. Role of regucalcin in calcium signaling. *Life Sci*. 2000 Mar 31;66(19):1769-80.

- (471) Yumura W, Imasawa T, Suganuma S, Ishigami A, Handa S, Kubo S, Joh K, Maruyama N. Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice. *Histol Histopathol.* 2006 Nov;21(11):1151-6.
- (472) Monteiro G, Horta BB, Pimenta DC, Augusto O, Netto LE. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 20;104(12):4886-91.
- (473) Fukaya Y, Yamaguchi M. Regucalcin increases superoxide dismutase activity in rat liver cytosol. *Biol Pharm Bull.* 2004 Sep;27(9):1444-6.
- (474) Newsholme EA and Leech AR. *Biochemistry for the medical sciences.* John Wiley & Sons, Great Britain, 1995.
- (475) Palm F. Intrarenal oxygen in diabetes and a possible link to diabetic nephropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 Oct;33(10):997-1001.
- (476) Laycock SK, Vogel T, Forfia PR, Tuzman J, Xu X, Ochoa M, Thompson CI, Nasjletti A, Hintze TH. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. *Circ Res.* 1998 Jun 29;82(12):1263-71.
- (477) Granger DL, Lehninger AL. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol.* 1982;95:527-535.
- (478) Borutaite V, Brown GC. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem J.* 1996;315:295-299.
- (479) Ilangovan G, Osinbowale S, Bratasz A, Bonar M, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppusamy P. Heat shock regulates the respiration of cardiac H9c2 cells through upregulation of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Nov;287(5):C1472-81.
- (480) Xie Y-W, Shen WQ, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro: implications for the development of heart failure. *Circ Res.* 1996;79:381-387.
- (481) King CE, Melnyshyn MJ, Mewburn JD, Curtis SE, Winn MJ, Cain SM, Chapler CK. Canine hindlimb blood flow and O₂ uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. *J Appl Physiol.* 1994;76:1166-1171.
- (482) Bernstein RD, Ochoa FY, Xu X, Forfia P, Shen WQ, Thomson CI, Hintze TH. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. *Circ Res.* 1996;79:840-848.
- (483) Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan 15;44(2):224-9.
- (484) Han Z, Chen YR, Jones CI 3rd, Meenakshisundaram G, Zweier JL, Alevriadou BR. Shear-induced reactive nitrogen species inhibit mitochondrial respiratory complex

activities in cultured vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007
Mar;292(3):C1103-12.

8- ANEXOS

Anexo 1: Diagrama resumido da metodologia experimental utilizada nos experimentos 1 e 2.



Anexo 2: Quadros contendo as seqüências dos peptídeos identificados no experimento 2 (Quadros 8.1 e 8.2).

Quadro 8.1- Seqüência de aminoácidos das principais proteínas identificadas

SPOT	PROTEÍNA	SCORE/E-VALUE	GI	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS PEPTÍDEOS
300	HSP27	124/4e-27	149063018	(R)LFDQAFGLPR(L) (R)VSLDVNHFAPEELTVK(T) (R)SPSWDPFR(D) (R)QDEHGYISR(R)
188	vilina	1201/ 0.0	32363162	(K)SQEQLAAELAEYTAK(I) (K)ESEVEEWQHR(A)
311	GRP75	57.9/ 9e-08	1000439	(K)NAVITVPAYFNDSQR(Q)
115	HSP60	1142/ 0.0	11560024	(R)TVIEQSWGSPK(V) (K)LVQDVANNTNEEAGDGTATVLR(S) (R)AAVEEGIVLGGGcALLR(C) (K)ISSVQSIVPALEIANHR(K)
323	PRDX-6	425/1e-117	16758348	(R)DFTPVcTTELGR(A) (K)LSILYPATTGR(N) (K)LFPFIIDDKNR(D)
397	ciclofilina	338/1e-91	126722924	(K)FEDENFLK(H) (K)SIYGEKFEDENFLK(H) (R)VSFELFADK(V)
56	PDI-A3	887/ 0.0	38382858	(K)FVMQEEFSR(D) (K)DLFSEAHSEFLK(A) (K)DLLIAYYDVYK(N) (K)MDATANDVSPYEV(R) (K)VVVAENFDEIVNENK(D)
377	GST	353/4e-96	126722906	(K)SHGQDYLVGNK(L) (R)AIFNYIADKHNLYGK(D) (R)WLLTAAGVEFEK(C) (R)AIFNYIADK(H)
40	ALBUMINA	1239/ 0.0	126723746	(K)AFFGHYLYEVAR(R) (R)RPcFSALGPDETYVPK(E) (K)KVPQVSTPTLVEISR(S) (K)EFNAETFFHADiCTLPETER(K) (K)DDKPDLPFARPEADVLcK(A) (K)VLDEFQPLVDEPK(N) (R)LPcVEDYLSVVLNR(L) (K)EccHGDLLcADDR(A) (K)AILTEccEAADK(G)
43	ALBUMINA	1239/ 0.0	126723746	(K)EFNAETFFHADiCTLPETER(K) (R)RPcFSALGPDETYVPK(E) (K)AFFGHYLYEVAR(R) (K)DDKPDLPFARPEADVLcK(A) (K)KVPQVSTPTLVEISR(S) (K)QncELYQLGDYFNQNALVLR(Y) (K)VLDEFQPLVDEPK(N) (K)EccHGDLLcADDR(A) (K)ccSAEDKEAcFAVEGPK(L) (R)LPcVEDYLSVVLNR(L) (R)HPYFYAPELLYYAQK(Y)

				(K)AILTEccEAADK(G)
50	ALBUMINA	1239/ 0.0	126723746	(K)FLYEYSR(R) (R)RpCFSALGPDETYVVK(E) (K)AFFGHYLYEVAR(R) (K)KVPQVSTPTLVEISR(S) (K)VLDEFQPLVDEPK(N) (K)EFNAETFTFHADlcTLPETER(K) (K)EccHGDLLcADDR(A)
402	AKRA1	618/2e-175	13591894	(R)GLEVTAYSPLGSSDR(A)
83	SBP-1	886/ 0.0	18266692	(K)QFYPLIR(E) (K)SPQYcQVIHR(L)
191	DDAH-1	259/ 2e-67	11560131	(R)QHQLYVGVLSK(L) (K)DYAVSTVPVADALHLK(S) (K)DENATLDGGDVLFTGR(E) (K)LQLNLVEmKDENATLDGGDVLFTGR(E)
213	RGN	77.4/3e-13	126722755	(R)HQGSLYALFPDHQVK(K) (R)YFAGTmAEETAPAVLER(H) (K)DYSEMYVTcAR(D) (K)YFDQVDISNGLDWLDHK(I)
354	SOD-2	37.4/0.36	1174386	(K)AIWNVINWENVTER(Y) (K)HHAAYVNNLNATEEK(Y)

Quadro 8.1. Sequência de aminoácidos das principais proteínas identificadas. Quadro explicativo contendo número do spot, proteína identificada, *score* e *expected value* segundo estabelecido pelo programa Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), número de identificação no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e sequência dos peptídeos identificados por espectrometria de massa.

Quadro 8.2- Sequência de aminoácidos das outras proteínas identificadas

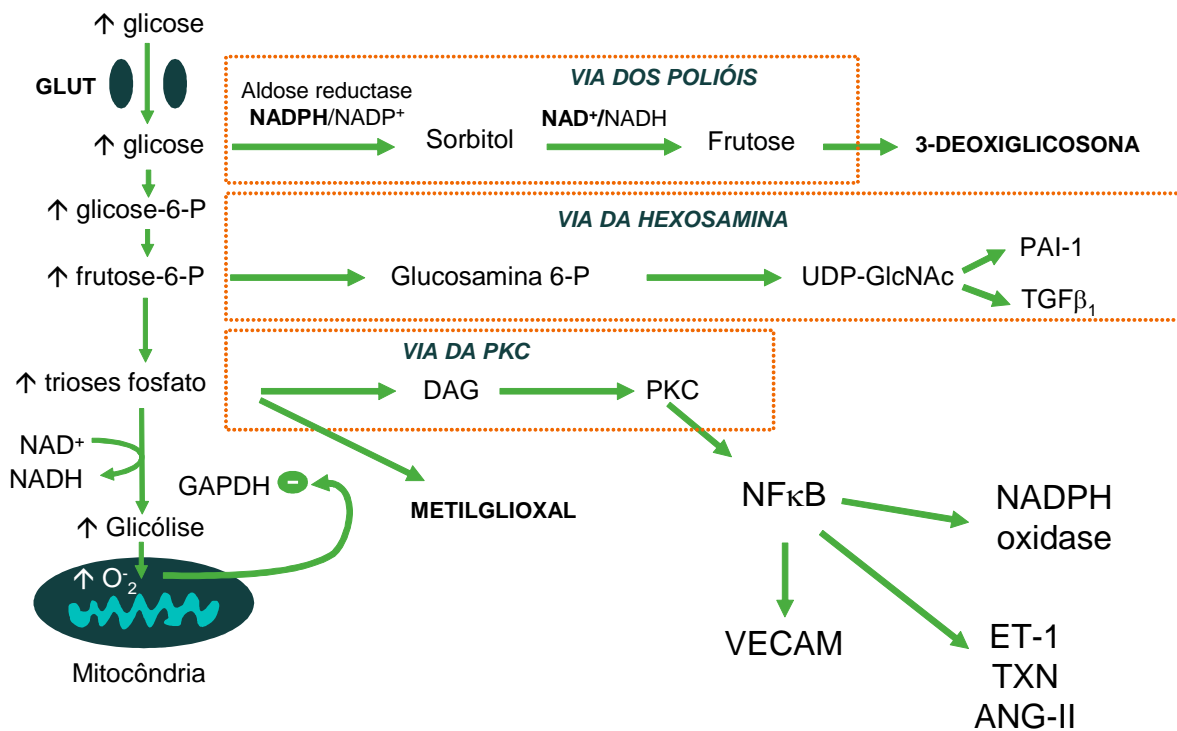
SPOT	PROTEÍNA	GI	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS PEPTÍDEOS
112	UbCitC redutase	57036706	(R)RIPLAEWESR(I) (K)YFYDQcPAVAGLGPIEQLPDYNR(I) (R)NALVSHLDGTTTPvcEDIGR(S) (R)VASEQSSQPTcTVGVWIDVGSR(Y)
373	ATP sintase	15030240	(K)KYPYWPHQPIENL(-) (K)YPYWPHQPIENL(-) (K)AGLVDDFEK(K)
235	FTE	57527204	(K)QFNyTHicAGASAFGK(N) (K)GLLPEELTPLILATQK(Q) (R)TIYAGNALcTVK(C)
275	Enoil-CoA HIDR-Mit	17530977	(K)LFYSTFATDDRK(E) (K)KLFYSTFATDDRK(E) (K)SLAMEMVLTGDR(I)
277	Enoil-CoA HIDR-Mit	17530977	(K)KLFYSTFATDDRK(E)
168	Acil-CoA DSH	113019	(K)IGcFALSEPENGSDAGAASTTAR(A) (R)ITEIYEGTSEIQR(L)

248	IDH-1	148667808	(R)SDYLNTFEFmDK(L) (R)FKDIFQEIYDK(Q) (K)GQETSTNPIASIFAWTR(G) (K)SIEDFAHSSFQmALSK(G) (R)HAYGDQYR(A)
252	Enoil-CoA HIDR-Per	109124614	(R)YcAQDAFFQVK(E) (R)VIGNQSLVNELAFTAR(K)
253	Enoil-CoA HIDR-Per	109124614	(R)VIGNQSLVNELAFTAR(K) (K)EVDIGLAADVGLTQR(L)
305	TIM	136066	(K)VPADTEVvcAPPTAYIDFAR(Q) (K)DcGATWVVLGHSER(R) (R)HVFGESEDELIGQK(V) (K)IAVAAQNcYK(V) (K)VAHALSEGLGVIAcIGEK(L) (R)IYGGSVTGATcK(E) (K)NLGELITTLNAAK(V)
102	Enolase	109468300	(R)AAVPSGASTGIYEALRL(D) (R)YITPDQLADLYK(S) (K)VNQIGSVTESLQAcK(L) (K)FTASAGIQVVGDDLTVTNPK(R) (R)DYPVVSIEDPFDQDDWEAWQK(F)
302	Fructose 1,6BPase	3915684	(K)AGIAHLYGIAGSTNVTDQVK(K) (K)DFDPAVTEYIQK(K) (K)SSFATcVLVSEEDKNaiIIVEPEKR(G)
219	G3PDSH	3043365	(K)NIVAVGAGFcDGLGFGDNTK(A)
215	Malato DSH-1	15100179	(K)GEFITTVQQR(G) (K)FVEGLPINDFSR(E)
149	ACY-1	74354764	(K)DmNLTLEPEIFPAATDSR(Y) (R)LHEAVFLR(G) (K)cVSIQYLEAVR(R) (K)DMNLTLEPEIFPAATDSR(Y)
150	ACY-1	74354764	(R)LHEAVFLR(G) (K)cVSIQYLEAVR(R) (K)DmNLTLEPEIFPAATDSR(Y) (K)DMNLTLEPEIFPAATDSR(Y)
135	beta-actina	387083	(K)SYELPDGQVITIGNER(F) (R)GYSFTTTAER(E)
139	beta-actina	387083	(K)DLYANTVLSGGTTMYPGIADR(M) (R)AVFPSIVGR(S) (R)VAPEEHPVLLTEAPLNPK(A) (R)GYSFTTTAER(E) (K)SYELPDGQVITIGNER(F) (K)IWHHTFYNELR(V)
158	beta-actina	387083	(R)AVFPSIVGR(S) (K)SYELPDGQVITIGNER(F) (K)IWHHTFYNELR(V)
243	tropomiosina	73986126	(R)IQLVEEELDR(A)
250	PDZ domain cont	126723666	(K)SGNAVTLVLVDGNSYEK(A) (K)EEGQNYGFFLR(I)

268	Cristalin Lambda	126723698	(R)LQYAISEAWR(L) (K)EIDGFVLNR(L) (K)IFAQLDSIVDDR(V) (K)LFTGLAHVK(Q) (K)LYDIEPR(Q) (R)KIFAQLDSIVDDR(V)
130	GLN sintase	121376	(R)LTGFHETSNINDFSAGVANR(G) (R)TcLLNETGDEPFQYKN(-)
236	NEaSPECTRIN	203014	(K)KHEAFETDFTVHK(D) (K)ADVVESWIGEK(E)
281	nitrilase	77628000	(R)AVDNQVYVATASPAR(D) (K)TLSPGDSFSTFDTPYcR(V) (K)AGTEETILYSIDLK(L) (R)KIHLFDIDVPGK(I) (K)IHLFDIDVPGK(I)
400	N-myc RG	109471189	(K)EEmQNNVEVVHTYR(Q) (K)EEMQNNVEVVHTYR(Q)
361	Aldeído DSH	6164678	(K)LNEHFLNTTDFLDTIK(S) (K)SSGGFWAcK(N) (R)GKLDGNQDLIR(F) (R)FKDIFQEIFDK(H)
75	udp-glicose DSH	149035357	(R)VLIGGETPEGQR(A) (K)LAANAFLAQR(I) (K)NLFFSTNIDDAIR(E)
247	3-HBTDSH	23308751	(K)SPILLGSLAHQIYR(M) (K)HGYPLIYDVFPDcK(E) (K)mGAVFMDAPVSGGVGAAR(S)
223	carboxilesterase hepática	130491007	(K)EGYLQIGATTQAAQK(L) (K)YWANFAR(N)
234	carbonil redutase	1352257	(R)FHQLDITDLQSIR(A) (K)GVHQTEGWPDATAYGVTK(M) (K)ILLNcAccPGWVR(T) (R)LFSGDVVLTAR(D)

Quadro 8.2. Sequência de aminoácidos das outras proteínas identificadas. Quadro explicativo contendo número do spot, proteína identificada, número de identificação no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e sequência dos peptídeos identificados por espectrometria de massa.

Anexo 3: Representação esquemática dos principais mecanismos celulares de síntese de espécies reativas de oxigênio na presença de excesso de glicose descritos entre as páginas 6-8 da introdução.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)