

UNIVERSIDADE PAULISTA

CAREN INGRID SILVA MACEDO

**AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM
AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA REGULAÇÃO
EPIGENÉTICA DA OSTEOCALCINA E DO RECEPTOR *GPRC6A***

**SÃO PAULO
2024**

CAREN INGRID SILVA MACEDO

**AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM
AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA REGULAÇÃO
EPIGENÉTICA DA OSTEOCALCINA E DO RECEPTOR *GPRC6A***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

**SÃO PAULO
2024**

CAREN INGRID SILVA MACEDO

**AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM
AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA REGULAÇÃO
EPIGENÉTICA DA OSTEOCALCINA E DO RECEPTOR *GPRC6A***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

_____/_____/_____
Prof^a. Dr^a. Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Prof^a. Dr^a. Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito
Centro Universitário São Camilo

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus que em tudo me conhece e, no tempo certo, me presenteou com a realização desse sonho.

Ao meu marido Anderson, companheiro de quase duas décadas, sempre me apoiando e me dando todo o suporte e compreensão. Obrigada por acreditar em mim, mesmo nos meus momentos de fraqueza.

Ao meu bebê arco-íris, nas poucas semanas em que pude tê-lo comigo você me transformou profundamente, as batidas do seu coração soaram sempre no meu ser.

Aos meus pais, Maria e Milton, que me permitiram viver e gozar das maravilhas desse mundo. Lutaram para criar a mim e meu irmão, fazendo tudo o que estava ao alcance para nos formar pessoas de bem.

À minha sogra Selvina e ao meu sogro Antonio, por me darem o meu maior presente, meu marido. Agradeço a vocês por todo o apoio, sempre ajudando e cuidando de nós.

À Universidade Paulista pela confiança em me aceitar como aluna.

À Bolsa CAPES/Prosup, sem a qual não teria sido possível minha permanência como aluna.

À Prof^a. Dr^a. Anuska Marcelino Alvares Saraiva, sempre compreensiva e otimista, um exemplo de profissional e mulher a ser seguida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva, pela confiança depositada em mim para dar continuidade ao tema, resultando no presente estudo. Obrigada pela confiança e apoio.

Aos docentes, Prof^a. Dr^a. Maria Anete Lallo, Prof^a. Dr^a. Elizabeth Cristina Perez Hurtado e Prof. Dr. José Guilherme Xavier por me ajudarem com os experimentos e avaliações. Obrigada pela paciência e sempre estarem disponíveis quando precisei.

Aos nossos parceiros, Universidade Federal de São Paulo na pessoa do Prof. Dr. Danilo Candido de Almeida e Universidade Federal de Santa Catarina na pessoa da Profa e Dra Alexandra. Susana Latini que possibilitaram a realização desse trabalho, contribuindo com amostras e sugestões.

Aos colaboradores do laboratório: Cleide, Leonado, Paulo, Susana, Wilton, colaboradores da segurança e higiene. Obrigada pela paciência e o

ambiente sempre amigável e acolhedor.

Aos colegas do grupo de pesquisa e companheiros da pós -
graduação: Ana Paula Soares da Silva, Ana Luiza Gonçalves Valgas,
Bárbara de Mello Ponteciano, Caio Omori Del Debbio Pinheiro, Cleiton
França Batista, Diego Ferreira da Silva, Gabriela Botelho Ramos, Mariana
Risardi Pereira, Thais Alves Bueno por tornaram os meus dias mais leves
nessa jornada.

**“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um
oceano.”
Isaac Newton**

AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DA OSTEOCALCINA E DO RECEPTOR *GPRC6A*

Autor: Caren Ingrid Silva Macedo

Resumo

Introdução: Fatores genéticos e epigenéticos podem predispor a população ao diabetes, doença com potencial para várias complicações como a nefropatia diabética (ND). Um ponto em comum entre o diabetes e a ND são as possíveis complicações na biologia óssea. Estudos recentes têm abordado a função endócrina do osso e, mais especificamente, as condições que a hiperglicemia podem causar desequilíbrio na expressão de hormônios sintetizados pelo osso. Neste sentido, destacamos a osteocalcina (OCN), uma proteína codificada pelo gene *Bglap*, e seu receptor expresso no rim *Gprc6a* (receptor acoplado à proteína G da família C grupo 6 membro A). O papel da epigenética na quebra de homeostase entre o eixo osso-rim, decorrente da hiperglicemia, permanece ainda desconhecido. **Objetivo:** Investigar o controle transcricional epigenético da OCN e do receptor *Gprc6a* no rim de ratos submetidos à hiperglicemia crônica, além de avaliar o metabolismo energético renal. **Metodologia:** Ratos Wistar foram submetidos à hiperglicemia crônica, por meio da administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Foram avaliadas as variações da glicemia e peso ao longo de 60 dias e, ao final do estudo, foram coletados os órgãos para avaliação morfológica do pâncreas e rim e do metabolismo renal. Amostras de rins, fêmures e mandíbulas foram preparadas para avaliação da expressão gênica da OCN e *Gprc6a* no tecido renal e ósseo; expressão das *Dnmt's* e *Tet's* no rim; e as porcentagens das marcas responsáveis pela metilação específica, relacionado aos genes responsáveis pela expressão da OCN e do receptor *Gprc6a* no rim. **Resultados:** o grupo STZ apresentou diminuição de peso e permaneceu em estado hiperglicêmico durante todo o período experimental. Na avaliação histológica, o pâncreas apresentou diminuição na área e perímetro das ilhotas pancreáticas, no rim foram observadas alterações semelhantes às encontradas na ND, com presença de espessamento na membrana basal glomerular e tubular, comparados ao controle. A atividade máxima das enzimas associadas ao metabolismo não foi

diferente estatisticamente entre os grupos observados, porém há uma tendência no aumento da atividade de Cpt1 e diminuição de hexoquinase e fosfofrutoquinase, mas não de G6PDH. No grupo controle, na comparação entre o rim, mandíbula e fêmur os resultados mostram maior expressão de *Bglap* no tecido ósseo e maior expressão do gene codificador de *Gprc6a* no rim. No grupo STZ foi observado nos rins diminuição na expressão de *Bglap*, aumento na expressão de *Gprc6a*, aumento na expressão das *Dnmt1* e *Dnmt3a*, diminuição na expressão da *Dnmt3b* e aumento na expressão das *Tet1*, *Tet2* e *Tet3*. Na razão entre 5-meC/5-hmeC foi identificado porcentagem significativa de 5-meC na região codificante de *Gprc6a*. **Conclusão:** a hiperglicemia crônica alterou a comunicação entre o eixo osso-rim por meio da modificação na expressão da OCN e *Gprc6a* e alterações nas vias de ácidos graxos e glicólise. No entanto, apesar da modulação epigenética, não foi possível correlacionar a metilação específica com o estado transcricional. Os resultados demonstrados aqui poderão auxiliar na compreensão de estudos futuros e subsidiar a exploração das funções do eixo osso-rim.

Palavras chaves: Diabetes, Rim, Osteocalcina

EVALUATION OF HOMEOSTASIS BETWEEN THE BONE-KIDNEY AXIS IN A HYPERGLYCEMIC ENVIRONMENT THROUGH EPIGENETIC REGULATION OF OSTEOCALCIN AND THE *GPRC6A* RECEPTOR

Author: Caren Ingrid Silva Macedo

Abstract

Introduction: Genetic and epigenetic factors may predispose the population to diabetes, a disease with the potential for several complications, such as diabetic nephropathy (DN). One thing diabetes and DN have in common is the potential complications in bone biology. Recent studies have addressed the endocrine function of bone and, more specifically, the conditions in which hyperglycemia can cause an imbalance in the expression of hormones synthesized by bone. In this sense, we highlight osteocalcin (OCN), a protein encoded by the *Bglap gene*, and its receptor expressed in the kidney *Gprc6a* (G protein-coupled receptor family C group 6 member A). The role of epigenetics in the disruption of homeostasis between the bone-kidney axis, resulting from hyperglycemia, remains unknown. **Objective:** To investigate the epigenetic transcriptional control of OCN and the *Gprc6a receptor* in the kidney of rats subjected to chronic hyperglycemia, in addition to evaluating renal energy metabolism. **Methodology:** Wistar rats were subjected to chronic hyperglycemia through intraperitoneal administration of streptozotocin (STZ). Variations in blood glucose and weight were evaluated over 60 days and, at the end of the study, organs were collected for morphological evaluation of the pancreas and kidney and renal metabolism. Samples of kidneys, femurs and mandibles were prepared to evaluate the gene expression of OCN and *Gprc6a* in the renal and bone tissue; expression of *Dnmt's* and *Tet's* in the kidney; and the percentages of the markers responsible for specific methylation, related to the genes responsible for the expression of OCN and the *Gprc6a receptor* in the kidney. **Results:** the STZ group showed weight loss and remained in a hyperglycemic state throughout the experimental period. In the histological evaluation, the pancreas showed a decrease in the area and perimeter of the pancreatic islets; in the kidney, changes similar to those found in DN were observed, with the presence of thickening in the glomerular and tubular basement membrane, compared to the control. The maximum activity of the enzymes associated with metabolism was not statistically different between the observed groups, but there was a tendency towards an increase in the activity of Cpt1 and a decrease in hexokinase and phosphofructokinase, but not in G6PDH. In

the control group, when comparing the kidney, mandible and femur, the results showed a higher expression of *Bglap* in the bone tissue and a higher expression of the gene encoding *Gprc6a* in the kidney. In the STZ group, a decrease in the expression of *Bglap* , an increase in the expression of *Gprc6a* , an increase in the expression of *Dnmt1* and *Dnmt3a* , a decrease in the expression of *Dnmt3b* and an increase in the expression of *Tet1* , *Tet2* and *Tet3* were observed in the kidneys . In the 5-meC/5-hmeC ratio, a significant percentage of 5-meC was identified in the *Gprc6a* coding region. **Conclusion:** chronic hyperglycemia altered the communication between the bone-kidney axis through modification in the expression of OCN and *Gprc6a* and alterations in the fatty acid and glycolysis pathways. However, despite the epigenetic modulation, it was not possible to correlate specific methylation with the transcriptional state. The results demonstrated here may help in the understanding of future studies and subsidize the exploration of the functions of the bone-kidney axis.

Keywords: Diabetes, Kidney, Osteocalcin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aumento na incidência de diabetes.....	19
Figura 2 - Desenho Experimental.....	29
Figura 3 - Acompanhamento do peso e da glicemia de ratos submetidos ao diabetes.....	37
Figura 4 - Efeitos da hiperglicemia sobre a morfologia do pâncreas.....	38
Figura 5 - Efeitos da hiperglicemia sobre a morfologia renal.....	39
Figura 6 - Efeitos da hiperglicemia sobre a atividade máxima das enzimas da via lipolítica, glicolítica e ciclo do ácido tricarboxílico no rim.....	40
Figura 7 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica da osteocalcina e seu receptor <i>Gpcr6a</i> no tecido ósseo e no rim.....	41
Figura 8 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica da osteocalcina e do receptor <i>Gpcr6a</i> no rim.....	42
Figura 9 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica das <i>Dnmt's</i> no rim.....	43
Figura 10 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica das <i>Tet's</i> no rim.....	44
Figura 11 - Efeitos da hiperglicemia sobre a epigenética na região promotora dos genes responsáveis pela expressão da osteocalcina no rim.....	45
Figura 12 - Efeitos da hiperglicemia sobre a epigenética na região promotora dos genes responsáveis pela expressão do receptor <i>Gpcr6a</i> no rim.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-hmeC** - 5-hidroximetilcitosina
- 5-meC** - 5- metilcitosina
- AGEs** - Produtos Finais de Glicação Avançada
- BGLAP** - Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein
- cOCN** - Osteocalcina Carboxilada
- CpG** - Citosina-Fosfato-Guanina
- CpGI** - Ilhas CpG
- DEPC** - água ultra pura
- DM** - Diabetes Mellitus
- DM1** - Diabetes Mellitus tipo 1
- DM2** - Diabetes Mellitus tipo 2
- DMG** - Diabetes Mellitus Gestacional
- DNMT's** - DNA Metil Transferases
- DNMT1** - DNA Metil Transferases 1
- DNMT3A** - DNA metiltransferases 3A
- DNMT3B** - DNA Metil Transferases 3B
- DRC-DMO** - Doença Renal Crônica – Distúrbio mineral ósseo
- Fig** – figura
- GAPDH** – *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*
- gDNA** – DNA genômico
- Gprc6a** - Receptor Acoplado à Proteína G da Família C Grupo 6 Membro A
- HbA1** - Hemoglobina Glicada
- HCL** - Ácido Clorídrico
- HE** - Hematoxilina/Eosina
- HpaII** - Endonuclease HpaII
- KO** - Knockout
- MspI** - Endonuclease MspI
- ND** - Nefropatia Diabética
- OCN** - Osteocalcina
- OST-PTP** - Proteína Tirosina Fosfatase
- PAS** - Ácido Periódico de Schiff
- PCR** - Polymerase Chain Reaction

PH - Potencial Hidrogeniônico

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SGLTs - Cotransportadores Sódio-Glicose

STZ - Estreptozotocina

T4-BGT - T4-β-glicosiltransferase

TET'S - Ten-Eleven-Translocation

TET1 - Proteínas De Translocação 1

TET2 - Proteínas De Translocação 2

TET3 - Proteínas De Translocação 3

TFG - Taxa de Filtração Glomerular

ucOCN - Osteocalcina Subcarboxilada

UDP – GLc - difosfogluose de uridina

LISTA DE SÍMBOLOS

CH₃ - Metil

β - beta

°C - grau Celsius

H₂O - água

p - Significância estatística

μm - Micrometro

μL – Microlitro

> - Maior

< - Menor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Tipo de estudo.....	27
3.2 Animais.....	28
3.3 Aspectos éticos.....	28
3.4 Modelo animal experimental com insução à hiperglicemia crônica.....	29
3.5 Histomorfometria.....	29
3.6 Morfometria.....	30
3.7 Atividade Enzimática.....	30
3.7.1 Hexoquinase.....	30
3.7.2 Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	30
3.7.3 6 Fosfofrutoquinase.....	31
3.7.4 Piruvato quinase.....	31
3.7.5 Citrato sintase.....	31
3.7.6 Carnitina palmitoiltransferase.....	31
3.7.7 Determinação da concentração de proteínas.....	31
3.7.8 Cálculo e expressão dos resultados.....	32
3.8 Extração de RNA.....	32
3.9 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	32
3.10 Determinação da expressão gênica.....	33
3.11 Extração DNA.....	34
3.12 Tratamento enzimático do DNA.....	35
3.13 Análise de qPCR para determinação de metilação gene específica.....	35
3.14 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	36
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONSIDERAÇÕES.....	56
7. CONCLUSÃO.....	56

REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *Mellitus* (DM) continua sendo uma doença desafiadora na atualidade. Mesmo com os avanços das tecnologias em saúde e maior acesso às informações sobre prevenção e tratamento, cursa com aumento na sua incidência. Esse cenário, por consequência, contribui para o aumento das complicações secundárias ao DM, trazendo impactos negativos à qualidade de vida e elevando a morbidade da população mundial (1).

O DM pode ser causado tanto pela resistência à insulina nos tecidos como pela insuficiência, ou até mesmo ausência, na secreção da insulina pelas células β pancreáticas (2). Conforme a Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o DM pode ser dividido em quatro diferentes etiologias, compreendendo o diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2), diabetes gestacional (DMG) e outras etiologias. O diagnóstico é realizado por meio da verificação de glicemia em jejum, considerada normal abaixo de 100mg/dl; teste de tolerância à glicose, normal abaixo de 140mg/dl após 2 horas do teste; e verificação da hemoglobina glicada (HbA1c), normal abaixo de 5,7% (3).

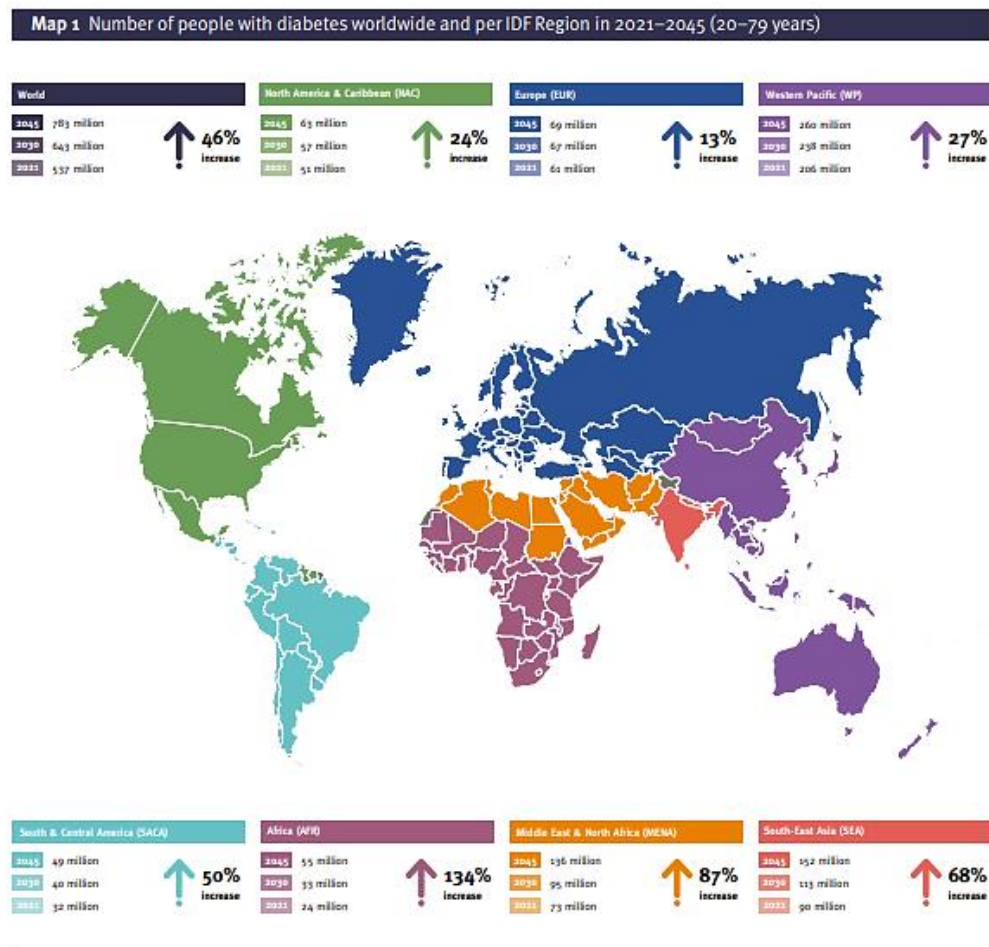
O DM2 é o mais prevalente e está associado ao envelhecimento e à obesidade, com início insidioso, caracteriza-se pela resistência à insulina e deficiência parcial na secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Frequentemente, indivíduos com DM2 apresentam hipertrigliceridemia e acantose nigricans. O DM1 é mais prevalente em crianças e adolescentes, sendo caracterizado por uma deficiência grave de insulina decorrente da destruição das células β pancreáticas pelo próprio organismo. Trata-se de uma doença autoimune de início abrupto e com maior risco para quadros de cetose e cetoacidose. Desde o início do diagnóstico, há a necessidade de insulino-terapia (4).

Outro tipo comum de diabetes é o DMG, apresentando-se como uma intolerância aos carboidratos que se inicia na gestação, diferente dos outros tipos de diabetes possui critérios próprios para seu diagnóstico. A incidência de DMG varia de 3% a 25% dependendo do grupo étnico e de outros fatores de risco, como idade avançada na maternidade, histórico familiar, sobrepeso e obesidade (5). O diabetes com classificação em outras etiologias engloba várias condições patológicas, como infecções, síndromes genéticas, uso de medicamentos entre outras causas (4).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, o número de indivíduos

com DM poderá atingir 700 milhões de pessoas em 2045, dos quais a América do Sul possui uma estimativa de aumento em 50% (**Fig.1**). Atualmente, 62 milhões de pessoas possuem o diagnóstico de DM nos países das Américas, entretanto, esse número é subestimado, pois estima-se que cerca de 40% dos indivíduos com DM desconhecem o diagnóstico, as projeções indicam que até 2040 esse número será de 109 milhões. O aumento na incidência está associado ao aumento dos fatores de risco como sobrepeso, obesidade, sedentarismo e uma alimentação rica em carboidratos. Esses fatores levaram a triplicar o número de indivíduos com DM nos últimos 30 anos, conforme a Organização Pan-Americana da Saúde (6).

Figura 1 – Aumento na incidência de diabetes



Fonte: Federação Internacional do Diabetes

As complicações relacionadas ao DM são numerosas, e os indivíduos diagnosticados apresentam um aumento no risco para outras doenças, entre elas doenças vasculares, cânceres, doenças infecciosas, distúrbios degenerativos e doenças psiquiátricas (1). Essas complicações resultam em uma diminuição da

expectativa e qualidade de vida, exigindo, por parte do indivíduo diagnosticado, mudanças nos hábitos de vida e uma nova rotina que envolve o uso de medicamentos, além das consultas com especialistas e exames para controle da doença e suas complicações (7).

Dentre as complicações vasculares, o diabetes pode levar à nefropatia diabética (ND), que, em estágios finais, resulta em uma condição irreversível tendo como consequência a doença renal terminal (8) (9). A ND é uma das complicações mais graves que pacientes com DM podem desenvolver, estando associada ao aumento da mortalidade e morbidade. Proporcionalmente, com o aumento de indivíduos diagnosticados com DM, a ND tem apresentado um aumento na sua incidência nos últimos anos, principalmente em países desenvolvidos (10,11).

Antes mesmo da ND, o rim é um dos órgãos que atuam ativamente na homeostase da glicose no organismo e, quando submetido a um ambiente hiperglicêmico sua ação é alterada. Há dois mecanismos envolvidos na regulação da glicose no organismo pelo rim: a gliconeogênese e a reabsorção da glicose a partir da filtração glomerular (12).

O mecanismo de reabsorção da glicose a partir do filtrado glomerular é a principal forma da atuação renal na contribuição para a homeostase da glicose no organismo, esse processo ocorre por meio dos cotransportadores sódio-glicose (SGLTs) nos túbulos contorcidos proximais. A glicose reabsorvida pelos SGLTs nos é liberada na circulação por meio dos transportadores facilitadores de glicose (GLUTs) (13). Em paciente com DM, há um aumento na absorção de glicose no filtrado glomerular, no entanto, após atingir o pico máximo de filtração ocorre a excreção de glicose na urina, conhecida como glicosúria. Estudos apontam também um aumento na expressão das SGLTs nos túbulos proximais em pacientes com DM (14,15).

A gliconeogênese no rim ocorre por meio do uso de precursores glicogênicos, sendo utilizados principalmente o lactato e a glutamina nesse processo. No período absorptivo, após o consumo dos estoques de glicogênio no fígado, o principal processo para obtenção de energia é por meio da gliconeogênese, na qual o rim contribui com até 25%. No período pós prandial, a gliconeogênese no rim aumenta duas vezes, por outro lado, tanto a gliconeogênese quanto a glicogenólise no fígado estão diminuídas. Esse mecanismo ocorre devido à necessidade da reposição de glicogênio hepático, sendo esse processo conceitualmente conhecido como reciprocidade da glicose hepatorenal. O rim também está sujeito às influências

hormonais, de modo que, na presença de insulina o processo da gliconeogênese é inibido, enquanto, ao contrário do glucagon no fígado, na presença de catecolaminas o processo da gliconeogênese é estimulado (16–19). Estudos apontam que, em indivíduos com DM2, o processo da gliconeogênese no rim é aumentada, tanto no período pós absorptivo como no período pós prandial, as hipóteses indicam como causa a diminuição da insulina ou o aumento de ácidos graxos livres no organismo (20,21).

A demanda energética no rim varia em distintas regiões do órgão, com maior necessidade de glicose na medula renal, onde o metabolismo anaeróbico é predominante. Por outro lado, a região do córtex renal possui baixa capacidade fosforilante oxidativa, portanto, o uso de ácidos graxos livres é mais utilizado para seu metabolismo energético (12). Em pacientes com DM, ocorre um aumento na demanda e na captação de glicose pelo rim (22).

Como elucidado, o rim é diretamente comprometido no estado hiperglicêmico e, entre as consequências dessa relação patológica está a ND. A patogênese da ND é multifatorial e envolve distúrbios metabólicos, síntese de hormônios e anormalidades hemodinâmicas (23). Para o diagnóstico clínico da ND clássica, considera-se a presença de albuminúria persistente acima de 300mg/24hs (macroalbuminúria), associada ao aumento de creatinina sérica e diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) (24). Histologicamente, a ND apresenta-se com expansão mesangial difusa ou nodular, fibrose intersticial e espessamento das membranas basais tubulares e glomerulares (25).

Estima-se que, em 10 anos após o diagnóstico da DM1, cerca de 20 a 45% dos pacientes desenvolvam a ND, uma vez que esses pacientes apresentam início abrupto e agudo da doença, há possibilidade de maior manejo frente a ND. Por outro lado, pacientes com DM2, que representam cerca de 80% dos pacientes com DM, não raramente apresentam albuminúria juntamente com o diagnóstico do DM, evidenciando já um comprometimento renal (24,26).

Conforme as diretrizes da SBD, a doença renal diabética, englobando o fenótipo não albuminúrico da doença, pode ser classificada em 5 estágios, nos quais podemos encontrar albuminúria ainda com valores normais (<30mg/g), a microalbuminúria (30-299mg/g) e macroalbuminúria (≥ 300 mg/g), os estágios irão depender ainda da TFG. Por fim, a doença renal diabética pode ser classificada da seguinte forma: estágio 1, com TFG normal ou aumentada (≥ 90 mL/min/1.73m²);

estágio 2, com TFG levemente diminuída (60-90 mL/min/1.73m²); estágio 3, com TFG de leve a moderadamente diminuída (45-59 mL/min/1.73m²); estágio 4, com TFG muito diminuída (15-29 mL/min/1.73m²); e estágio 5, com falência renal estabelecida (<15 mL/min/1.73m²). Por se tratar de uma complicação grave, o monitoramento para prevenção da ND é indicado logo após o diagnóstico do DM. Entre os fatores modificáveis que devem ser controlados para diminuir o risco para a evolução da ND estão a hiperglicemia, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, obesidade, sedentarismo e alimentação inadequada (27).

Na condição de portador da ND, os indivíduos diagnosticados estarão expostos a outras condições patológicas que afetam diferentes órgãos. Nesse contexto, a relação entre ND e a disfunção óssea tem sido bem amplamente explorada no meio científico, sendo demonstrada alterações eletrolíticas no cálcio e o fósforo, além de alteração hormonal. Essa condição é diagnosticada como Doença Renal Crônica – Distúrbio mineral ósseo (DRC-DMO) (28).

Além da ligação patológica rim-osso relacionada à ND, encontramos na literatura científica a relação óssea com outros órgãos, incluindo seu envolvimento no metabolismo energético. Esses estudos mudaram a visão sobre o sistema ósseo, ampliando suas funções e reconhecendo-o como um órgão com função endócrina, estando envolvido no metabolismo e na homeostase energética de outros órgãos (29–32).

O osso é composto por três tipos de células, os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, com funções distintas, atuam na síntese e na manutenção da estrutura óssea. Além de sua composição celular, o tecido ósseo também é constituído pela matriz extracelular que, por sua vez, é formada por componentes inorgânicos, onde encontramos principalmente o cálcio e o fósforo; componentes orgânicos, compostos principalmente por fibras de colágeno tipo I, glicoproteínas, proteoglicanos e fatores de crescimento; e, além desses, água e lipídeos (33).

Os osteoclastos são células multinucleadas que atuam principalmente na absorção da matriz óssea, outra função importante é a regulação e diferenciação dos osteoblastos, além da mobilização de células progenitoras hematopoiéticas. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese, secreção e mineralização da matriz óssea. Os osteócitos, descendentes de células-tronco mesenquimais através da diferenciação dos osteoblastos, são as células mais abundantes, representando cerca de 90% das células ósseas, convertem estímulos externos em bioquímicos difundindo

para o restante do tecido ósseo pela rede de túbulos, podendo regular a formação e reabsorção óssea (33–35).

A síntese da matriz óssea ocorre por meio da expressão de *Cbfa1* e *Osterix* pelos osteoblastos produtores de matriz, levando à diferenciação osteoblástica, que, juntamente com a fosfatase alcalina e colágeno produzem o osteóide, matriz não calcificada. O osteoblasto tardio, presente no osteóide, começa a sintetizar a osteocalcina (OCN), diferenciando-se com formação de processos dendríticos e incorporando-se ao osteóide. Esse processo resulta na transformação dos osteoblastos em osteócitos na matriz óssea (34).

Devido à necessidade do equilíbrio entre os eletrólitos e a manutenção da estrutura óssea, durante muito tempo o osso foi visto com um órgão alvo para hormônios, entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado sua capacidade de sintetizar hormônios que atuam em vários órgãos, abrindo um campo de pesquisa promissor para a identificação de novas proteínas e novos alvos terapêuticos (29–32,36). Durante o levantamento bibliográfico foram identificados os seguintes hormônios: fator de crescimento de fibroblastos, osteocalcina (OCN), esclerostina e a lipocalina (37–40). A identificação desses hormônios evidenciou a relação do osso com o metabolismo da glicose, assim como as complicações relacionadas ao DM, tornando esses hormônios biomarcadores com potencial para utilização na prevenção, tratamento e controle da doença, visando minimizar complicações relacionadas ao DM (41).

A associação entre o DM e a fragilidade óssea é bem estabelecida e ocorre pela supressão da remodelação óssea, esse desequilíbrio resulta do descompasso entre a formação óssea osteoblástica e reabsorção óssea osteoclástica, além da ligação entre o colágeno e os produtos finais da glicação avançada. Dentre os hormônios sintetizados pelo osso, destacamos a osteocalcina, que se apresenta significativamente diminuída em pacientes com DM. No entanto, à medida em que há um controle glicêmico, seus níveis são aumentados, evidenciando uma modulação do hormônio em relação a hiperglicemia (42,43).

A osteocalcina (OCN), também conhecida como ácido γ -carboxiglutâmico, é a proteína sintetizada pelos osteoblastos mais abundante na matriz óssea, pertencente à família das proteínas dependentes de K e, em humanos, é codificada pelo gene *BGLAP* localizado no cromossomo 1 em 1q25–q31. A OCN se apresenta de duas formas: a osteocalcina subcarboxilada (ucOCN) e osteocalcina carboxilada

(cOCN). A forma da OCN que atua no metabolismo da glicose é a ucOCN, presente na circulação sanguínea e possui como receptor expresso em vários órgãos a *Gpr6a* (receptor acoplado à proteína G da família C grupo 6 membro A). A OCN na apresentação cOCN permite a homeostase do cálcio, que regula a mineralização e o crescimento ósseo (44,45).

O *Gpr6a* é um receptor expresso em muitos órgãos, sua ativação é acionada pela ligação com cátions, zinco e aminoácidos, sendo um dos receptores mais importantes da OCN circulante. Estudos iniciais mostraram que a inativação do *Gpr6a* leva a um fenótipo em camundongos igual à OCN *knockout* (KO), resultando em hiperglicemia e resistência à insulina(46–49).

A OCN demonstrou ter várias funções endócrinas em diferentes tecidos, incluindo pâncreas, tecido adiposo, músculo e fígado. A relação entre a OCN e a DM2 está associada à obesidade, por meio da remodelação do tecido adiposo, onde ocorre a liberação de metabólitos e adipocinas, além do recrutamento de macrófagos que liberam citocinas pró inflamatórias. Esses mediadores e o desequilíbrio entre as leptinas e adiponectinas estão associados à resistência à insulina. *In vitro*, há a associação entre a hiperglicemia, estresse oxidativo e dislipidemias com a diminuição de adiponectina, que previne a apoptose de células β e promove sua regeneração. Em contrapartida, os níveis de OCN estão relacionados à adiponectina, com relação diretamente proporcional. Estudos em ratos mostraram que, assim como a adiponectina, a OCN está associada à diminuição de mediadores inflamatórios e ao aumento de mediadores anti-inflamatórios (50–54).

Outras associações com a OCN têm sido descritas na literatura, relacionadas à fertilidade, onde camundongos KO para ucOCN produziram ninhadas com menos filhotes, a hipótese levantada é que a ucOCN atua na regulação de esteróides. Outros estudos, com mesmo modelo animal, identificaram alterações na cognição, com aumento de comportamento tipo ansioso e depressivo, a hipótese é que a OCN pode influenciar na síntese de neurotransmissores (55,56). Efeitos hepáticos também foram encontrados em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, onde injeções com ucOCN preveniram a esteatose hepática e reduziram os níveis de triglicérides (50).

Entre a OCN e a DM, há associação por meio do estresse oxidativo, que promove a apoptose das células β , tanto no DM1 como na DM2, visto que as células β são vulneráveis aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS).

Uma das hipóteses levantadas é que a OCN inibe a expressão da *TXNIP*, uma proteína que se liga à tioredoxina e promove o estresse oxidativo (50,57,58).

Estudos clínicos mostraram uma relação entre a ucOCN e os índices de insulina e hemoglobina glicada. Pesquisas apontaram também a relação entre ND e OCN, onde pacientes diagnosticados com DM com níveis mais baixos de OCN tiveram um risco maior para desenvolver a ND. Em outro estudo verificou-se que pacientes com DM2 e albuminúria tinham níveis de OCN mais baixos em comparação com outros pacientes com DM2 sem albuminúria. Em pacientes diabéticos com falência renal em hemodiálise, os níveis de OCN foram diminuídos durante a terapia e reestabelecidos após 6h do término da sessão. Outra associação com pacientes diabéticos em hemodiálise foi encontrada em relação a mortalidade, onde pacientes com níveis mais baixos de OCN tinham um risco aumentado (59–62).

Estudos demonstram que a OCN pode estimular a proliferação de células β pancreáticas favorecendo, assim, a secreção de insulina e aumentando sua sensibilidade. Por outro lado, pesquisas comprovaram que a insulina pode aumentar a atividade da OCN, levando ao aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos. Outros estudos também mostraram a relação da ucOCN com a expressão gênica dos adipócitos e diminuição da massa gorda (40,63,64). *In vitro*, os resultados mostraram que OCN levou ao aumento na expressão de insulina e marcadores de proliferação das células β . Também foi evidenciado que a OCN é capaz de estimular a liberação do peptídeo -1, uma incretina que estimula a secreção de insulina (64,65).

A relação sistêmica entre a OCN e a DM tem sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas. Recentemente, também pesquisas têm sido desenvolvidas na área epigenética, bem como sua associação com condições patológicas. As alterações epigenéticas resultam da interação entre o genoma e o meio ambiente, podendo levar às alterações fenotípicas e, conseqüentemente, elevar o risco para o surgimento de doenças, como a DM (66). Estudos experimentais têm demonstrado a associação entre a restrição no crescimento intra-uterino com alterações epigenéticas e gênica no desenvolvimento na DM (67,68). Ainda, a dieta materna pode ocasionar mudanças epigenéticas hereditárias resultando em alterações metabólicas na prole (66,69). E, estudos *in vitro* com células mesangiais e tubulares proximais humanas apontaram uma relação entre a ND e a metilação do DNA (66,70). Os mecanismos epigenéticos elucidados até o momento envolvem a metilação do DNA, alterações na acetilação, metilação ou fosforilação de histonas, além de alterações na

expressão de RNA não codificante, todos esses mecanismos podem influenciar na expressão gênica. Destacando a metilação do DNA, ela ocorre pela adição de um grupo metil (CH₃) na posição 5' no anel da citosina e também nos dinucleotídeos CpG, são ilhas localizadas geralmente em regiões promotoras dos genes (66,71).

A metilação do DNA é realizada por meio das enzimas DNA Metil Transferases (*DNMTs*), levando à hipermetilação e inibição da expressão gênica. Por outro lado, há também as enzimas responsáveis pela hipometilação e, conseqüentemente, pela ativação transcricional, denominadas Ten-Eleven-Translocation (*TETs*) (29,72).

Pesquisas sobre mecanismos epigenéticos têm apresentado crescimento exponencial nos últimos anos. A possibilidade de que fatores externos possam modificar a expressão gênica e alterar o fenótipo levou à reflexão do seu uso a favor da medicina, visando à prevenção de doenças ou mesmo à reversão de condições patológicas. Fazendo a ligação com a DM, juntamente com a ND e a OCN, a inclusão da avaliação epigenética surge como uma abordagem promissora para elucidar mecanismos até então desconhecidos. Há uma demanda por estudos experimentais para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na comunicação entre o eixo rim-osso, por meio da expressão da OCN e seu receptor, em um meio que mimetiza a DM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a homeostase na comunicação entre o eixo osso-rim em um ambiente hiperglicêmico por meio da regulação epigenética da osteocalcina e seu receptor *Gprc6a*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica da osteocalcina e do receptor *Gprc6a* nos tecidos renal e ósseo de ratos submetidos à hiperglicemia crônica.

- Analisar a metilação global do DNA no rim de ratos submetidos à hiperglicemia crônica.

- Analisar a metilação específica das regiões promotoras dos genes responsáveis pela expressão da osteocalcina e receptor *Gprc6a* no rim de ratos submetidos à hiperglicemia crônica.

- Investigar a atividade máxima de enzimas associadas ao metabolismo da glicose no rim de ratos com hiperglicemia crônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo *in vivo* e *ex vivo*, realizado a partir de amostras previamente coletadas em parceria com outra pesquisa na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Alexandra Latini, de acordo com as diretrizes éticas do Comitê de Ética em Pesquisa. As amostras foram provenientes de um modelo experimental *in vivo*, no qual ratos Wistar foram submetidos à hiperglicemia mediante tratamento com estreptozotocina e mantidos em um estado hiperglicêmico por 60 dias. A partir do material biológico doado, foram avaliadas a expressão gênica da OCN e do receptor *Gprc6a* no rim e osso, a expressão das enzimas que atuam na metilação e a porcentagem das marcas responsáveis pela metilação específica dos genes relacionados à expressão da OCN e do receptor *Gprc6a* no rim.

Em segunda fase, o mesmo modelo animal com hiperglicemia crônica, a partir do tratamento com estreptozotocina, foi reproduzido em nosso laboratório a fim de verificar as alterações histopatológicas e a atividade enzimática presentes no tecido renal.

3.2 Animais

O material biológico doado foi obtido a partir de ratos machos da raça Wistar, com total de 10 animais. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina/SC, aonde foram aclimatados no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade e mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Acomodados em caixas de plástico com acesso livre à ração e água, mantidos em jejum apenas 6 horas antes da verificação a glicose sanguínea e 14h antes do tratamento com streptozotocina. Todos os cuidados para minimizar o sofrimento e promover o bem-estar dos animais foram realizados.

Para segunda etapa *in vivo*, 7 ratos machos também da raça Wistar provenientes do biotério da Universidade Paulista (UNIP), foram mantidos sob as condições de aclimação supracitadas. Os ratos foram eutanasiados, após completarem 2 meses da determinação da hiperglicemia, por aprofundamento anestésico inalatório com isoflurano. Após completa parada cardiorrespiratória, os animais foram lavados em água corrente para remoção de contaminantes na pelagem e imersos em solução de álcool 70%. Então, foi realizada incisão em região abdominal e coletado o lavado peritoneal, para posterior avaliação da presença de linfócitos. Os rins e o pâncreas foram coletados, o rim direito e o pâncreas foram armazenados em formalina tamponada para posterior preparação e análise histopatológica e o rim esquerdo acondicionado à -80°C para análise do metabolismo.

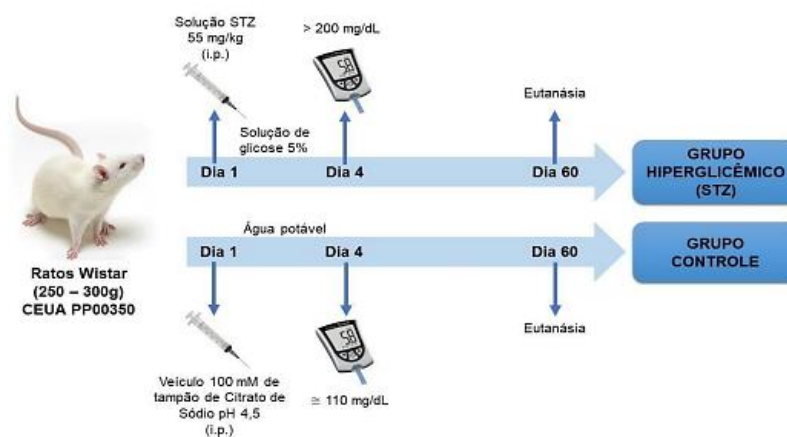
3.3 Aspectos éticos

Para o estudo, as amostras provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina foram obtidas por meio de carta de doação da Profa. Dra. Alexandra Latini, estando em acordo com as diretrizes éticas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (**PP00350/CEUA**) (ANEXO 1). O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UNIP e aprovado para extração de células renais para uso em cultura primária (**CEUA nº 5060290823**) (ANEXO 2), entretanto, o projeto passou por uma modificação e ao invés da cultura primária de células, os animais foram realocados para o protocolo *in vivo* de tratamento com estreptozotocina e indução de hiperglicemia crônica, para avaliação histopatológica e metabólica do tecido renal, conforme adendo aprovado pela CEUA UNIP (ANEXO 3).

3.4 Modelo experimental com indução à hiperglicemia crônica

A indução da hiperglicemia foi realizada por meio de uma única injeção intraperitoneal com estreptozotocina, na dosagem de 55 mg/ kg, diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,5), após um período de jejum de 14 horas. Os animais receberam posteriormente solução de glicose a 5% por 24 horas para diminuir o risco de hipoglicemia. A glicemia foi verificada no 4º dia após a indução e os ratos com a glicemia acima de 200mg/dl foram incluídos no estudo. A glicemia foi verificada, utilizando o glicosímetro Optium™ Xceed, Abbott, EUA, a cada 15 dias para assegurar o estado de hiperglicemia, e, após esse período foi realizada a eutanásia dos animais e coleta dos tecidos (73).

Figura 2 – Desenho Experimental. Grupo de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia e grupo de ratos controle



Fonte: Silva et al (Anexo 1)

3.5 Histomorfometria

Após a eutanásia os animais foram necropsiados, sendo rim e pâncreas imediatamente imersos em solução de formol a 10%, na qual permaneceram por ao menos 48hs, seguindo-se a realização de cortes longitudinais, selecionando-se áreas representativas. Com o emprego de processador tecidual automático OMA DM40, as amostras passaram por desidratação em etanol, diafanização com xilol e impregnação em parafina. Com o uso de micrótomos Leica RM 2125RT (Leica, Alemanha), procedeu-se a realização de cortes com 5µm. de espessura, posteriormente desparafinados e corados pelos métodos de Hematoxilina/Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram examinadas em fotomicroscópio

OPTICAM® acoplado à câmera digital, OPUHD 14.3MP.

3.6 Morfometria

A avaliação morfométrica foi realizada com o emprego do programa de análise de imagens Fiji/Image J, a partir de fotomicrografias obtidas de 04 ilhotas de Langerhans, mais proeminentes, representativas de cada animal, com objetiva de 40x. Estas foram delimitadas manualmente, de forma individual, com o auxílio do cursor, mensurando-se sua área e perímetro. Procedeu-se avaliação estatística utilizando-se o teste T de Student não pareado, considerando-se $p < 0,05$.

3.7 Atividade enzimática

A avaliação do metabolismo celular foi realizada a partir de amostras do rim. As amostras foram ressuspensas em 1mL de tampão de extração contendo Tris 100mM, EDTA 2m, Triton 1% e inibidores de proteases e fosfatases, posteriormente foram sonicadas para induzir o rompimento da membrana plasmática permitindo a liberação do citosol da célula. Após esse procedimento, os restos celulares foram centrifugados a 12000rpm por 10 minutos e o sobrenadante, mantido em gelo, separado para os ensaios enzimáticos.

3.7.1 Hexoquinase: é a enzima utilizada para catalisar a fosforilação da glicose, a primeira reação da via glicolítica. A atividade máxima da enzima, segundo CRABTREE: NEWSHOLME em 1972, tem como parâmetro a proporção de NADPH formado. O meio de ensaio para a determinação consiste de Tris-HCl 75mM; $MgCl_2$ 7,5 mM; EDTA 0,8 mM; KCl 1,5 mM; mercaptoetanol 4 mM; NADP + 0,4 Mm; ATP 2,5 mM; glicose 1 mM; creatina-triton X-100 1% (v/v); PH 7,5 ao qual serão adicionados 100 μ L do sobrenadante, em um volume total de 1 mL. O ensaio foi iniciado pela adição de glicose ao meio e as determinações foram realizadas a 25°C, por 10 minutos, a 340 nm.

3.7.2 Glicose-6-fosfato desidrogenase: é a enzima que catalisa a primeira reação da via das pentoses. A atividade máxima enzimática foi avaliada segundo Bergmever et al. (1954). O tampão de extração (pH: 8,0), consiste de Tris-HCl 50 mM; $MgCl_2$ 7,5 mM, EDTA 1 mM, KCL e sulfato de magnésio 5 mM. O meio de ensaio que foi utilizado é constituído por Tris-HCl 86 mM; $MgCl_2$ 6,9 mM, NADP + 0,4 mM, glicose 6-fosfato 1,2 U; Triton X-100 1% (v/v), ao qual foram adicionados 100 μ m de sobrenadante.

3.7.3 6 Fosfofrutoquinase: enzima da via glicolítica que catalisa a transferência irreversível de um fosfato da ATP a glicose-6-fosfato. A atividade máxima foi determinada segundo descrito por Opie e Newsholme (1967). O meio de ensaio para a determinação consiste de Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 2 mM, EDTA 0,8 mM, KCl 5 mM, NADH 0,2 mM, ATP 1 mM, LDH 2 U, piruvato quinase 4 U, Triton X-100 1% (v/v), pH 7,5 ao qual foram adicionados 20µL do sobrenadante, em um volume total de 100 µL. O ensaio foi iniciado pela adição de F6P 3mM e fosfoenolpiruvato 2mM ao meio e as determinações foram realizadas a 25°C, por 10 minutos, a 340 nm.

3.7.4 Piruvato quinase: enzima da via glicolítica que catalisa a transferência irreversível de um fosfato da fosfoenolpiruvato para o ADP, resultando em piruvato e ATP. A atividade máxima foi determinada segundo descrito por Opie e Newsholme (1967). O meio de ensaio para a determinação consiste de KHPO₄ 100 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0,8 mM, KCl 80 mM, NADH 0,17 mM, ADP 5 mM, LDH 9 U, Triton X-100 1% (v/v), pH 7,5 ao qual foram adicionados 20µL do sobrenadante, em um volume total de 100 µL. O ensaio foi iniciado pela adição de fosfoenolpiruvato 2mM ao meio e as determinações foram realizadas a 25°C, por 10 minutos, a 340 nm.

3.7.5 Citrato sintase: a atividade da enzima será determinada segundo Alp e colaboradores (1976), pela quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. O tampão de ensaio que será utilizado consiste de Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM. O tampão de extração (pH: 7,4) é constituído de Tris-aminometano 50 mM; EDTA 1 mM; DTNB 0,2 mM; acetil- CoA 0,1mM; oxaloacetato 0,5 mM e Triton X-100 1% (v/v), ao qual serão adicionados 100µm do sobrenadante.

3.7.6 Carnitina Palmitoiltransferase: a atividade da enzima foi determinada segundo Bieber et al. (1972) e Zammit e Newsholme (1979). O tampão de ensaio consiste em 60mM Tris HCL; 1,5 mM EDTA; 0,25 mM DTNB; 0,035 mM palmitoyl-CoA; 1% triton x-100e 1,25 mM L(-) carnitina ou 1,25 mM D-(+) carnitina, em pH: 8,0. O volume total do ensaio foi de 175µL de tampão de ensaio ao qual foi adicionado 25µL de homogenato/sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de carnitina e monitorada a 412 nm por espectrofotometria. A atividade da enzima foi calculada pela diferença do DTNB da reação com a L(-) carnitina pela reação com a D-(+) carnitina.

3.7.7 Determinação da concentração de proteínas: a concentração de proteína foi determinada utilizando-se Micro BCA Kit conforme recomendações do fabricante. Rapidamente, uma amostra diluída 80x do extrato protéico foi misturada

em mesmo volume de **work reagent**, contendo 25 partes de reagente A, 24 partes de reagente B e 1 parte de reagente C, contidos no kit. A concentração final de cada amostra foi determinada pelo cálculo de equação da reta obtido pela reação com curva padrão confeccionada com solução de albumina sérica bovina à 2mg, respeitando o intervalo de 0 a 200µg e diluições aplicadas.

3.7.8 Cálculo e expressão dos resultados: a atividade máxima das enzimas foi expressa em nmol/min/mg de proteínas. Os cálculos da atividade máxima são feitos conforme a equação:

$$\frac{\text{Abs/dt} \times \text{V.T.E.}}{\text{Coef. Extinção} \times \text{diluição da amostra}} \times \text{V.A.}$$

Onde: abs= diferença de absorbância; dt= delta do tempo de análise; VTE= volume total do ensaio; VA= volume da amostra. Coeficiente de extinção para 340 nm = 6,22 (e = 6,22 nM⁻¹. mL⁻¹) e para 412 nm = 13,6 (e = 13,6 nM⁻¹, mL⁻¹).

3.8 Extração de RNA

Para obtenção do RNA total fragmentos do tecido ósseo desmineralizadas e renal foram homogeneizados em 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguido de separação da fase aquosa pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) por centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) e o RNA precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) após incubação por 10 minutos (temperatura ambiente), seguido por centrifugação (14.000 RPM por 15 min a 4°C). Após o término da centrifugação o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75 % em água DEPC gelada, ressuspendido em 50 µL de água DEPC e armazenados a -80 °C. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 (≥ 1,8) e OD 260/230 (≥ 1,0) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

3.9 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total, na presença de 1 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo

fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em uma reação com volume final de 20 μL contendo 500 nM de dNTP, 25 $\mu\text{g/mL}$ de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 nM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida, a reação de síntese de cDNA foi realizada por 50 minutos a 50°C, seguida por 5 minutos a 85°C. Após o término, o cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

3.10 Determinação da expressão gênica

A expressão dos genes *Bglap* e de seu receptor *Gprc6a* foram determinados nos tecidos ósseo (fêmur e mandíbula) e renal, além da expressão das enzimas modificadoras do DNA [DNA metiltransferases (*Dnmt1*, 3A e 3B) e DNA desmetilases (*Tet1*, 2 e 3)]. No tecido renal foram realizadas em reações com duplicata técnica e volume final de 10 μL , contendo 1 μL do cDNA sintetizado (50 ng), 5 μL de SYBR Green I Master (LightCycler® 480, Roche Applied Science), 8 pmoles dos iniciadores específicos e q.s.q. de água Milli-Q *Rnase free*. As condições de reações e temperatura de anelamento foram apresentadas na **Tabela 1**. Para o cálculo da quantidade relativa dos transcritos, utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$, utilizado os genes *Gapdh*, β -*actina* e *18S* como normalizadores. Neste método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os números finais obtidos foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. As análises das curvas de *melting* foram realizadas em rampa de aquecimento de 65°C a 95°C com 25 aquisições por °C e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 experimento animais independentes.

Tabela 1 – Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene (ID)	Primers	5'- 3' Sequence	Reactions Condicion	Fragment Size
DNMT1 (84350)	Forward	AGG ACC CAG ACA GAG AAG CA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	201 pb
	Reverse	GTA CGG GAA TGC TGA GTG GT		
DNMT3A (444984)	Forward	AGG AAG CCC ATC CGG GTG CTA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	225 pb
	Reverse	AGC GGT CCA CTT GGA TGC CC		
DNMT3B (444985)	Forward	TCG ACT TGG TGG TTA TTG TCT G	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	129 pb
	Reverse	TCG AGC TAC AAG ACT GCT TGG		
TET1 (309902)	Forward	GCC CCT CTT CAT TAC CAA GTC	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	211 pb
	Reverse	CGC CAG TTG CTT ATC AAA ATC		
TET2 (310859)	Forward	GGT GCC TCT GGA GTG ACT GT	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	245 pb
	Reverse	GGA AAA TGC AAG CCC TAT GA		
TET3 (680576)	Forward	GGC CAG GTC CTG AAA GCT	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	198 pb
	Reverse	CGC CTC ACA GGA GAC AAT C		
Osteocalcin (25295)	Forward	AGC TCA ACC CCA ATT GTG AC	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	190pb
	Reverse	AGC TGT GCC GTC CAT ACT TT		
Gprc6a (294394)	Forward	GTG CTT CGA GAA GGA AGT GG	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	165 pb
	Reverse	CAG ACC ACT AAT CCC CCA GA		
Gapdh (24383)	Forward	TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA G	95°C - 15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	345 pb
	Reverse	AGT GGC AGT GAT GGC ATG GAC T		
β-actin (81822)	Forward	TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG	95°C - 15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	206 pb
	Reverse	TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT		
RNU6 (MI0002469)	Forward	CTC GCT TCG GC AGC ACA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	94
	Reverse	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT		

3.11 Extração do DNA

Para obtenção do DNA genômico (gDNA), fragmentos do tecido renal foram homogeneizadas em 0,5 mL de tampão de extração (10 mM Tris HCl pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS). Em seguida, as amostras foram digeridas com proteínase K (20 mg/mL) por 16 horas a 56°C. No dia seguinte foi adicionado 1 mL de fenol-clorofórmio equilibrado (pH 8,0) e homogeneizados manualmente até a formação de uma emulsão leitosa. Em seguida as amostras foram centrifugadas (15 minutos a 14.000 rpm) a temperatura ambiente. Após o término da centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo tubo. Após este procedimento, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas (15 minutos a 14.000 rpm), o sobrenadante coletado e foram adicionados 1 ml de álcool 100% gelado e 150 µL de acetato de sódio 3M. Após incubação (2 horas a - 70°C) o gDNA foi precipitado por

centrifugação (15 minutos a 14000 rpm). Após a lavagem do etanol 70% gelado em água DEPC estéril, o gDNA foi ressuscitado em 50 μ L de água DEPC estéril. A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A linhagens celulares de rim em cultura também passarão pelo mesmo tratamento para obtenção do DNA.

3.12 Tratamento enzimático do DNA

Para determinação do conteúdo de 5-metilcitosina (5-meC) e 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37 °C por 2 h com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4- β -glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 μ L. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina, o qual bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas e não metiladas, mantendo íntegras as regiões CCGG hidroximetiladas. Em etapa seguinte, as amostras foram incubadas a 65 °C por 15 min para inativação da enzima T4-BGT (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). Após o tratamento com a enzima T4-BGT os tubos foram digeridos com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5 hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas promovem a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido – controle 100 %). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μ L a 37°C por 2 horas.

3.13 Análise de qPCR para determinação de metilação gene específico

O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região

promotora dos genes *Bglap* e *Gprc6a* foi determinado por reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (5 µL) 0,5 nM de iniciadores específicos [*Gprc6a* (F: 5' TGG TGG AGG AAG GGT ATT TG 3' e R: 5' CCC TTC CAA TGT AGG GGA AT 3') e DNA desmetilases (F: 5' CTC ACG GCA GAC ACT GAA AA3' e R:5' AAA GGA TGC TGT GGT TGG TGA CTG CAG3')], 1 µL (16 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições: H₂O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhadas em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição, utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0) (UNTERGASSER et al., 2012). A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foi analisada pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). A obtenção dos valores percentuais referentes à metilação e hidroximetilação foram calculados de acordo com (74)

3.14 Análise estatística

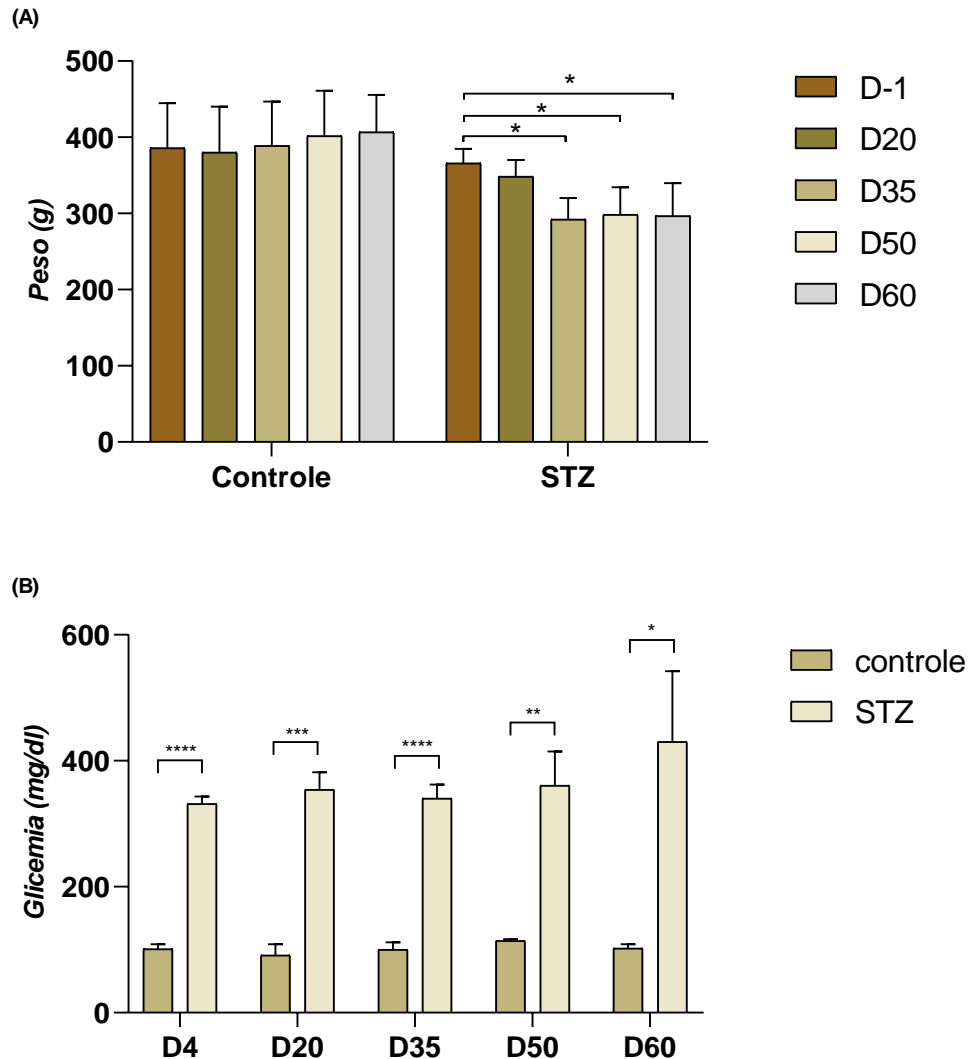
Os dados foram submetidos à análise por meio de estatística descritiva, análise de tendência central e testes de associação. Para análise das amostras foi utilizado o programa GraphPad Prism 8 para Windows e aplicado teste *T-student* na comparação entre os grupos controle e com hiperglicemia, e a análise de variância (ANOVA) para análise do perfil transcricional entre o tecido ósseo (fêmur e mandíbula) e renal. Considerado valor de significância para $p \leq 0,05$ para ambos os testes.

4. RESULTADOS

Conforme descrito nos métodos, o modelo experimental utilizado induziu a hiperglicemia nos ratos pela injeção de estreptozotocina (STZ), e seguiu-se com um acompanhamento por 2 meses. Neste período, foram aferidos o peso e a glicemia dos animais, conforme a **Figura 3**. O peso foi verificado quinzenalmente e, no grupo submetido à hiperglicemia crônica (grupo STZ) identificamos uma diminuição do peso corporal a partir da segunda aferição (**Fig. 3A**), enquanto não houve variação significativa no grupo controle. Quanto à glicemia, como esperado, o grupo STZ apresentou valores mais elevados em relação ao grupo controle, sempre acima de

250 mg/dL (**Fig. 3B**), assegurando o estado hiperglicêmico do grupo STZ durante todo o experimento.

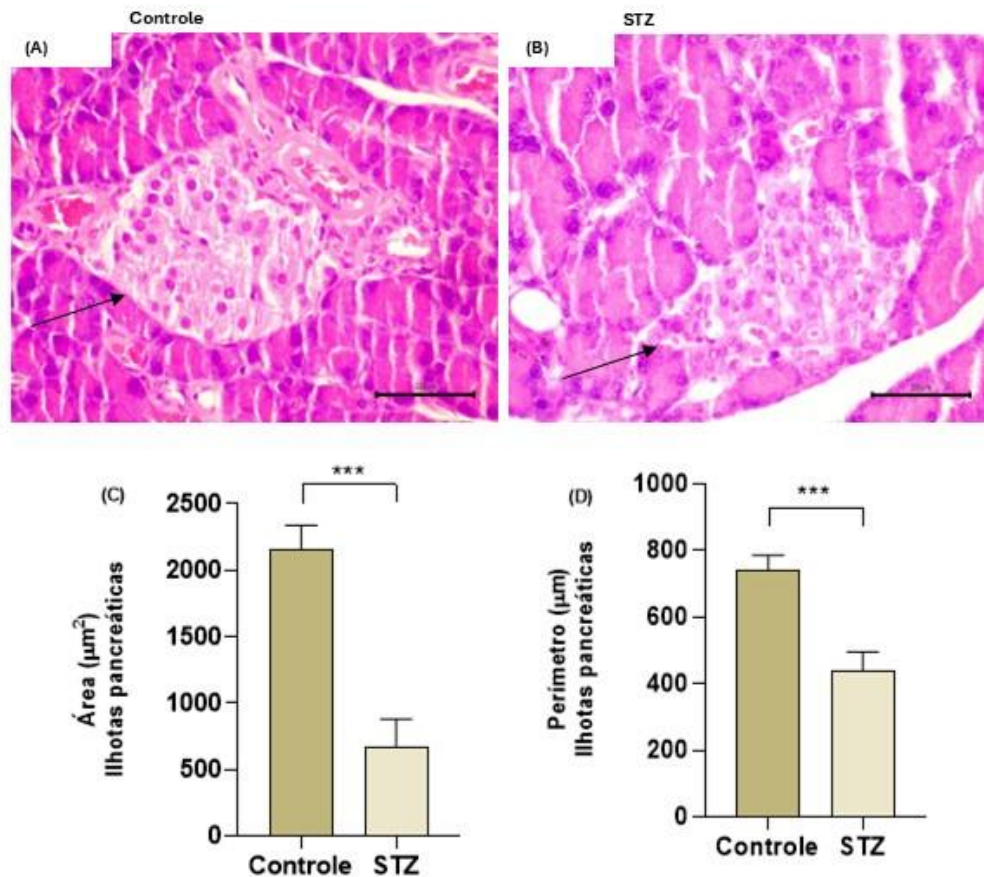
Figura 3 - Acompanhamento do peso e da glicemia de ratos submetidos ao diabetes. Medidas de (A) peso e (B) glicemia de ratos submetidos à hiperglicemia crônica pela injeção de estreptozotocina (STZ) e seus controles saudáveis (controle) durante o período de 60 dias após a indução de diabetes. Utilizado * para teste *T* de Student comparando STZ *versus* control, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: Própria

A avaliação histológica demonstrou prejuízo do tecido endócrino (**Figura 4**) no pâncreas de animais do grupo STZ, com perda conformacional das ilhotas (**Fig. 4B**) e comprovada atrofia por meio da diminuição da área e perímetro das ilhotas no grupo STZ (**Fig. 4C,D**) quando comparadas ao grupo controle.

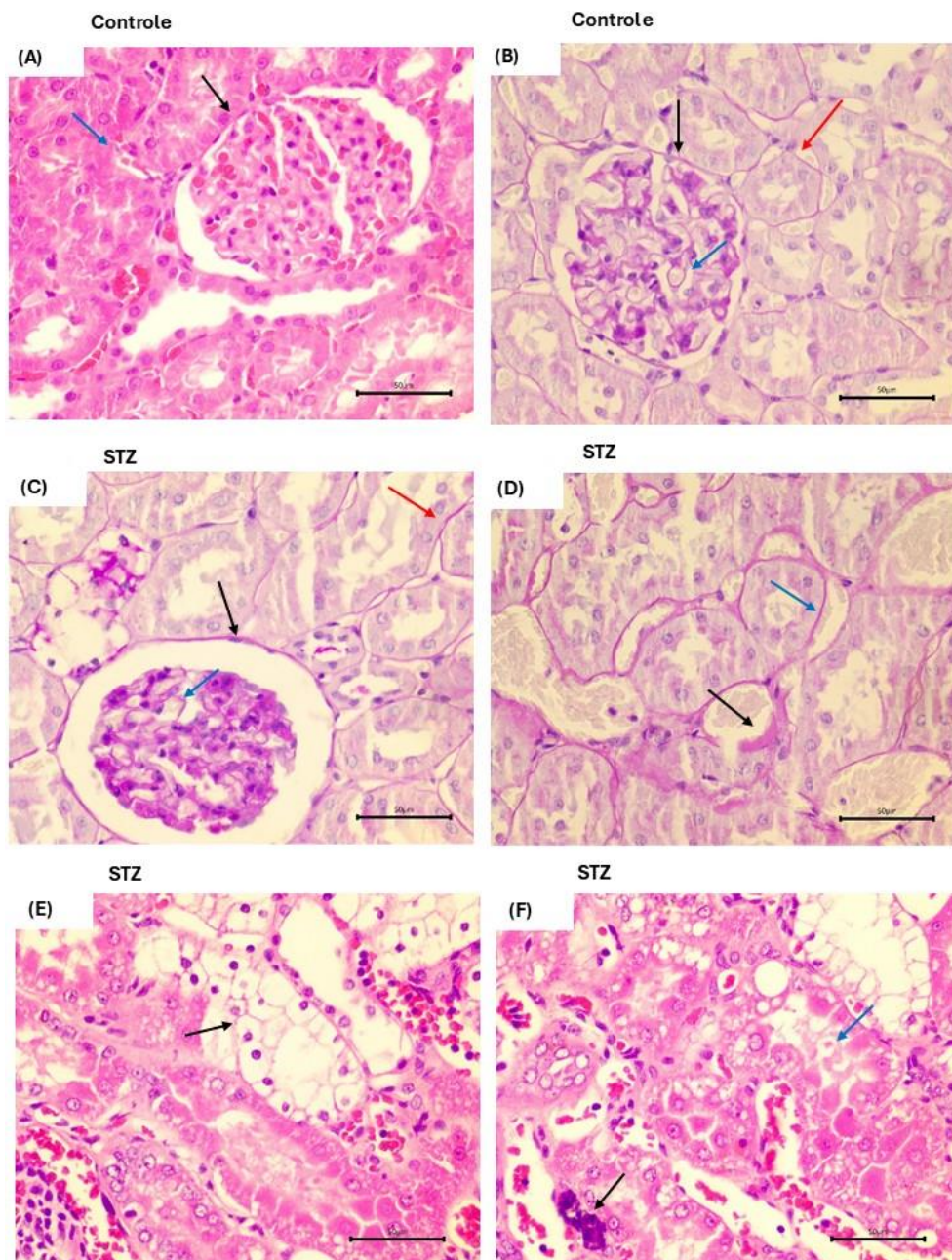
Figura 4 – Efeitos da hiperglicemia sobre a morfologia do pâncreas. (A) Fotomicrografia de pâncreas, evidenciando uma ilhota pancreática (seta) de rato do grupo controle e (B) do grupo submetido à hiperglicemia (STZ). Coloração com hematoxilina/eosina (HE); aumento: 40x. (C,D) Morfometria das ilhotas pancreáticas de ratos submetidos à hiperglicemia e seus controles não tratados, representada pela a área e perímetro das ilhotas. O test *t* de Student revelou significância com ****p* < 0,001



Fonte: Própria

Nas fotomicrografias da **Figura 5**, avaliamos os rins de ratos dos grupos STZ e controle. No grupo controle (**Fig. 5A**) foram identificados o corpúsculo renal e túbulos renais, destacando-se também a cápsula de bowman, membrana basal do capilar glomerular e túbulo renal (**Fig. 5B**). No grupo STZ, encontramos alterações significativas causadas pela hiperglicemia, tais como: (**Fig. 5C**) espessamentos na cápsula de bowman, membrana basal do capilar glomerular e na membrana basal tubular; (**Fig. 5D**) espessamento na membrana vascular e na membrana basal tubular; (**Fig. 5E**) vacuolização em epitélio do túbulo proximal; (**Fig. 5F**) calcificação distrófica e necrose em região tubular.

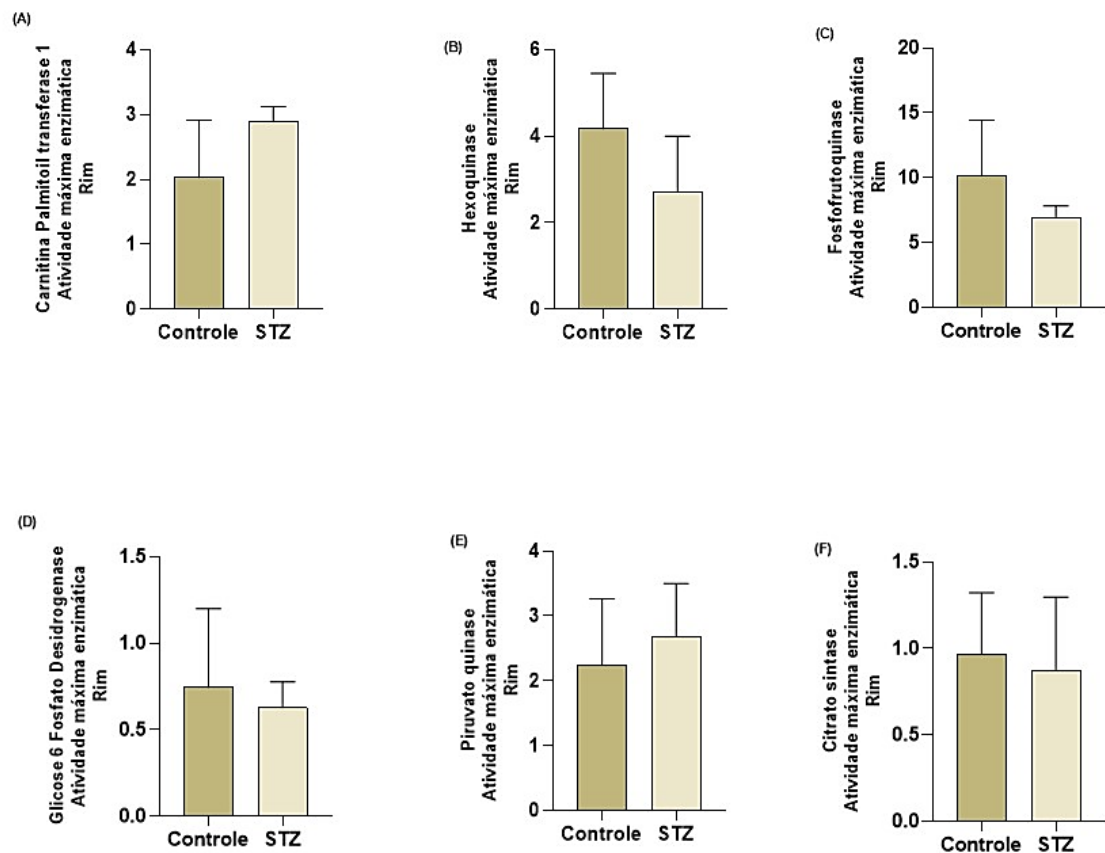
Figura 5 – Efeitos da hiperglicemia sobre a morfologia renal. (A,B) Fotomicrografias de rins de ratos do grupo controle corados em HE e PAS, respectivamente, aumento: 40x. (C,D) Fotomicrografias de rins de ratos do grupo STZ corados em PAS, aumento: 40x. (E,F) Fotomicrografias de rins de ratos do grupo STZ corados em HE, aumento: 40x. As setas pretas indicam: (A) corpúsculo renal; (B) cápsula de bowman; (C) espessamento na cápsula de bowman; (D) espessamento da membrana basal vascular; (E) vacuolização em epitélio do túbulo proximal; e (F) calcificação distrófica. As setas azuis indicam: (A) túbulo renal; (B) membrana basal do capilar glomerular; (C) espessamento da membrana basal do capilar glomerular; (D) espessamento na membrana basal tubular; (F) necrose tubular. As setas vermelhas indicam: (B) túbulo renal, (C) espessamento na membrana basal do túbulo renal



Fonte: Própria

Para compreender as alterações metabólicas causadas pelo estado hiperglicêmico, amostras de rim foram processadas e estudadas para avaliação da atividade máxima das enzimas do metabolismo de ácidos graxos e glicose. Embora haja uma tendência no aumento do metabolismo de ácidos graxos (**Fig.6A**) e diminuição do metabolismo de glicose (**Fig. 6B,C,D,F**) nos rins de ratos do grupo STZ, a análise estatística não revelou significância.

Figura 6 - Efeitos da hiperglicemia sobre a atividade máxima das enzimas da via lipolítica, glicolítica e ciclo do ácido tricarboxílico no rim. Amostras de ratos submetidos à hiperglicemia crônica (STZ) e seus controles.

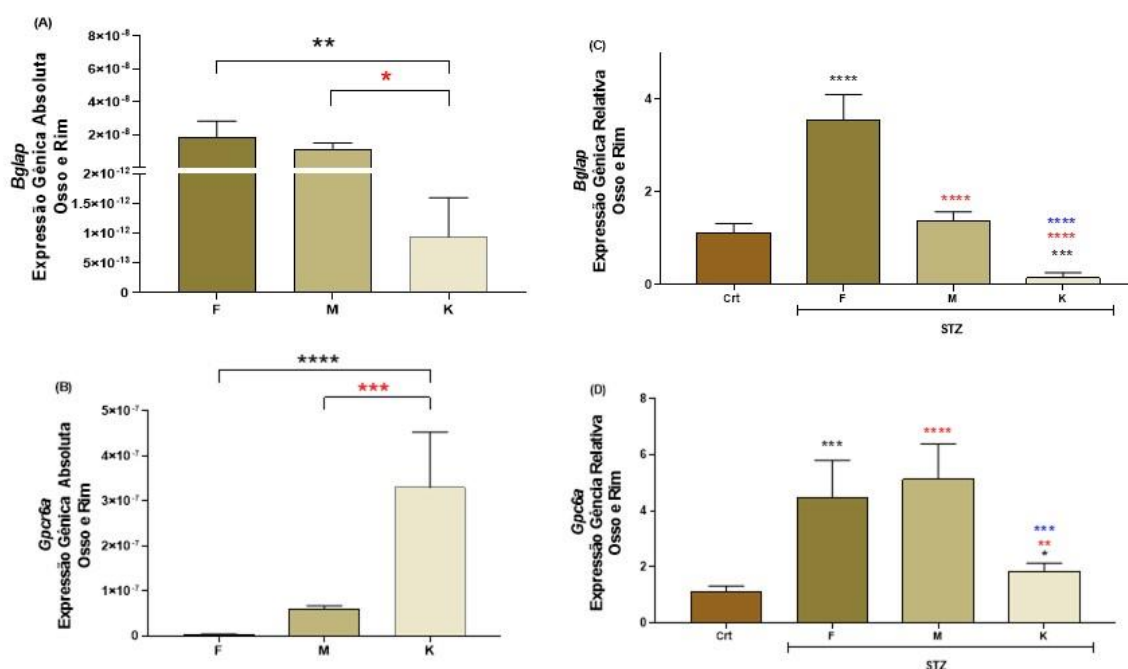


Fonte: Própria

A **Figura 7** mostra a expressão da OCN e do receptor *Gpcr6a* no rim em comparação com o tecido ósseo, a partir do fêmur e da mandíbula, podendo verificar

uma maior expressão da OCN no osso em relação ao rim (**Fig. 7A**). Em contrapartida, identificamos maior expressão do receptor *Gprc6a* no rim em relação ao osso, com $p < 0,001$ na mandíbula e $p < 0,0001$ no fêmur (**Fig. 7B**). Na análise comparativa com o grupo STZ verificamos aumento na expressão da OCN no tecido ósseo e diminuição da expressão no rim, com $p < 0,0001$ tanto em comparação com fêmur como na mandíbula (**Fig. 7C**). Em relação ao receptor *Gprc6a* identificamos aumento na expressão tanto no tecido ósseo como no rim, entretando, há expressão maior no osso em relação ao rim, com $p < 0,001$ no fêmur e $p < 0,0001$ na mandíbula (**Fig. 7D**).

Figura 7 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica da osteocalcina e seu receptor *Gprc6a* no tecido ósseo e no rim. (A,B) Expressão absoluta de OCN e seu receptor *Gprc6a* no fêmur (F), mandíbula (M) e no rim (K) no grupo controle. (C,D) Expressão relativa da OCN e seu receptor *Gprc6a* no grupo submetido à hiperglicemia. Utilizado * na comparação com grupo controle; * na comparação com F; * na comparação com M, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

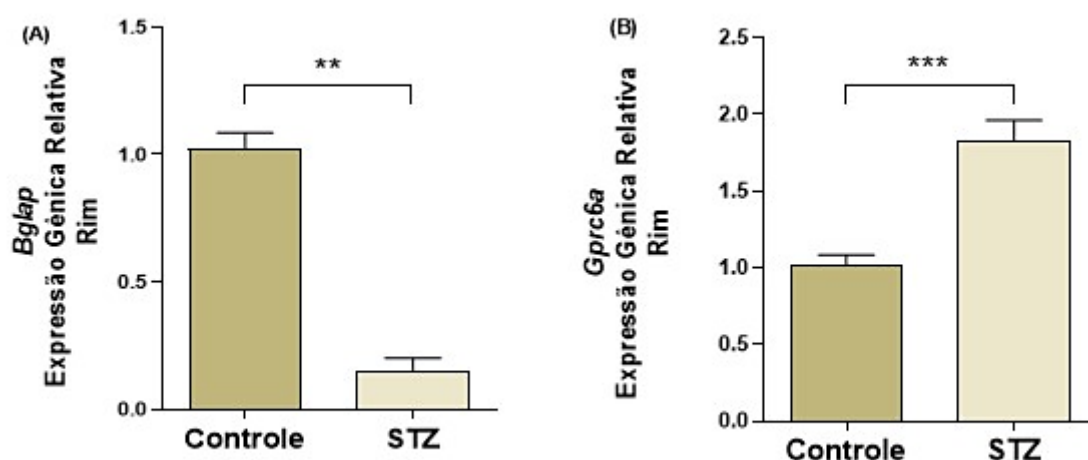


Fonte: Própria

Para melhor compreender a modulação em estado hiperglicêmico no nível renal, verificamos a expressão da OCN e do receptor *Gprc6a* apenas no rim, realizando a comparação entre os grupos controle e STZ (**Figura 8**). O estado hiperglicêmico altera tanto a expressão gênica da OCN como do receptor *Gprc6a* no

rim, mostrando diminuição da OCN no grupo STZ em relação ao grupo controle, com $p < 0,01$ (**Fig. 8A**). Em contrapartida, há aumento na expressão do receptor *Gpcr6a*, com $p < 0,001$ (**Fig. 8B**).

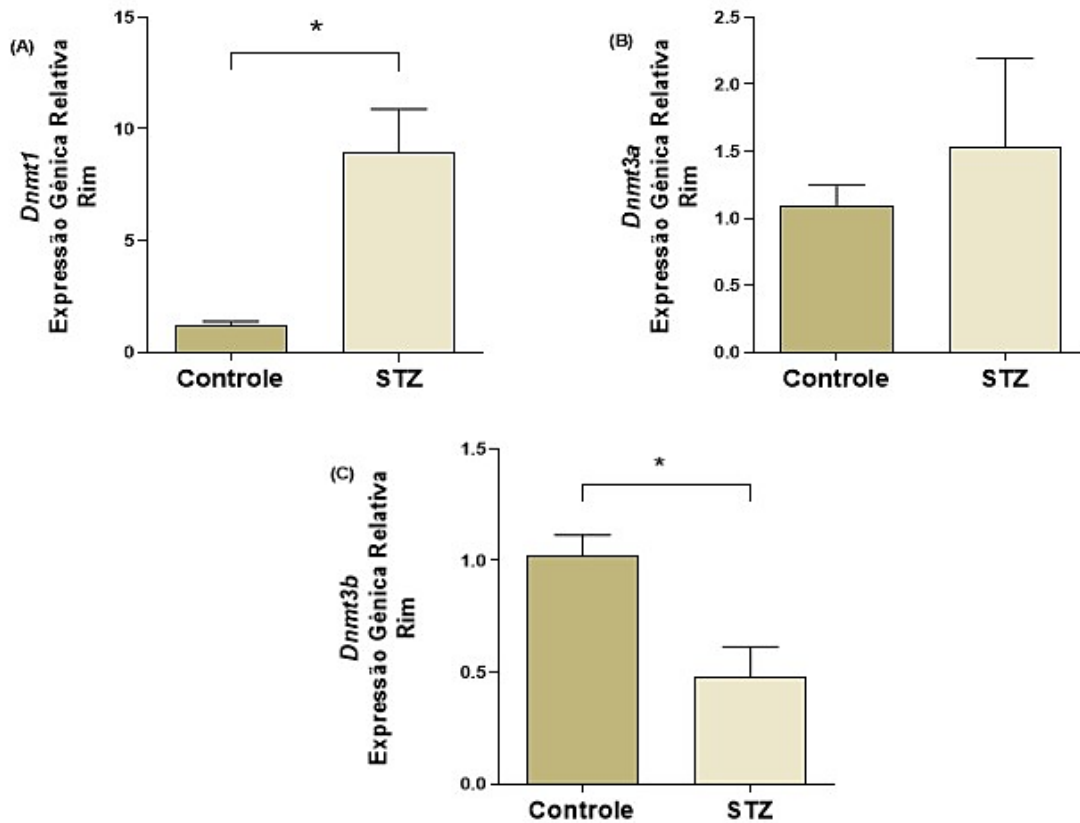
Figura 8 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica da osteocalcina e do receptor *Gpcr6a* no rim. (A) Expressão relativa de OCN no submetido à hiperglicemia (STZ) em comparação com grupo controle. (B) Expressão do receptor *Gpcr6a* no grupo STZ em comparação com grupo controle, considerando $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.



Fonte: Própria

Na avaliação epigenética foi verificada a expressão global das enzimas que atuam na metilação e desmetilação do DNA no rim, as *Dnmt's* e as *Tet's* respectivamente, conforme as **Figuras 9 e 10**. O estado hiperglicêmico resultou em desequilíbrio na expressão das *Dnmt's*, visto que houve aumento na expressão das *Dnmt1* e *Dnmt3a*, porém essa sem significância estatística (**Fig. 9A,B**) e diminuição da *Dnmt3b* no grupo STZ em relação ao grupo controle, com $p < 0,05$ (**Fig. 9C**).

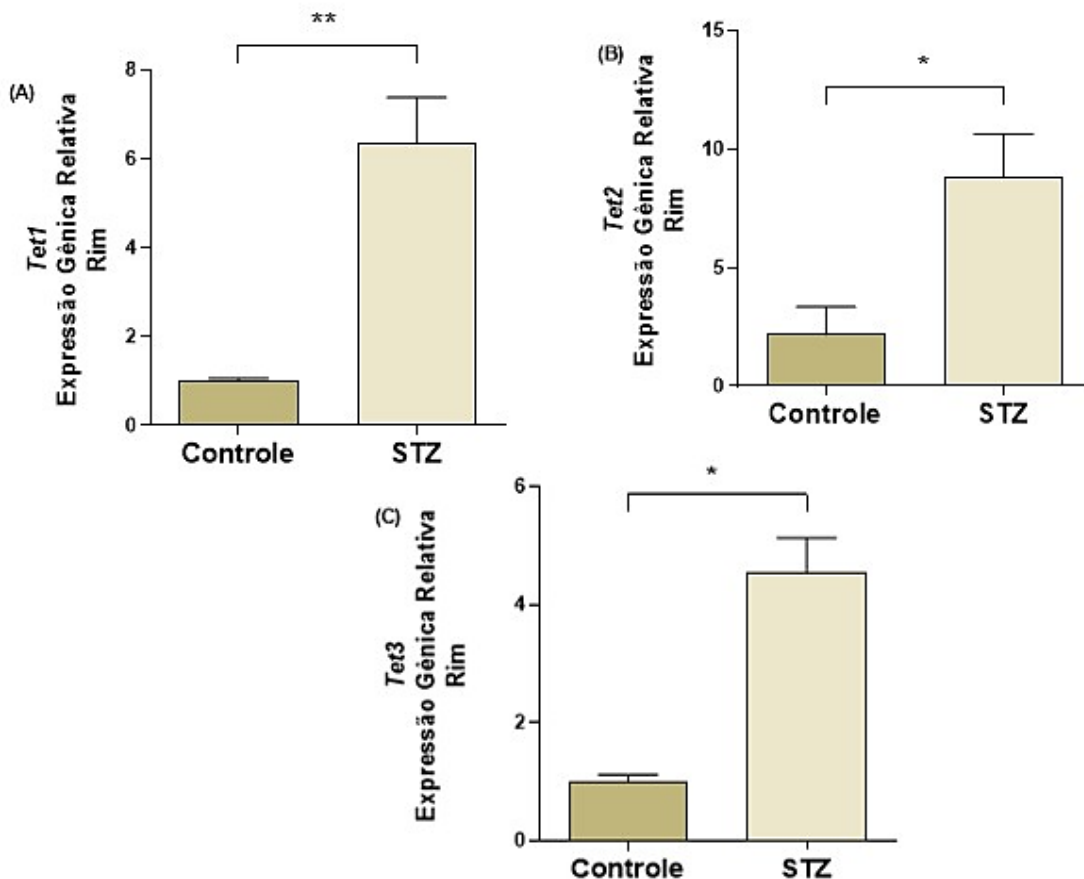
Figura 9 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica das *Dnmt*'s no rim. Expressão gênica relativa de (A) *Dnmt1*, (B) *Dnmt3a* e (C) *Dnmt3b* no grupo submetido à hiperglicemia (STZ) em comparação com o grupo controle, considerando $*p < 0,05$.



Fonte: Própria

A **Figura 10** mostrou a expressão gênica das *Tet*'s, enzimas responsáveis pela desmetilação. Foi observado aumento na expressão gênica em todas as *Tet*'s no grupo STZ em relação ao grupo controle no rim, com $p < 0,001$ para *Tet1* e $p < 0,05$ para *Tet2* e *Tet3*. Destacamos ainda que, esse aumento na expressão das *Tet*'s obteve maior relevância estatística se comparado às *Dnmt*'s.

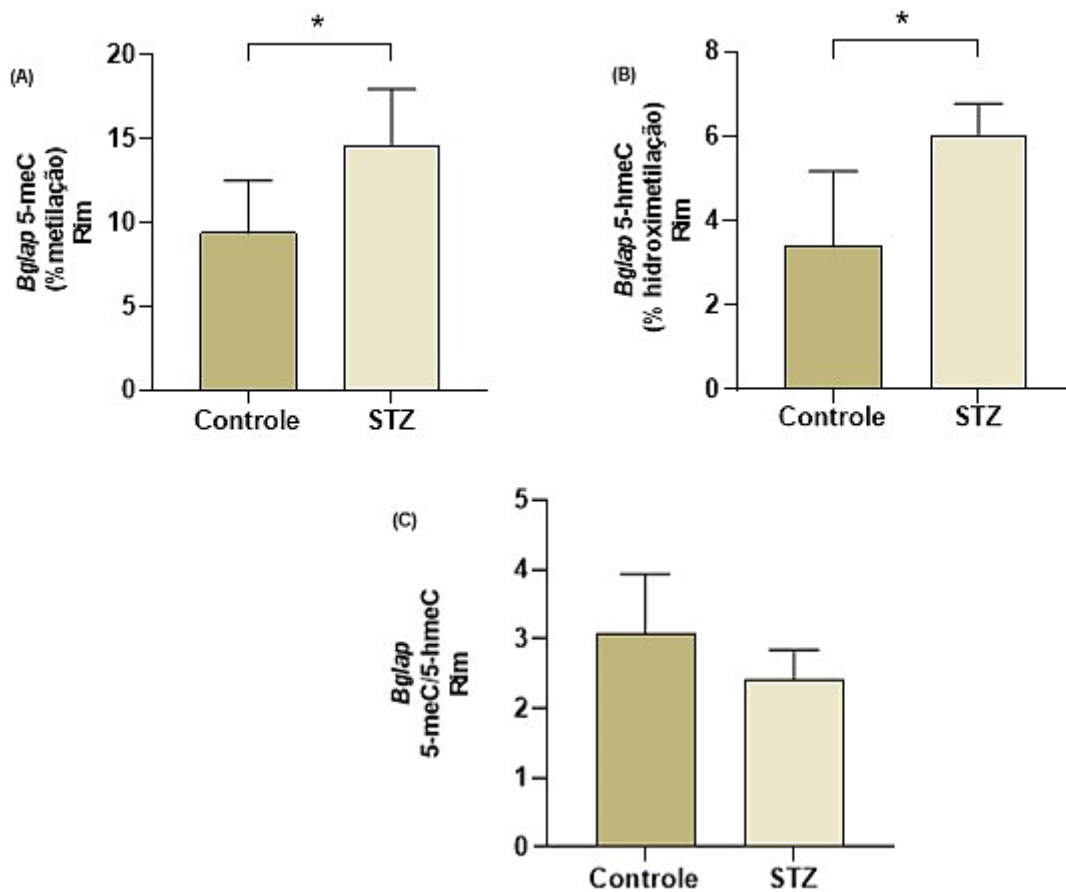
Figura 10 - Efeitos da hiperglicemia sobre a expressão gênica das *Tet*'s no rim. Expressão gênica relativa de (A) *Tet1*, (B) *Tet2* e (C) *Tet3* no grupo submetido à hiperglicemia (STZ) em comparação com o grupo controle, considerando * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.



Fonte: Própria

Após a verificação da metilação global no rim e analisar sua modulação em um contexto hiperglicêmico, identificamos a metilação específica nas ilhas CpGs localizadas nos genes relacionados à expressão da OCN (*Bglap*) e do receptor *Gprc6a*, conforme as **Figuras 11** e **12**. A verificação foi realizada por meio da porcentagem de 5-meC e 5-hmeC bem como a razão entre ambos. Foi identificado aumento tanto de 5-meC como de 5-hmeC na região gênica de *Bglap* no rim do grupo STZ em relação ao grupo controle, com $p < 0,05$ para ambos (**Fig. 11A,B**). A razão de 5-meC/5-hmeC foi menor no grupo STZ em relação ao grupo controle (**Fig. 11C**), indicando hipometilação na região gênica codificadora de *Bglap*, porém este resultado não apresentou significância estatística

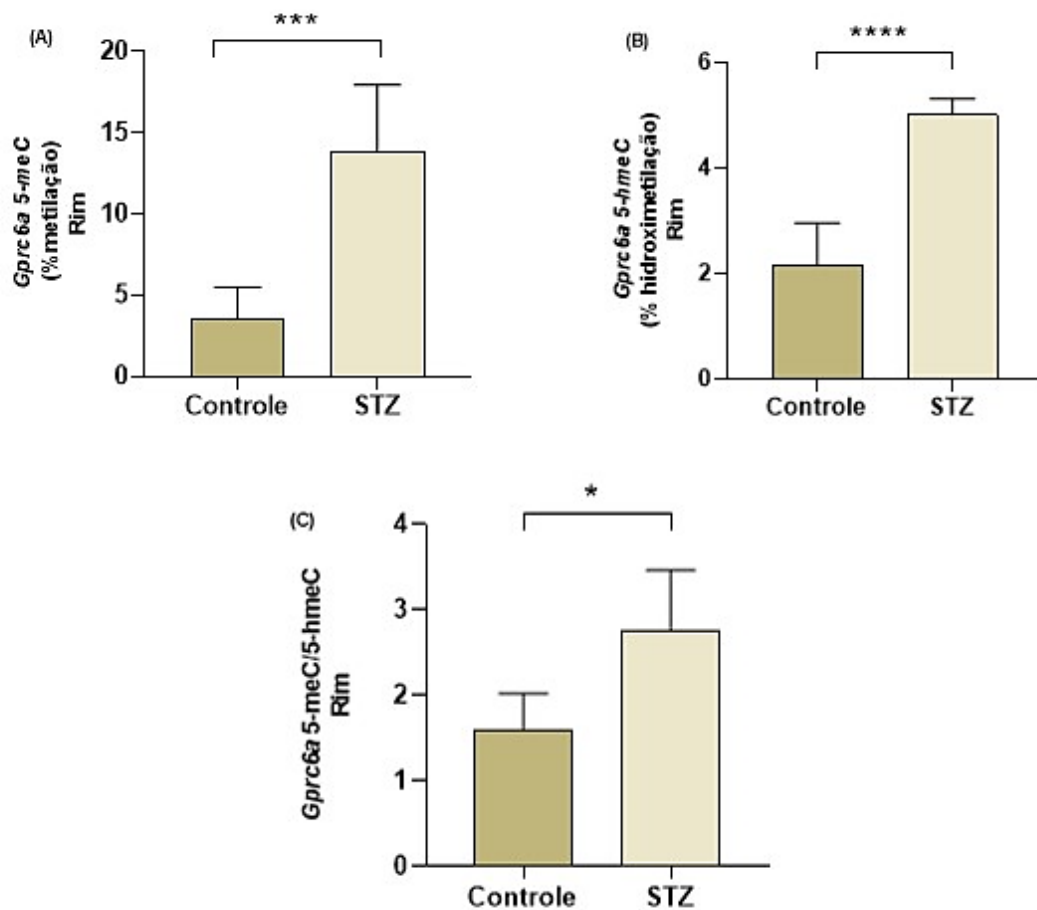
Figura 11 - Efeitos da hiperglicemia sobre a epigenética na região promotora dos genes responsáveis pela expressão da osteocalcina no rim. (A) Percentual de metilação de 5-meC na região gênica *Bglap*, (B) Percentual de hidroximetilação de 5-hmeC na região gênica *Bglap* e (C) Razão de 5-meC/5-hmeC na região gênica de *Bglap* no grupo submetido à hiperglicemia (STZ) em comparação com grupo controle, considerando $*p < 0,05$.



Fonte: Própria

A **Figura 12** mostra os resultados referentes à metilação da região gênica codificadora do receptor *Gpr6A*, na qual identificamos aumento tanto de 5-meC como 5-hmeC no rim do grupo STZ em relação ao grupo controle, com $p < 0,001$ para 5-meC e $p < 0,0001$ para 5-hmeC. (**Fig. 12A,B**). A razão de 5meC/5-hmeC demonstrou hipermetilação na região codificadora de *Gpr6A*, $p < 0,05$.

Figura 12 - Efeitos da hiperglicemia sobre a epigenética na região promotora dos genes responsáveis pela expressão do receptor *Gprc6a* no rim. (A) Percentual de metilação de 5-meC na região gênica *Gprc6a*, (B) Percentual de hidroximetilação de 5-hmeC na região gênica *Gprc6a* e (C) Razão de 5-meC/5-hmeC na região gênica *Gprc6a* no grupo submetido à hiperglicemia (STZ) em comparação com grupo controle, considerando * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: Própria

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como alvo investigar a relação entre o DM e suas possíveis implicações metabólicas e epigenéticas no rim. Porém, antes do comprometimento em outros órgãos, o DM se apresenta com sinais e sintomas clássicos, dos quais observamos nos animais utilizados no estudo. Conforme demonstrado em nossos resultados, além da hiperglicemia e diminuição de peso, observamos a presença de poliúria, polidipsia e polifagia (dados não apresentados), no grupo STZ. Esses sintomas são decorrentes do quadro de hiperglicemia, sendo também os primeiros sinais relatados por pacientes (75).

Para a indução à hiperglicemia crônica, e mimetização do quadro de DM, utilizamos um modelo experimental submetido a uma única injeção de streptozotocina (STZ) na cavidade peritoneal de ratos *Wistar*. Esse agente é um fármaco comumente utilizado em modelos animais para o estudo do DM. A STZ possui propriedades diabetogênicas por meio da destruição das células β em ilhotas pancreáticas, levando a mimetizar um modelo de diabetes agressivo, mais parecido com DM1 (29,76). Em nosso estudo tivemos êxito em realizar um acompanhamento mais prolongado.

A DM é caracterizada por um distúrbio metabólico que resulta no quadro de hiperglicemia, essa condição decorre de anomalias na secreção e/ou na função insulínica que resulta em diversas alterações micro e macrovasculares. Em nosso estudo, os dados mostraram um estado de hiperglicemia durante todo o período experimental no grupo STZ, evidenciando a eficácia do modelo escolhido (76), o que consequentemente nos permitiu avaliar os efeitos da hiperglicemia crônica nos rins dos animais. Uma vez diagnosticada o DM, seu curso é irreversível e, a depender do tipo de DM, a perda e modificações das células β podem levar desde uma condição aguda e abrupta da doença, como DM1, a outros tipos com desenvolvimento insidioso, como na DM2, entretanto vale ressaltar que há diversos tipos de DM conforme a Sociedade Brasileira de Diabetes (77).

Os sinais para surgimento do DM, no caso do DM2, antecedem o diagnóstico em anos, com pequenas alterações na glicemia que não atendem aos critérios para o diagnóstico da doença. O passo seguinte é a alteração da glicemia em jejum ou intolerância à glicose diminuída. Aqui, a glicemia foi realizada sempre em jejum de, pelo menos, seis horas e observamos uma piora da hiperglicemia ao longo das medições, revelando a mimetização plena da doença. Durante o processo de

adoecimento ocorrem mudanças tanto na função quanto na densidade de células β , um artigo publicado por Gordon e Susan (2004) classificou as alterações dessas células na DM2, com pontos em comum com a DM1, em cinco estágios: no estágio 1 há a compensação da resistência à insulina com aumento na secreção insulínica mantendo os níveis glicêmicos normais, essa compensação ocorre pelo aumento da proliferação de ilhotas pancreáticas e células β em detrimento da apoptose; no estágio 2 com aumento dos níveis de glicose, há um estado de adaptação das células β levando à hipertrofia dessas células, outra adaptação também é a diminuição da reabsorção de glicose nos rins; no estágio 3 ocorre o início de descompensação dos níveis glicêmicos com declínio de células β ; no estágio 4 há a descompensação estável nos níveis de glicemia com redução em torno de 50% de células β , nesse estágio se concentra a maior parte dos indivíduos com DM2; por fim, no estágio 5 ocorre a insuficiência das células β e progressão para quadros clínicos de cetose, nesse estágio há a necessidade da terapia insulínica (78).

As modificações nas células β foram analisadas nesse estudo mediante avaliação das ilhotas pancreáticas, e, identificamos uma diminuição tanto em perímetro quanto em área no grupo STZ, além de alterações morfológicas visíveis demonstrando um prejuízo do tecido endócrino pancreático com evidente atrofia das ilhotas pancreáticas. A comparação dos nossos resultados e o estadiamento proposto por Gordon e Susan (2004) demonstraram, mediante a manutenção da hiperglicemia e as alterações morfológicas, um grau avançado da doença, ressaltando a eficácia deste modelo no mimetismo da diabetes (78).

Dentre as complicações relacionadas à DM, o rim é diretamente afetado, colocando-o como um dos órgãos mais prejudicados pelo estado hiperglicêmico. O estadiamento da ND clássica é realizado por meio da avaliação da TGF e concentrações de albumina na urina. Há fenótipos da ND que independem da albumina, sendo denominadas insuficiência renal não albuminúrica. Além desses exames, a biópsia renal é solicitada em casos específicos, como na presença de progressão rápida da ND, ausência de outros sinais e complicações microvasculares, como a retinopatia diabética, entre outras condições. Uma vez diagnóstica a ND seu curso é progressivo e irreversível e estima-se que 20-40% dos indivíduos com DM desenvolvam a doença (79,80).

A biópsia renal é um procedimento invasivo com risco potencial para complicações graves, em pacientes com DM é realizada em casos específicos para

descartar outras causas associadas à doença renal. Um estudo realizado por Tervaert et al (2010) classificou a ND a partir de lesões glomerulares, com score de I a IV a depender do grau de comprometimento glomerular, tubulo-intersticial e vasculares. As lesões glomerulares associadas à ND foram associadas à presença de espessamento da membrana basal glomerular, esclerose nodular e expansão mesangial; as lesões tubulares ao espessamento da membrana basal, fibrose intersticial, atrofia tubular e infiltrado inflamatório com presença de linfócitos T e macrófagos; e as lesões vasculares à hialinose da arteríola eferente, sendo essa alteração uma característica clássica da ND (80,81). Nossos resultados demonstraram que o perfil histológico do grupo STZ apresentou alterações semelhantes às observadas na ND, com presença de espessamento da membrana basal glomerular e tubular, além do aumento na membrana basal vascular, vacuolização em epitélio tubular, presença de calcificações e necrose tubular, evidenciando este modelo experimental também como um bom modelo para o estudo da ND. No entanto, para o diagnóstico completo da ND, não foi possível o estudo da relação albumina-creatinina no soro dos animais.

Com o intuito de investigar o metabolismo, bem como os mecanismos para atingir a homeostase, muitos órgãos como fígado, pâncreas e até mesmo o rim foram caracterizados (12). Recentemente, estudos também demonstraram a relação entre o metabolismo e o osso mediante identificação de efeito anabólico da insulina nos osteoblastos, a partir de receptores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1) (82). Estudo com modelo animal KO para IGF-1 demonstrou uma redução significativa de mineralização e massa óssea (83). Em humanos, a diminuição de IGF-1 se correlacionou com fraturas, independentemente da densidade óssea (84). Há também uma relação entre o acúmulo dos AGEs e diminuição da secreção do IGF-1, assim como a própria hiperglicemia interfere negativamente na função e proliferação dos osteoblastos (85,86). O aumento na hemoglobina glicada também foi relacionada ao aumento de adiposidade na medula óssea e osteoporose (87). Esses achados apontam o osso como um órgão-alvo e suscetível às alterações metabólicas. Entretanto, recentemente, pesquisas têm apontado no osso a secreção de osteocinas com funções ativas no equilíbrio metabólico.

A osteocalcina tem sido caracterizada e apontada pelo seu papel importante na regulação do metabolismo energético, mineralização óssea e sua diminuição está associada ao aumento de fraturas. Berezoska et al. (2019) publicaram um estudo com camundongos KO para OCN e identificaram que esse grupo

apresentou menor densidade óssea, alta taxa de formação óssea, proporção mineral/matriz menor e aumento de marcadores de reabsorção óssea (88). Outra função da OCN seria na determinação da tenacidade óssea por meio da sua ligação forte com o componente mineral, hidroxapatita, formando um complexo com o colágeno através da proteína osteopontina. Essa ligação forma as bandas dilatacionais que, dentre suas funções, permitem o alongamento e a dissipação de energia, impedindo o crescimento de rachaduras ósseas e previndo, assim, as fraturas nanométricas. Esse fato pode justificar, em parte, o aumento de fraturas em indivíduos com DM, a despeito da taxa de densidade óssea, conforme alguns artigos (44,89).

Em nosso estudo, verificamos a expressão da OCN no osso (fêmur e mandíbula) e no rim, identificando a expressão em ambos os tecidos, porém, como esperado, com uma maior expressão no osso em relação ao rim. A revisão de literatura não revelou estudos que demonstrassem a expressão da OCN no rim. Por outro lado, em relação ao osso encontramos uma literatura vasta correlacionando a OCN com alterações metabólicas. Lee et al. (2007) descreveram inicialmente a relação da OCN e o metabolismo em camundongos KO para OCN, que apresentavam um aumento nos níveis glicêmicos, diminuição de insulina sérica, além de resistência insulínica e diminuição no número de ilhotas pancreáticas. A administração de OCN recombinante reverteu essas alterações metabólicas com melhora nos índices glicêmicos, aumento sérico de insulina e adiponectina. Nesse mesmo estudo, foi demonstrada a forma subcarboxilada da OCN (ucOCN) como responsável pelas alterações metabólicas sistêmicas e, identificado o gene *Esp* codificante para proteína tirosina fosfatase (OST-PTP), com relação direta na expressão da OCN. O estudo demonstrou que camundongos KO para *Esp* apresentaram um fenótipo oposto a camundongos KO para OCN, com hipoglicemia, diminuição acentuada de massa magra, hiperinsulinemia, aumento de células β e aumento da sensibilidade à insulina (40).

A comunicação osso-pâncreas também foi caracterizada por Fulzele et al. (2010), onde foi identificado um fenótipo semelhante à KO para OCN em camundongos KO para receptor de insulina nos osteoblastos, apresentando aumento da gordura corporal, hiperglicemia e resistência insulínica. A relação com a OCN foi afirmada por meio da administração da mesma resultando em melhora dos distúrbios metabólicos no mesmo modelo animal, comprovando uma relação endócrina osso-pâncreas (90,91). Ferron et al. (2008) demonstraram os efeitos da administração de

OCN em camundongos sem alterações genéticas propositais, sendo identificado que a infusão de OCN em doses baixas levou ao aumento na expressão da insulina, diminuição da glicemia, aumento da insulina sérica, aumento de células β , diminuição de triglicerídeos e resistência ao ganho de peso em dieta hipercalórica. No mesmo estudo, foi realizada a indução à DM por hiperfagia, e o grupo tratado com OCN apresentou menor ganho de peso, mesmo com consumo de dieta equivalente ao grupo controle (64). Um outro modelo de estudo, realizado por Silva et al. (2023), induziu DM com estreptozotocina em ratos e na avaliação da expressão da OCN no tecido ósseo identificaram um aumento da expressão da mesma e diminuição de peso no grupo com hiperglicemia em relação ao grupo controle (29), esses achados também foram encontrados em nossos resultados.

Dentre os mecanismos envolvidos na regulação da OCN Ferron et al. (2010), identificaram que a proteína OST-PTP desfosforilam os receptores de insulina nos osteoblastos, sendo esses responsáveis pelo aumentam na expressão de OCN, isso justifica o fenótipo oposto entre camundongos com deleção genética dos genes que codificam *Esp* e a OCN (90). A inativação do gene *Esp* resultou em um aumento na sinalização de insulina e aumento na ativação dos osteoclastos, em reposta, há uma promoção de ambiente ácido, favorecendo assim a descarboxilação da OCN e aumento de ucOCN na circulação. Esses mecanismos demonstram que a relação entre receptores de insulina e OST-PTP regulam tanto a produção como a biodisponibilidade da OCN, além do aumento na proliferação e diferenciação dos osteoclastos (90,91).

A ucOCN tem como receptor a proteína *Gprc6a*, pertencente à família C de *Gpcrs*, que é amplamente expressa em vários órgãos. Nossos resultados mostraram que o receptor *Gprc6a* é expresso no tecido ósseo e no rim, indo em concordância com outros estudos dos quais mostraram a expressão *Gprc6a* em células MC3T3-E1, pré-osteoblastos em ratos, e em células renais de camundongos (92–94). Na literatura, não encontramos estudos que evidenciassem a expressão de *Gprc6a* em rim de ratos, sendo esse um achado importante para embasar próximos estudos com esse modelo animal. Dentre outros achados bibliográficos que elucidam a importância desse receptor, estudos mostraram que camundongos KO para *Gprc6a* apresentam distúrbios metabólicos importantes como a hiperglicemia, diminuição de insulina sérica, diminuição na massa de ilhotas pancreáticas, resistência à insulina, esteatose hepática e osteopenia, reforçando a ligação osso-pâncreas, assim como osso e

metabolismo energético (94–96). Em outro estudo, *in vitro*, com ilhotas pancreáticas normais e deficientes para *Gprc6a* submetidas ao cultivo com OCN recombinante, os resultados mostraram que o acréscimo de OCN aumentou a expressão de insulina nas ilhotas do grupo controle, já as ilhotas pancreáticas deficientes para *Gprc6a* não apresentaram resposta ao estímulo (46).

A comunicação metabólica entre os órgãos é complexa e profundamente modificada na DM, foi demonstrado até o momento como a comunicação entre o osso-rim é regulada por meio da OCN e o seu receptor *Gprc6a*. A relação osso-rim na DM também é vista por meio da DRC-DMO, secundária à presença da ND, com apresentações mais graves relacionadas a TFG (97). A DRC-DMO é decorrente da combinação de alterações metabólicas envolvendo cálcio, fósforo, hormônios da paratireóide e vitamina D, além da osteodistrofia renal que é caracterizado por alterações na morfologia óssea envolvendo a formação e remodelação óssea (98,99). Para o diagnóstico da osteodistrofia renal, biomarcadores ósseos como a OCN vem sendo estudados para correlação. Entretanto, os estudos para a avaliação da OCN em disfunções ósseas relacionado à ND são em sua maioria transversais, carecendo de estudo laboratoriais experimentais com enfoque em avaliações moleculares (61,62,100). Além da associação com alterações ósseas, estudos relacionaram a diminuição da OCN com aumento na incidência de ND em pacientes com DM (62). Em nosso estudo, demonstramos que a hiperglicemia levou à diminuição na expressão da OCN no rim e aumento da expressão no osso. Associado a esse dado, apesar de ter sido observada uma tendência à redução do metabolismo da glicose nos rins, não houve confirmação desse dado pela análise estatística. É provável que o aumento do N experimental poderá evidenciar esse achado e, dessa forma, essa investigação segue como objetivo de nosso grupo de pesquisa.

Verificamos, também, que no rim o receptor *Gprc6a* é hiperexpresso em relação ao osso e a hiperglicemia levou à regulação positiva dessa expressão. Logo, sugerimos que o rim possa não apenas ser um órgão alvo para a OCN, como, a DM possa resultar em alterações na comunicação osso-rim por meio do receptor *Gprc6a*.

Apesar do risco aumentado para complicações renais em indivíduos com DM, a prevalência da ND em indivíduos com DM1 é de cerca de 33% e na DM2 de 50%, ou seja, uma parte considerável dos pacientes diagnósticos com DM não iram evoluir para ND. Até mesmo o aumento da HbA1 isolada não é um preditor definitivo para o desenvolvimento da ND (101,102). Diante disso, outros mecanismos como

metabólicos e epigenéticos, investigados no presente estudo, podem subsidiar outros estudos na identificação de fatores que justifique os diferentes desfechos clínicos apresentados por pacientes com DM.

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais caracterizados por sua capacidade em regular os fatores de transcrição, possibilitando a ativação ou silenciamento gênico (71). Estudos epigenéticos têm demonstrado que a hiperglicemia altera a metilação de células endoteliais vasculares ativando vias pró-inflamatórias aumentando assim o risco de complicações, como a ND (103). Takeshi et al. (2015), demonstrou que a hiperglicemia levou a metilação aberrante na região de túbulos proximais em regiões gênicas, dentre outras, responsáveis pelo transporte da glicose, esse estudo demonstrou ainda uma resistência no perfil epigenético á despeito do uso do antidiabético pioglitazona (104). Uma meta-análise realizada por Smyth et al. (2022) identificou 32 ilhas CpGs diferentemente metiladas em pacientes com DM1 associados à ND, nesse mesmo sentido outros estudos também têm relacionado a metilação específica de regiões gênicas com a presença ou aumento no risco para desenvolvimento da ND (105–107). Outro achado interessante é a relação da memória metabólica associada ao epigenoma, apontando para a importância de um controle glicêmico logo no início do diagnóstico da DM, podendo ser esse fator determinante para complicações (108).

A fim de aprofundarmos nas alterações envolvidas nesse eixo, investigamos se os mecanismos epigenéticos podiam estar envolvidos nessa comunicação e foi investigada a metilação por meio da expressão das enzimas DNA Metil Transferases (*DNMT'S*) e Ten-Eleven-Translocation (*TET'S*). Na literatura, as principais *Dnmt's* descritas são a *Dnmt1*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*, nas quais os estudos dividem em duas classes, as que são responsáveis por novas regiões metiladas, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*, e a responsável pela manutenção das regiões metiladas, *Dnmt1* (109). A manutenção da metilação ocorre pelo reconhecimento da ligação citosina-fosfato-guanina (CpGs) hemimetilados no processo de replicação do DNA, a *Dnmt1* reconhece o padrão de metilação das fitas parentais (110). No nosso estudo verificamos a expressão das *Dnmt's* no rim e identificamos um aumento na expressão das enzimas *Dnmt1* e *Dnmt3a* no grupo STZ, ou seja, há um estímulo tanto para novas como para manutenção de regiões metiladas. No estudo realizado por Pereira et al. (2023) identificou um resultado diferente do aqui descrito, com diminuição da *Dnmt3a* na região glomerular em modelo de camundongos com DM e obesidade (111)

Investigamos também a expressão das enzimas envolvidas na hipometilação no rim, as *Tet*'s, composta por três membros denominadas *Tet1*, *Tet2* e *Tet3*. Em nosso estudo houve um aumento na expressão em todas no grupo STZ. Nossos resultados se assemelham ao de Cortés et al. (2017), com aumento de *TET1* e *DNMT1* no sangue de pacientes com DM descontrolado comparados com pacientes saudáveis ou com pacientes com DM controlado (112). Silva et al. (2023) verificaram a expressão das mesmas enzimas na mandíbula e fêmur de ratos com DM, mostrando um desequilíbrio na expressão tanto das *Dnmt*'s como nas *Tet*'s, em parte se assemelhando aos nossos resultados (29). O desequilíbrio na expressão das enzimas envolvidas na hiper/hipometilação está associada à mutações, principalmente na presença de cânceres hematológicos. Não podemos descartar também uma possível interação epistática entre as enzimas (113,114). Aqui, apesar de ter sido observado aumento quase global em todas as enzimas estudadas, destacamos uma maior relevância estatística na expressão da *Tet1*, ou seja, uma tendência mais forte à hipometilação. Yan et al. (2019) já haviam demonstrado, tanto em humanos como em ratos, um aumento de *TET*'s no DM (115).

Com o intuito de averiguar a relação entre o grau de metilação e o DM, um estudo realizado por Yuan et al. (2019) identificou um aumento na porcentagem de 5-hmeC (hipometilação) e diminuição de 5-meC (hipermetilação) no sangue de pacientes com DM, constatando ainda que o aumento de 5-hmeC era maior em indivíduos com índices mais elevados de glicemia e na presença de lesões macrovasculares. No mesmo estudo foi realizada a avaliação no sangue de ratos, o resultado se assemelhou ao humano com diminuição de 5-meC e aumento de 5-hmeC (115). Anteriormente, Cortés et al. (2017) analisou o grau de metilação no sangue e no pâncreas de pacientes com DM, com a doença controlada e descontrolada, identificando um aumento de 5-hmeC no pâncreas e aumento 5-meC no sangue do grupo com DM descontrolada, evidenciando grau distinto de metilação na DM em diferentes órgãos ou células analisadas. Outro achado interessante nesse estudo foi a expressão das enzimas *Tet1* e *Dnmt1* do grupo com DM controlado se assemelhar com grupo controle, mostrando o impacto da epigenética no controle da doença (112).

A relevância da epigenética entre a DM e o osso foi demonstrada em um estudo publicado por Silva et al. (2023), no qual avaliou a metilação específica óssea em ratos com hiperglicemia por meio da razão 5-meC/5-hmeC, sendo observada maior porcentagem de hipermetilação no tecido ósseo com influência da

hiperglicemia. Também, em relação ao grau de metilação específica da OCN e do receptor *Gprc6a* no fêmur, observou-se na região gênica da OCN uma porcentagem maior para hipometilação. Esse achado, somado ao aumento na expressão dessa osteocina, pode sugerir uma regulação epigenética. Já em relação ao receptor *Gprc6a*, não houve alteração estatística. Essa análise da metilação específica elucidada com maior profundidade a influência da epigenética nas complicações ósseas associadas à hiperglicemia (29).

Em nosso estudo verificamos, de forma inédita, a metilação específica da OCN e do receptor *Gprc6a* no rim. Nossos dados mostraram que no grupo STZ houve um aumento tanto de 5-meC como de 5-hmeC na região gênica codificadora da OCN e na relação entre ambos, apesar de uma tendência para hipometilação, não encontramos uma relevância estatística. Entretanto, para o receptor *Gprc6a* identificamos um grau de hipermetilação em sua região gênica significativa na razão entre 5-meC/5-hmeC, porém, não conseguimos correlacionar seu grau de metilação com a expressão, visto que identificamos a expressão aumentada no rim. Assim, hipotetizamos um mecanismo compensatório, onde embora haja um aumento da expressão de *Gprc6a*, a regulação epigenética, com hipermetilação, possa em um acompanhamento mais prolongado resultar em diminuição na expressão *Gprc6a* atingindo um equilíbrio na sua expressão.

É importante ressaltar que as complicações renais decorrentes do DM já estão bem estabelecidas na literatura e na prática clínica, entretanto a compreensão dos mecanismos metabólicos e epigenéticos envolvidos na patogênese ainda carecem de estudos. Aqui, revisamos a relação da OCN com o metabolismo energético, e, encontramos poucos estudos que demonstrem sua relação no rim. Ainda, estudos realizados na área da epigenética são recentes, e a peculiaridade da ND também carece por pesquisas. Não descartamos a influência da epigenética na DM associada à expressão da OCN e do receptor *Gprc6a* no rim, entretanto, outros mecanismos epigenéticos devem ser investigados como a alteração de histonas ou outras regiões no mesmo promotor. Assim, concordamos que a investigação de toda a ilha CpG na região gênica codificante da OCN e do receptor *Gprc6a* possa relacionar o grau de metilação com a expressão gênica e síntese protéica, aqui não verificadas. O rim também na sua complexidade, com inúmeros tipos celulares, conclama por especificidade e está em nossos objetivos a investigação *in vitro* de linhagem renais distintas quanto às alterações metabólicas e epigenéticas associadas à OCN em

ambiente hiperglicêmico.

6. CONSIDERAÇÕES

O presente estudo avaliou a regulação epigenética entre o eixo osso-rim sobre a influência da hiperglicemia, identificando:

- Alterações histopatológicas no pâncreas condizentes com a atrofia de ilhotas vista em diabetes.
- Alterações histológicas no rim semelhantes às descritas na ND, com espessamento de membrana basal glomerular e tubular.
- Aumento na expressão da OCN no osso e diminuição da mesma no rim.
- Aumento na expressão de *Gprc6a* tanto no osso como no rim.
- Provável alteração metabólica no tecido renal, indicando aumento do metabolismo de ácidos graxos e diminuição do metabolismo de glicose, condizente com a condição diabetes.
- Desequilíbrio na expressão das enzimas responsáveis pela metilação global.
- Hipermetilação gênica codificante de *Gprc6a* no rim, não correlacionada com o aumento na expressão da proteína no rim e no osso.

7. CONCLUSÃO

Embora tenha sido demonstrado que a hiperglicemia modulou o eixo osso-rim por meio das expressões da OCN e do receptor *Gprc6a*, além de promover um desequilíbrio tanto metabólico quanto das enzimas responsáveis pela metilação, não foi possível fazer a correlação com a metilação específica. Apesar do contraste encontrado em nossos resultados, outros estudos também demonstraram contradições, corroborando o fato de que tanto a epigenética como a observação do osso como tecido endócrino são relativamente recentes e, assim como nos outros estudos, nossos dados são importantes para subsidiar a compreensão da função do eixo osso-rim no diabetes e nas patologias associadas.

REFERÊNCIAS

1. Seshasai SRK, Kaptoge S, Thompson A, Angelantonio E Di, Gao P, Sarwar N, et al. Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *N Engl J Med* [Internet]. 3 de março de 2011 [citado 11 de abril de 2023];364(9):829. Disponível em: /pmc/articles/PMC4109980/
2. Bertoluci MC, Forti AC e, Pititto B de A, Vancea DMM, Malerbi FEK, Valente F, et al. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. 4 de fevereiro de 2022;
3. Cobas R, Rodacki M, Giacaglia L, Calliari LEP, Noronha RM, Valerio C, et al. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. Em: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2022.
4. Rodacki M, Teles M, Gabbay M, Montenegro R, Bertoluci M. Classificação do diabetes. Em: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2022.
5. Zajdenverg L, Façanha CFS, Dualib PM, Golbert A, Moisés ECD, Calderon I de MP, et al. Rastreamento e diagnóstico da hiperglicemia na gestação. Em: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2022.
6. Número de pessoas com diabetes nas Américas mais do que triplica em três décadas, afirma relatório da OPAS - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [citado 11 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/11-11-2022-numero-pessoas-com-diabetes-nas-americas-mais-do-que-triplica-em-tres-decadas>
7. Colberg SR. Nutrition and Exercise Performance in Adults With Type 1 Diabetes. Vol. 44, *Canadian Journal of Diabetes*. Elsevier B.V.; 2020. p. 750–8.
8. Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Vol. 2021, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2021.
9. Yang M, Luo S, Yang J, Chen W, He L, Liu D, et al. Bone-kidney axis: A potential therapeutic target for diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 24 de outubro de 2022 [citado 11 de abril de 2023];13. Disponível em: /pmc/articles/PMC9637707/
10. Xue R, Gui D, Zheng L, Zhai R, Wang F, Wang N. Mechanistic Insight and Management of Diabetic Nephropathy: Recent Progress and Future Perspective. Vol. 2017, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2017.
11. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors -

- PubMed [Internet]. [citado 8 de junho de 2023]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28197499/>
12. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med* [Internet]. 2010 [citado 11 de junho de 2023];27:136–42. Disponível em: http://www3.interscience.wiley.com/author_resources/
 13. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *Em: Journal of Internal Medicine*. 2007. p. 32–43.
 14. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* [Internet]. dezembro de 2005 [citado 11 de junho de 2023];54(12):3427–34. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16306358/>
 15. Mogensen CE. Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamcis during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 1971 [citado 11 de junho de 2023];28(1):101–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5093515/>
 16. Meyer C, Dostou JM, Gerich JE. Role of the human kidney in glucose counterregulation. *Diabetes* [Internet]. 1999 [citado 11 de junho de 2023];48(5):943–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331396/>
 17. Stumvoll M, Chintalapudi U, Perriello G, Welle S, Gutierrez O, Gerich J. Uptake and release of glucose by the human kidney. Postabsorptive rates and responses to epinephrine. *J Clin Invest*. 1º de novembro de 1995;96(5):2528–33.
 18. Cersosimo E, Garlick P, Ferretti J. Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am J Physiol* [Internet]. 1999 [citado 11 de junho de 2023];276(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9886953/>
 19. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 1º de dezembro de 2000 [citado 11 de junho de 2023];2(6):345–50. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1463-1326.2000.00085.x>
 20. Meyer C, Woerle HJ, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE. Abnormal renal, hepatic, and muscle glucose metabolism following glucose ingestion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. dezembro de 2004 [citado 11 de junho de 2023];287(6). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15304374/>

21. KREBS HA, SPEAKE RN, HEMS R. ACCELERATION OF RENAL GLUCONEOGENESIS BY KETONE BODIES AND FATTY ACIDS. *Biochem J* [Internet]. 1965 [citado 11 de junho de 2023];94(3):712–20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14340063/>
22. Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, Dostou J, Mitrakou A, Gerich J. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* [Internet]. 1º de agosto de 1998 [citado 11 de junho de 2023];102(3):619–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9691098/>
23. Tavafi M. Diabetic nephropathy and antioxidants. Vol. 2, *Journal of Nephropathology*. Society of Diabetic Nephropathy Prevention; 2013. p. 20–7.
24. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving HH, et al. Proteinuria and Other Markers of Chronic Kidney Disease: A Position Statement of the National Kidney Foundation (NKF) and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). 2003;
25. Reeves WB, Rawal BB, Abdel-Rahman EM, Awad AS. Therapeutic Modalities in Diabetic Nephropathy: <i>Future Approaches</i> *Open J Nephrol*. 2012;02(02):5–18.
26. Flier JS, Underhill LH, Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiologic Approach to the Etiology of Type I Diabetes Mellitus and Its Complications. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198711263172206> [Internet]. 14 de janeiro de 2010 [citado 8 de junho de 2023];317(22):1390–8. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM198711263172206>
27. Sá JR, Canani LH, Rangel EB, Bauer AC, Escott GM, Zelmanovitz T, et al. Doença renal do diabetes. Em: *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas*; 2022.
28. Hsu CY, Chen LR, Chen KH. Osteoporosis in Patients with Chronic Kidney Diseases: A Systemic Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 6846 [Internet]. 18 de setembro de 2020 [citado 14 de abril de 2023];21(18):6846. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6846/htm>
29. Patricia da Silva E, da Silva Feltran G, Alexandre Alcântara dos Santos S, Cardoso de Oliveira R, Assis RIF, Antônio Justulin Junior L, et al. Hyperglycemic microenvironment compromises the homeostasis of communication between the bone-brain axis by the epigenetic repression of the osteocalcin receptor, Gpr158

- in the hippocampus. *Brain Res.* 15 de março de 2023;1803.
30. Tagliaferri C, Wittrant Y, Davicco MJ, Walrand S, Coxam V. Muscle and bone, two interconnected tissues. Vol. 21, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 55–70.
 31. Kirk B, Feehan J, Lombardi G, Duque G. Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. Vol. 18, *Current Osteoporosis Reports*. Springer; 2020. p. 388–400.
 32. Otani T, Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Takeuchi H, Inai T, Hirata M. The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver. Vol. 78, *Advances in Biological Regulation*. Elsevier Ltd; 2020.
 33. Buck DW, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. Vol. 129, *Plastic and Reconstructive Surgery*. Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p. 1314–20.
 34. Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research* [Internet]. fevereiro de 2011 [citado 14 de abril de 2023];26(2):229. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3179345/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2179345/)
 35. Boyce BF. Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions. *J Dent Res* [Internet]. outubro de 2013 [citado 14 de abril de 2023];92(10):860. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3775372/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2475372/)
 36. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. Vol. 20, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009. p. 230–6.
 37. Fulzele K, Lai F, Dedic C, Saini V, Uda Y, Shi C, et al. Osteocyte-Secreted Wnt Signaling Inhibitor Sclerostin Contributes to Beige Adipogenesis in Peripheral Fat Depots. *J Bone Miner Res* [Internet]. 1º de fevereiro de 2017 [citado 15 de abril de 2023];32(2):373–84. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27653320/>
 38. Mosialou I, Shikhel S, Liu JM, Maurizi A, Luo N, He Z, et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. *Nature* 2017 543:7645 [Internet]. 8 de março de 2017 [citado 15 de abril de 2023];543(7645):385–90. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature21697>
 39. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. outubro de 2000 [citado 15 de abril de 2023];277(2):494–8. Disponível em:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11032749/>
40. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* [Internet]. 10 de agosto de 2007 [citado 15 de abril de 2023];130(3):456–69. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867407007015/fulltext>
 41. Takashi Y, Kawanami D. The Role of Bone-Derived Hormones in Glucose Metabolism, Diabetic Kidney Disease, and Cardiovascular Disorders. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
 42. Kanazawa I. Interaction between bone and glucose metabolism. Vol. 64. 2017.
 43. Kunutsor SK, Apekey TA, Laukkanen JA. Association of serum total osteocalcin with type 2 diabetes and intermediate metabolic phenotypes: systematic review and meta-analysis of observational evidence. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 29 de agosto de 2015 [citado 16 de abril de 2023];30(8):599–614. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26085114/>
 44. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New Insights into the Biology of Osteocalcin. *Bone* [Internet]. 1º de janeiro de 2016 [citado 16 de abril de 2023];82:42. Disponível em: </pmc/articles/PMC4670816/>
 45. Li Y, Gu Z, Wang J, Wang Y, Chen X, Dong B. The Emerging Role of Bone-Derived Hormones in Diabetes Mellitus and Diabetic Kidney Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 11 de julho de 2022 [citado 11 de abril de 2023];13. Disponível em: </pmc/articles/PMC9367194/>
 46. Pi M, Wu Y, Quarles LD. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*. julho de 2011;26(7):1680–3.
 47. Conigrave AD, Hampson DR. Broad-spectrum l-amino acid sensing by class 3 G-protein-coupled receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1º de dezembro de 2006;17(10):398–407.
 48. Conigrave AD, Hampson DR. Broad-spectrum amino acid-sensing class C G-protein coupled receptors: Molecular mechanisms, physiological significance and options for drug development. *Pharmacol Ther*. 1º de setembro de 2010;127(3):252–60.
 49. Clemmensen C, Smajilovic S, Wellendorph P, Bräuner-Osborne H. The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPRC6A) receptor: from cloning to physiological function. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1º de março de 2014 [citado 13 de junho de

- 2023];171(5):1129–41. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.12365>
50. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. Vol. 27, *Diabetic Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 136–42.
 51. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*. 1º de fevereiro de 2012;50(2):568–75.
 52. Mmi A, Sc S, Mohamed M, Abdalla I, Elmu J. Salivary adiponectin concentration in healthy adult males in relation to anthropometric measures and fat distribution. *Endocr Regul*. 2017;51(4):185–92.
 53. Hill HS, Grams J, Walton RG, Liu J, Moellering DR, Garvey WT. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. *Horm Metab Res* [Internet]. 2014 [citado 13 de junho de 2023];46(5):341–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24554534/>
 54. Zhang Y, Zhou P, Kimondo JW. Adiponectin and osteocalcin: relation to insulin sensitivity. *Biochem Cell Biol* [Internet]. outubro de 2012 [citado 13 de junho de 2023];90(5):613–20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22812431/>
 55. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, et al. Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell*. 26 de setembro de 2013;155(1):228–41.
 56. Karsenty G, Oury F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol*. 25 de janeiro de 2014;382(1):521–6.
 57. Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusic AJ, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* [Internet]. abril de 2008 [citado 13 de junho de 2023];57(4):938–44. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18171713/>
 58. Shelev A. Lack of TXNIP protects beta-cells against glucotoxicity. *Biochem Soc Trans* [Internet]. outubro de 2008 [citado 13 de junho de 2023];36(Pt 5):963–5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18793170/>
 59. Carlson N, Mortensen OH, Axelsen M, Pedersen RS, Heaf JG. Clearance of Sclerostin, Osteocalcin, Fibroblast Growth Factor 23, and Osteoprotegerin by Dialysis. *Blood Purif* [Internet]. 20 de junho de 2017 [citado 13 de junho de

- 2023];44(2):122–8. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1159/000465513>
60. Ren H, Ma X, Shao Y, Han J, Yang M, Wang Q. Correlation Between Serum miR-154-5p and Osteocalcin in Males and Postmenopausal Females of Type 2 Diabetes With Different Urinary Albumin Creatinine Ratios. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 6 de agosto de 2019;10:442499.
61. Funakoshi S, Yoshimura K, Hirano S, Ohmi S, Amano E, Fukuda Y, et al. Undercarboxylated osteocalcin correlates with insulin secretion in Japanese individuals with diabetes. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 17 de agosto de 2020 [citado 13 de junho de 2023];12(1):1–6. Disponível em: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13098-020-00579-3>
62. Ye X, Yu R, Jiang F, Hou X, Wei L, Bao Y, et al. Osteocalcin and Risks of Incident Diabetes and Diabetic Kidney Disease: A 4.6-Year Prospective Cohort Study. *Diabetes Care* [Internet]. 1º de abril de 2022 [citado 13 de junho de 2023];45(4):830–6. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2337/dc21-2113>
63. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* [Internet]. março de 2014 [citado 13 de junho de 2023];63(3):1021–31. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24009262/>
64. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1º de abril de 2008 [citado 13 de junho de 2023];105(13):5266–70. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18362359/>
65. Mizokami A, Yasutake Y, Gao J, Matsuda M, Takahashi I, Takeuchi H, et al. Osteocalcin Induces Release of Glucagon-Like Peptide-1 and Thereby Stimulates Insulin Secretion in Mice. *PLoS One*. 20 de fevereiro de 2013;8(2).
66. Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. Vol. 18, *Pediatric Diabetes*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 167–77.
67. Lien YC, Pinney SE, Lu XM, Simmons RA. Identification of Novel Regulatory Regions Induced by Intrauterine Growth Restriction in Rat Islets. *Endocrinology* [Internet]. 1º de fevereiro de 2022 [citado 20 de novembro de 2024];163(2). Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1210/endocr/bqab251>
68. Park J, Stoffers D, ... RNTJ of clinical, 2008 undefined. O desenvolvimento de diabetes tipo 2 após retardo do crescimento intrauterino em ratos está associado

- ao silenciamento epigenético progressivo de Pdx1. *Am Soc Clin Investig* Park, DA Stoffers, RD Nicholls, RA Simmons *O Jornal de investigação clínica*, 2008 • *Am Soc Clin Investig* [Internet]. [citado 20 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/33655>
69. Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, Ackers-Johnson M, Uribe-Lewis S, Ito Y, et al. Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de março de 2011;108(13):5449–54.
 70. Brennan EP, Ehrich M, Brazil DP, Crean JK, Murphy M, Sadlier DM, et al. DNA methylation profiling in cell models of diabetic nephropathy. *Epigenetics*. 2010;5(5):396–401.
 71. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 2013 14:3 [Internet]. 12 de fevereiro de 2013 [citado 13 de junho de 2023];14(3):204–20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg3354>
 72. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. Vol. 99, *Cell*. 1999.
 73. Remor AP, José De Matos F, Ghisoni K, Lenoir Da Silva T, Eidt G, Búrigo M, et al. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. 2011;
 74. Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, et al. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res* [Internet]. março de 2012 [citado 4 de dezembro de 2024];22(3):467–77. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22106369/>
 75. Banday MZ, Sameer AS, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: An overview. 2020 [citado 22 de outubro de 2024]; Disponível em: www.avicennajmed.com
 76. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 1º de setembro de 2015 [citado 22 de outubro de 2024];70(1):5.47.1-5.47.20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26331889/>
 77. Rodacki M, Cobas RA, Zajdenverg L, Silva Júnior WS da, Giacaglia L, Calliari LE, et al. Diagnóstico de diabetes mellitus. *Diretriz da Sociedade Brasileira de*

- Diabetes. 2024;
78. Weir GC, Bonner-Weir S. Five Stages of Evolving-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes. 2004 [citado 24 de outubro de 2024]; Disponível em: http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/53/suppl_3/S16/379624/zdb11204000s16.pdf
 79. De Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal Trends in the Prevalence of Diabetic Kidney Disease in the United States. *JAMA* [Internet]. 2011 [citado 23 de outubro de 2024];305(24):2532–9. Disponível em: <http://www.jama.com>.
 80. Fiorentino M, Bolignano D, Tesar V, Pisano A, Van Biesen W, Tripepi G, et al. Renal biopsy in patients with diabetes: a pooled meta-analysis of 48 studies. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2017 [citado 23 de outubro de 2024];32:97–110. Disponível em: <https://academic.oup.com/ndt/article/32/1/97/2931151>
 81. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, TerenceCook H, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2010 [citado 23 de outubro de 2024];21(4):556–63. Disponível em: https://journals.lww.com/jasn/fulltext/2010/04000/pathologic_classification_of_diabetic_nephropathy.7.aspx
 82. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* [Internet]. 15 de setembro de 2002 [citado 30 de outubro de 2024];110(6):771–81. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12235108/>
 83. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, Von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, et al. Osteoblast-specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization*. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2002 [citado 30 de outubro de 2024];277:44005–12. Disponível em: <http://www.jbc.org>
 84. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Serum insulin-like growth factor-I level is associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus.
 85. McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM. Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: Role in osteoblast development. *Acta Diabetol* [Internet]. 2001 [citado

- 30 de outubro de 2024];38(3):113–22. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s005920170007>
86. Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, et al. Growth-Inhibitory Effect of a High Glucose Concentration on Osteoblast-like Cells. *Bone*. 1º de janeiro de 1998;22(1):17–23.
 87. De Araújo IM, Salmon CEG, Nahas AK, Nogueira-Barbosa MH, Elias J, De Paula FJA. Marrow adipose tissue spectrum in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 1º de janeiro de 2017 [citado 29 de outubro de 2024];176(1):21–30. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1530/EJE-16-0448>
 88. Berezovska O, Yildirim G, Budell W, Yagerman S, Pidhaynyy B, Bastien C, et al. Osteocalcin Affects Bone Mineral and Mechanical Properties in Female Mice.
 89. Poundarik AA, Diab T, Sroga GE, Ural A, Boskey AL, Gundberg CM, et al. Dilatational band formation in bone. [citado 31 de outubro de 2024]; Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1201513109
 90. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Fattore A Del, Depinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism.
 91. Fulzele K, Riddle RC, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*. 2010;142(2):309–19.
 92. Ma L, Gong F, Xu J, Yang J. Uncarboxylated osteocalcin reverses the high glucose-induced inhibition of the osteogenic differentiation of MC3T3E1 cells via the GPRC6A/cAMP/PKA/AMPK signaling pathway. *Int J Mol Med*. 29 de março de 2021;47(5).
 93. Kuang D, Yao Y, Lam J, Tsushima RG, Hampson DR. Cloning and characterization of a Family C orphan G-protein coupled receptor. *J Neurochem*. abril de 2005;93(2):383–91.
 94. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin Promotes b-Cell Proliferation During Development and Adulthood Through Gprc6a. *Diabetes*. 2014;63:1021–31.
 95. Pi M, Chen L, Huang MZ, Zhu W, Ringhofer B, Luo J, et al. GPRC6A Null Mice Exhibit Osteopenia, Feminization and Metabolic Syndrome. [citado 2 de novembro de 2024]; Disponível em: www.plosone.org
 96. Pi M, Wu Y, Quarles D. GPRC6A Mediates Responses to Osteocalcin in β -Cells In Vitro and Pancreas In Vivo.

97. Supplements IUKI, 2017 undefined. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease—mineral and bone disorder. ncbi.nlm.nih.gov/GOKCKDMBD UpdateKidney International Supplements, 2017•ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. [citado 4 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6340919/>
98. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, international WGK, 2006 undefined. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Elsevier S Moe, T Drüeke, J Cunningham, W Goodman, K Martin, K Olgaard, S Ott, S Sprague Kidney international, 2006•Elsevier [Internet]. [citado 4 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815514154>
99. Zaimi M, Grapsa E. Current therapeutic approach of chronic kidney disease—mineral and bone disorder. Therapeutic Apheresis and Dialysis. 1º de outubro de 2024;28(5):671–89.
100. Chi P, Shih-Yuan H, Hsiao F, ... HLC, 2022 undefined. Concentração sérica de osteocalcina como biomarcador independente de osteoporose em pacientes com doença renal crônica. search.proquest.com PJ Chi, H Shih-Yuan, FT Hsiao, HH Liou, JP Tsai Nefrologia Clínica, 2022•search.proquest.com [Internet]. [citado 4 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://search.proquest.com/openview/a152b70b7fe2fa156b7171f0ea5ffeec/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2044863>
101. Thomas M, Brownlee M, ... KSN reviews D, 2015 undefined. Diabetic kidney disease. nature.com MC Thomas, M Brownlee, K Susztak, K Sharma, KAM Jandeleit-Dahm, S Zoungas Nature reviews Disease primers, 2015•nature.com [Internet]. [citado 8 de dezembro de 2024]; Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201518>
102. Thomas MC, Weekes AJ, Broadley OJ, Cooper ME, Mathew TH. The burden of chronic kidney disease in Australian patients with type 2 diabetes (the NEFRON study). Med J Aust [Internet]. 7 de agosto de 2006 [citado 8 de dezembro de 2024];185(3):140–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16893353/>
103. Pirola L, Balcerczyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, et al. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of

- primary vascular cells. *Genome Res* [Internet]. 1º de outubro de 2011 [citado 8 de dezembro de 2024];21(10):1601–15. Disponível em: <https://genome.cshlp.org/content/21/10/1601.full>
104. Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, et al. Diabetes induces aberrant DNA methylation in the proximal tubules of the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 1º de outubro de 2015 [citado 8 de dezembro de 2024];26(10):2388–97. Disponível em: https://journals.lww.com/jasn/fulltext/2015/10000/diabetes_induces_aberrant_dna_methylation_in_the.13.aspx
105. Smyth L, Dahlström E, Syreeni A, ... KKN, 2022 undefined. Epigenome-wide meta-analysis identifies DNA methylation biomarkers associated with diabetic kidney disease. *nature.com*LJ Smyth, EH Dahlström, A Syreeni, K Kerr, J Kilner, R Doyle, E Brennan, V Nair, D FerminNature communications, 2022•nature.com [Internet]. [citado 7 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-34963-6>
106. Sandholm N, Dahlström EH, Groop PH. Genetic and epigenetic background of diabetic kidney disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14.
107. Schlosser P, Tin A, Matias-Garcia P, ... CTN, 2021 undefined. Meta-analyses identify DNA methylation associated with kidney function and damage. *nature.com*P Schlosser, A Tin, PR Matias-Garcia, CHL Thio, R Joehanes, H Liu, A Weihs, Z YuNature communications, 2021•nature.com [Internet]. [citado 7 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27234-3>
108. Zhuo C, Feng M, Andrew DP, John ML, Lingxiao Z, Dustin ES, et al. Epigenomic profiling reveals an association between persistence of DNA methylation and metabolic memory in the DCCT/EDIC type 1 diabetes cohort. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 24 de maio de 2016 [citado 7 de novembro de 2024];113(21):E3002–11. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1603712113>
109. Okano M, Bell D, Haber D, Cell EL, 1999 undefined. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *cell.com*M Okano, DW Bell, DA Haber, E LiCell, 1999•cell.com [Internet]. [citado 6 de novembro de 2024]; Disponível em: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(00\)81656-6](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(00)81656-6)

110. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. A DNA-(citosina-C5)-metiltransferase Dnmt1 metila o DNA processivamente com alta preferência por locais-alvo hemimetilados. *Jornal de Química Biológica* [Internet]. 2004 [citado 7 de novembro de 2024]; Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)67977-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)67977-7/fulltext)
111. Veloso Pereira BM, Charleaux de Ponte M, Malavolta Luz AP, Thieme K. DNA methylation enzymes in the kidneys of male and female BTBR ob/ob mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14.
112. Pinzón-Cortés J, ... APCE, 2017 undefined. Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. *ec.bioscientifica.com* [Internet]. [citado 9 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://ec.bioscientifica.com/view/journals/ec/6/8/EC-17-0199.xml>
113. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 16 de dezembro de 2010 [citado 7 de novembro de 2024];363(25):2424–33. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1005143>
114. Zhang X, Su J, Jeong M, Ko M, Huang Y, ... HPN, et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *nature.com*X Zhang, J Su, M Jeong, M Ko, Y Huang, HJ Park, A Guzman, Y Lei, YH Huang, A Rao, W LiNature genetics, 2016•nature.com [Internet]. [citado 7 de novembro de 2024]; Disponível em: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/ng.3610&casa_token=rQPdJboBvV0AAAAA:QQjnbBLVv19d8QgTGpBJo2Wz7MZabozFSasXUJ5hw61zHax5OBQDHqNjjnNAINDVpC25srNg_w6DoHbEhQ
115. Yuan EF, Yang Y, Cheng L, Deng X, Chen SM, Zhou X, et al. Hyperglycemia affects global 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in blood genomic DNA through upregulation of SIRT6 and TETs. *Clin Epigenetics*. 15 de abril de 2019;11(1).

ANEXO 1



Alexandra Latini
Associate Professor
LABOX, Biochemistry Department, Center for Biological Sciences,
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário - Trindade - Bloco C - 2º andar - rooms 201/214
-UF- 88040-900 - Florianópolis - SC - Brazil
E: +55 48 3721.4743
O: a.latini@ufsc.br
www.labox.ufsc.com

TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Venho por meio desta confirmar que o material biológico gerado durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa abaixo detalhado e que não foi utilizado pelo nosso grupo de pesquisa será doado ao Prof. Rodrigo Augusto da Silva da Universidade de Taubaté (SP, Brasil). Saliento que o desenvolvimento deste projeto atendeu aos objetivos propostos e já teve seu relatório realizado e aprovado pela Universidade Federal de Santa Catarina (SC, Brasil).

Projeto Nº: PP00350

Título: Estudo de marcadores de neovascularização e de neurodegeneração em modelo crônico de hiperglicemia induzido pela administração de estreptozotocina.

Coordenador: Alexandra Susana Latini (SIAPE 1567821)

Florianópolis, 3 de agosto de 2021



Alexandra Latini

ANEXO 2



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA EXPRESSÃO EPIGENÉTICA DA OSTEOCALCINA E DO RECEPTOR GPRC6A", protocolada sob o CEUA nº 5060290823 (ID 001017), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva** e equipe; *Caren Ingrid Silva Macedo; Rodrigo Augusto Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 13/09/2023.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE BONE-KIDNEY AXIS HOMEOSTASIS IN A HYPERGLYCEMIC ENVIRONMENT BY THE EPIGENETIC EXPRESSION OF OSTEOCALCIN AND THE GPRC6A RECEPTOR", utilizing 16 Heterogenics rats (16 males), protocol number CEUA 5060290823 (ID 001017), under the responsibility of **Anuska Marcelino Alvares Saraiva** and team; *Caren Ingrid Silva Macedo; Rodrigo Augusto Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 09/13/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2023 a 12/2024 - Área: Patologia Ambiental E Experimental

Origem: Biotério de Experimentação

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

Idade: 7 a 8 semanas

Quantidade: 16

Linhagem: Wistar

Peso: 200 a 300 g

São Paulo, 11 de outubro de 2023

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista



ANEXO 3



Universidade Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v.26/02/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 26/02/2024) da proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA EXPRESSÃO EPIGENÉTICA DA OSTEOCALCINA E DO RECEPTOR GPRC6A", CEUA nº 5060290823 (ID 016602), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva e equipe; Caren Ingrid Silva Macedo; Rodrigo Augusto Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) em 15/03/2024.

Término previsto: 12/2024

Origem: Biotério de Experimentação

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 7 a 8 semanas

Quantidade
mantida: 0

Linhagem: Wistar

Peso: 200 a 300 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Machos	16	0

São Paulo, 21 de maio de 2024

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista



DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS



Certificamos que *Caren Ingrid Silva Macedo* participou do 27º Congresso Brasileiro Multidisciplinar em Diabetes, realizado nos dias 27, 28, 29 e 30 de julho de 2023, em São Paulo, SP, na qualidade de **APRESENTADORA DO TRABALHO ORAL: O Ambiente Hiperglicêmico Modifica Mecanismos Epigenéticos e Altera a Ação da Osteocalcina no Rim.**

São Paulo, 29 de Julho de 2023.


Dr. João Sérgio de Almeida Neto
Presidente
da Comissão Julgadora

Apoios:




Prof. Dr. Fádlo Fraige Filho
PRESIDENTE DO CONGRESSO
Prof. Dr. Fádlo Fraige Filho
Presidente ANAD/FENAD
Prof. Tit. Emérito - FMABC
Presidente Eleito IDF/SACA (2023 - 2024)

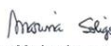
CERTIFICADO



CERTIFICADO

Certificamos que Caren Ingrid Silva Macedo participou do XXIV ENCONTRO CIENTÍFICO da Universidade Paulista - UNIP, no dia 15 de maio de 2024, com a apresentação da pesquisa intitulada "AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE ENTRE O EIXO OSSO-RIM EM UM AMBIENTE HIPERGLICÊMICO POR MEIO DA EXPRESSÃO EPIGENÉTICA DA OSTEOPONTEGONINA E DO RECEPTOR GPRC6A".

São Paulo, maio de 2024.


Profa. Dra. Marina Ancona Lopez Soligo
Vice-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa