

# A interação do receptor P2X<sub>7</sub> com o óxido nítrico medeia a apoptose em células mesangiais imortalizadas de camundongos expostas a níveis elevados de glicose

P2X<sub>7</sub> receptor-nitric oxide interaction mediates apoptosis in mouse immortalized mesangial cells exposed to high glucose

## Autores

Thamires de Oliveira Fernandes<sup>1,3</sup>   
Adelson Marçal Rodrigues<sup>2,3</sup>   
Giovana Rita Punaro<sup>1,3</sup>   
Deyse Yorgos de Lima<sup>1,3</sup>   
Elisa Mieko Suemitsu Higa<sup>1,2,3,4</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo, Divisão de Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de São Paulo, Laboratório de Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal de São Paulo, Divisão de Emergência, São Paulo, SP, Brasil.

Data de submissão: 14/04/2021.

Data de aprovação: 11/08/2021.

Data de publicação: 15/10/2021.

## Correspondência para:

Giovana Rita Punaro.  
E-mail: giovana.punaro@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2021-0086>

## RESUMO

**Introdução:** Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia levando à nefropatia diabética (ND). Mostramos que P2X<sub>7</sub>, um receptor purinérgico, foi altamente expresso na DM; entretanto, quando o estresse oxidativo foi controlado, o NO renal recuperou-se, e a ativação deste receptor permaneceu significativamente reduzida. Este estudo objetivou avaliar a influência do NO no P2X<sub>7</sub> e a apoptose em células mesangiais imortalizadas de camundongos (CMiC) cultivadas em meio de glicose elevada (GE). **Métodos:** CMiCs foram cultivadas em meio DMEM e expostas à glicose normal (GN), manitol (MA), ou GE. A viabilidade celular foi avaliada por contador automático. Sobrenadantes foram coletados para quantificação de NO, e foram extraídas proteínas para análise de NO sintases (iNOS e eNOS), caspase-3, e P2X<sub>7</sub>. **Resultados:** A viabilidade celular permaneceu acima de 90% em todos os grupos. Houve aumento significativo na proliferação de células na GE comparado com MA e GN. NO, iNOS, caspase-3 e P2X<sub>7</sub> foram significativamente aumentados na GE comparados com GN e MA, sem alterações na eNOS. Observamos que houve correlação forte e significativa entre P2X<sub>7</sub> e NO. **Discussão:** O principal achado foi que a produção de NO pela iNOS foi positivamente correlacionada com aumento de P2X<sub>7</sub> em CMs sob condições de GE, mostrando que existe um estímulo comum entre eles e que o NO interage com a via do P2X<sub>7</sub>, contribuindo para apoptose na DM experimental. Estes achados podem ser relevantes para estudos de alvos terapêuticos para a prevenção e/ou tratamento de danos renais induzidos por hiperglicemia para retardar a progressão da ND.

**Descritores:** Células Mesangiais; Glicose; Apoptose; Óxido Nítrico Sintase; Receptor Purinérgico; Óxido Nítrico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease characterized by hyperglycemia that leads to diabetic nephropathy (DN). We showed that P2X<sub>7</sub>, a purinergic receptor, was highly expressed in DM; however, when oxidative stress was controlled, renal NO recovered, and the activation of this receptor remained significantly reduced. The aim of this study was to assess the influence of NO on the P2X<sub>7</sub> and apoptosis in mouse immortalized mesangial cells (MiMC) cultured in high glucose (HG) medium. **Methods:** MiMCs were cultured with DMEM and exposed to normal glucose (NG), mannitol (MA), or HG. Cell viability was assessed by an automated counter. Supernatants were collected for NO quantification, and proteins were extracted for analysis of NO synthases (iNOS and eNOS), caspase-3, and P2X<sub>7</sub>. **Results:** Cell viability remained above 90% in all groups. There was a significant increase in the proliferation of cells in HG compared to MA and NG. NO, iNOS, caspase-3, and P2X<sub>7</sub> were significantly increased in HG compared to NG and MA, with no changes in eNOS. We observed that there was a strong and significant correlation between P2X<sub>7</sub> and NO. **Discussion:** The main finding was that the production of NO by iNOS was positively correlated with the increase of P2X<sub>7</sub> in MCs under HG conditions, showing that there is a common stimulus between them and that NO interacts with the P2X<sub>7</sub> pathway, contributing to apoptosis in experimental DM. These findings could be relevant to studies of therapeutic targets for the prevention and/or treatment of hyperglycemia-induced kidney damage to delay DN progression.

**Keywords:** Mesangial Cells; Glucose; Apoptosis; Nitric Oxide Synthases; Receptors, Purinergic; Nitric Oxide.

## INTRODUÇÃO

A nefropatia diabética (ND) afeta aproximadamente 40% dos pacientes com diabetes e envolve diversas alterações na filtração glomerular e nos mecanismos de reabsorção tubular, bem como alterações morfológicas no tecido renal, resultando em insuficiência renal crônica<sup>1</sup>. Um estudo mostrou que a principal alteração ocorre a nível glomerular, resultando em expansão da matriz extracelular mesangial (MEC), hipertrofia e proliferação de células mesangiais (CMs), desempenhando um papel importante no desenvolvimento da ND<sup>2</sup>. O efeito da insulina sobre as CMs ainda não está claro; a insulina tem um papel essencial no metabolismo da glicose, além de ter outros efeitos controversos, como sua relação com a fibrose<sup>3</sup> e como mantenedora da função da CM<sup>4</sup>.

As CMs têm muitas funções, incluindo o controle da filtração glomerular e a regulação do fluxo sanguíneo dos glomérulos. Elas também podem produzir NO e mediadores inflamatórios, incluindo citocinas<sup>5</sup>. Além disso, as CMs possuem vários receptores para uma ampla variedade de hormônios e fatores de crescimento, desenvolvendo múltiplas funções fisiológicas em glomérulos<sup>6-8</sup>; em condições patológicas, a liberação de diversos fatores no organismo pode desencadear a expressão de outros receptores na CM, incluindo receptores purinérgicos<sup>9</sup>.

Os receptores P2 foram divididos em duas grandes famílias: P2X e P2Y. A família P2X pode ser expressa em todos os organismos e consiste em sete subunidades (P2X1-7). Geralmente atua como um canal de bloqueio de íons, e seus sinais são formados por dois domínios transmembrana separados por um domínio extracelular, com duas extremidades citoplasmáticas (N e C)<sup>10</sup>.

O receptor P2X<sub>7</sub>, ao contrário de outros, precisa de altas concentrações de ATP para ser ativado. A liberação de ATP em muitas células é uma resposta fisiológica ao estresse mecânico, inflamação, hipóxia, ou certos agonistas<sup>10</sup>. A estimulação do receptor P2X<sub>7</sub> resulta na produção de citocinas como a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sua sigla em inglês), assim como na síntese de espécies reativas do oxigênio (ERO)<sup>11</sup>.

O receptor P2X<sub>7</sub> é expresso em níveis baixos no rim em condições normais<sup>12</sup>, mas em um estudo *ex vivo* em nosso laboratório, demonstramos que tal receptor foi altamente expresso em animais diabéticos. Além

disso, quando o estresse oxidativo destes animais foi controlado, houve uma recuperação do NO renal com uma redução significativa na ativação desse receptor<sup>13</sup>, mas não sabíamos se havia alguma relação entre o P2X<sub>7</sub> e o NO.

Considerando que as CMs são as células mais afetadas pela hiperglicemia nos rins, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível interação entre o receptor P2X<sub>7</sub> e a biodisponibilidade de NO em células mesangiais imortalizadas de camundongos em um ambiente que mimetiza a diabetes mellitus.

## MATERIAL E MÉTODOS

### CULTURA DE CÉLULAS MESANGIAIS

A CMiC comprada da *American Type Culture Collection* (ATCC - CRL 1927) foi fornecida pela Divisão de Nefrologia - Universidade Federal de São Paulo. (UNIFESP, SP, Brasil). As células foram cultivadas e mantidas em um ambiente umidificado com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e F12 (3:1) (Vitrocell, São Paulo, Brasil) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB). O meio foi substituído a cada 48 h. Todos os experimentos foram realizados com células entre a 11<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> passagens. O tempo ideal (72 h) para o tratamento em nosso estudo foi determinado de acordo com a curva do tempo de resposta de produção de NO de CMiC expostas à GE, considerando que, nesse período, houve maior biodisponibilidade de NO. Estudos recentes têm usado uma dose de 30 mM de glicose para reproduzir a DM<sup>14</sup>. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, sob o número 7215080115.

As células foram cultivadas em meio com 1% de SFB a aproximadamente 50% de semiconfluência, que é a densidade celular ideal para evitar o supercrescimento, enquanto permite um aumento na qualidade celular e evita qualquer estresse ou produção de agentes deletérios que possam afetar o experimento. Os grupos experimentais foram: GN, que foi cultivada em meio DMEM contendo uma concentração padrão de 5,5 mM de D-glicose; GE, cultivada em meio DMEM contendo D-glicose a uma concentração final de 30 mM; e o controle de osmolaridade, que foi cultivado em meio DMEM suplementado com MA a uma concentração final de 30 mM.

## VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

As CMiCs foram cultivadas com 5% de SFB em placas de 12 poços a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL por poço. Na semiconfluência (50%), as células foram expostas a um meio contendo 1% de SFB em condições de GN, MA ou GE. Em seguida, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 1 mL em meio fresco. A viabilidade celular foi avaliada usando o azul de tripan (0,4%)<sup>15</sup>. As células foram contadas utilizando um contador automático de células (*Countess, Invitrogen, Carlstadt, EUA*).

## DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

As placas de 12 poços com uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL de CMiC por poço foram tratadas de acordo com seus respectivos grupos. Após o tratamento, o sobrenadante foi coletado e armazenado em um freezer a  $-20^\circ\text{C}$ . Os níveis de NO no sobrenadante foram medidos por quimioluminescência usando o Analisador de Óxido Nítrico (NOA 280, *Sievers Instruments Inc, CO, EUA*), que é um detector de alta sensibilidade para medir NO ( $\sim 1$  pmol) com base na reação quimioluminescente em fase gasosa entre o NO e o ozônio<sup>13</sup>. A amostra é injetada no equipamento, e por meio de uma reação com cloreto de vanádio, os metabólitos estáveis nitrito e nitrato são reconvertidos em NO, que é então medido. Esta técnica é considerada o padrão ouro para análise de NO. Os valores foram corrigidos pela concentração de proteína usando o ensaio de proteína do ácido bicinonínico (BCA, por sua sigla em inglês) (*Sigma-Aldrich Chemical CO, MO, EUA*).

## ANÁLISE DE PROTEÍNAS

As células foram cultivadas em placas de Petri a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e tratadas com GN, GE ou MA. Em seguida foram lisadas com tampão RIPA contendo 50 mM de tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0,25% de ácido desoxicólico, 1% de nonidet P-40, 0,1% de SDS, 1 mM de EDTA e inibidor de protease (Millipore, São Paulo, Brasil). A proteína foi concentrada com ultrafiltro de 0,5 mL, com tamanho de poro ou limite de peso molecular nominal de 50 kDa (Millipore, São Paulo, Brasil), e determinada por ensaio de proteína BCA (*Sigma-Aldrich Chemical CO, MO, EUA*). Um total de 40  $\mu\text{g}$  de concentrado proteico foi aplicado a um gel de poli-acrilamida a 10% e transferido para uma membrana de nitrocelulose. A ligação não específica foi bloqueada com 10% de leite em pó desnatado em um tampão TBS-T de pH 7,5 seguido por lavagem no

mesmo tampão à temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas durante a noite a  $4^\circ\text{C}$  com anticorpos primários e secundários contra eNOS (1:200 e 1:1000), iNOS (1:200 e 1:1000), caspase-3 (1:500 e 1:5000), P2X<sub>7</sub> (1:1000 e 1:2000), e actina (1:5000 e 1:10000) (*Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA*). As bandas de proteína específicas foram visualizadas usando o substrato HRP quimioluminescente *Immobilon Western* (Millipore Corporation MA, EUA), e a análise foi realizada usando o software ImageJ (*US National Institutes of Health, MD, EUA*).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média e erro padrão da mediana (EPM). As diferenças entre os três grupos foram examinadas quanto à significância estatística usando a análise de variância unilateral (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls para dados paramétricos (NO, células viáveis e totais, iNOS, eNOS e caspase-3) ou Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn para dados não paramétricos (células mortas e P2X<sub>7</sub>). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . A correlação entre P2X<sub>7</sub> e NO foi analisada pelo teste de Pearson. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software Inc., EUA*).

## RESULTADOS

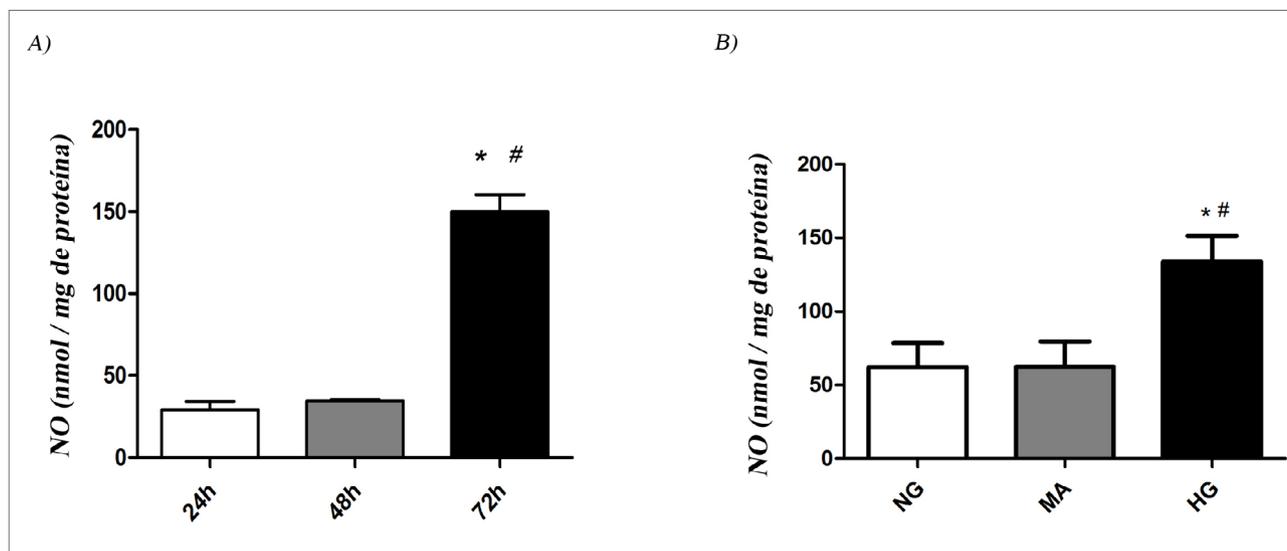
### VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR E PRODUÇÃO DE NO

O tempo escolhido para tratamento de GE foi de 72 h, pois neste momento, ocorreu a produção mais alta de NO ( $150,2 \pm 10,2$ ) em comparação com 24 ou 48 h ( $29,2 \pm 4,9$  e  $34,6 \pm 0,7$ , respectivamente;  $p < 0,0001$ ). A produção de NO foi maior após 72 h ( $133,7 \pm 17,6$ ) de tratamento com GE em comparação com 24 h ( $62,4 \pm 17$ ) ou 48 h ( $62,2 \pm 16,1$ ),  $p < 0,05$ , Figura 1.

Após 72 h de tratamento com GE, o número de células viáveis, não viáveis e totais aumentou significativamente em comparação com os grupos GN ou MA, e a porcentagem de células viáveis em cada grupo foi de aproximadamente 94-96% (Tabela 1).

### ANÁLISE DE NOS

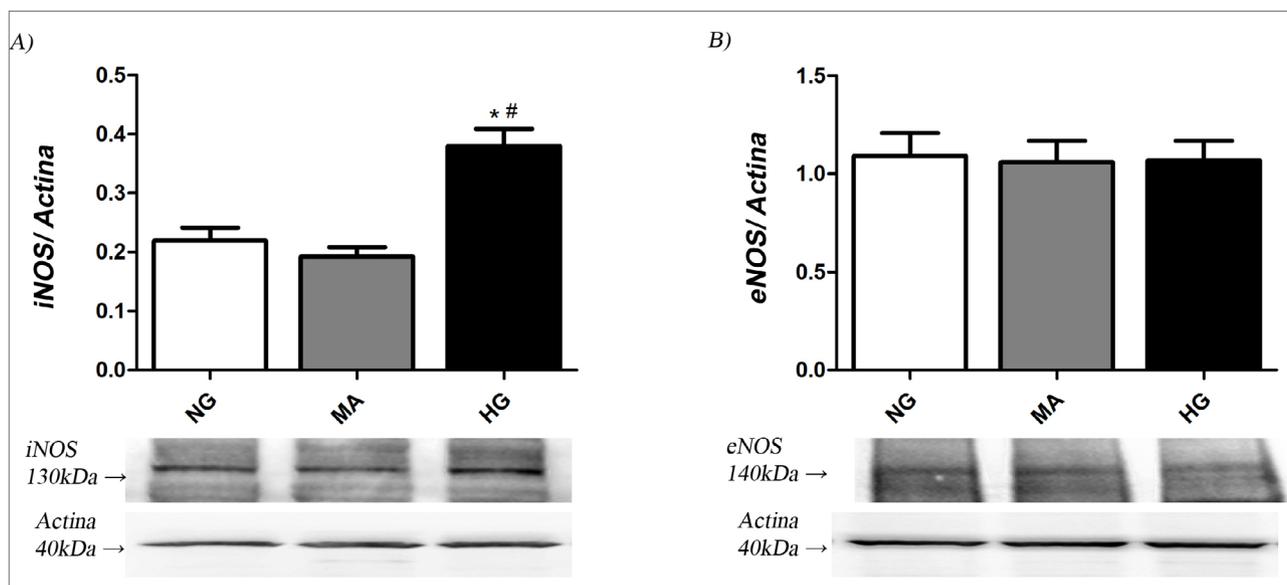
A iNOS em CMiC após 72 h foi significativamente maior em GE ( $0,38 \pm 0,02$ ) do que em GN ou MA ( $0,22 \pm 0,02$ ;  $0,19 \pm 0,01$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ) (Figura 2A). A eNOS não mostrou diferença entre grupos no mesmo período (Figura 2B).



**Figura 1.** Tempo de resposta de produção de NO após 24, 48 ou 72 h de incubação de CMiC em GE e biodisponibilidade de NO de CMiC após 72 h em meio de GN, MA ou GE. NO: óxido nítrico; GN: glicose normal (5,5 mM); MA: manitol (30 mM); GE: glicose elevada (30 mM). CMiC: célula mesangial imortalizada de camundongos. Os valores são expressos como média e EPM. n=5-7 por grupo. ANOVA unilateral com pós-teste de Newman-Keuls; p<0,05: <sup>\*</sup>vs 24h; <sup>‡</sup>vs 48h; <sup>\*</sup>vs GN; <sup>#</sup>vs MA.

**TABELA 1** VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CMiC NOS GRUPOS GN, MA E GE APÓS 72H

	GN	MA	GE
Viáveis (10 <sup>6</sup> células/mL)	1,40 ± 0,8	1,20 ± 0,1	2,30 ± 0,1 <sup>*#</sup>
Mortas (10 <sup>6</sup> células/mL)	0,06 ± 1,0	0,06 ± 1,0	0,13 ± 0,9 <sup>*#</sup>
Total (10 <sup>6</sup> células/mL)	1,46 ± 0,1	1,26 ± 0,1	2,43 ± 0,1 <sup>*#</sup>
Células viáveis (%)	96	95	95

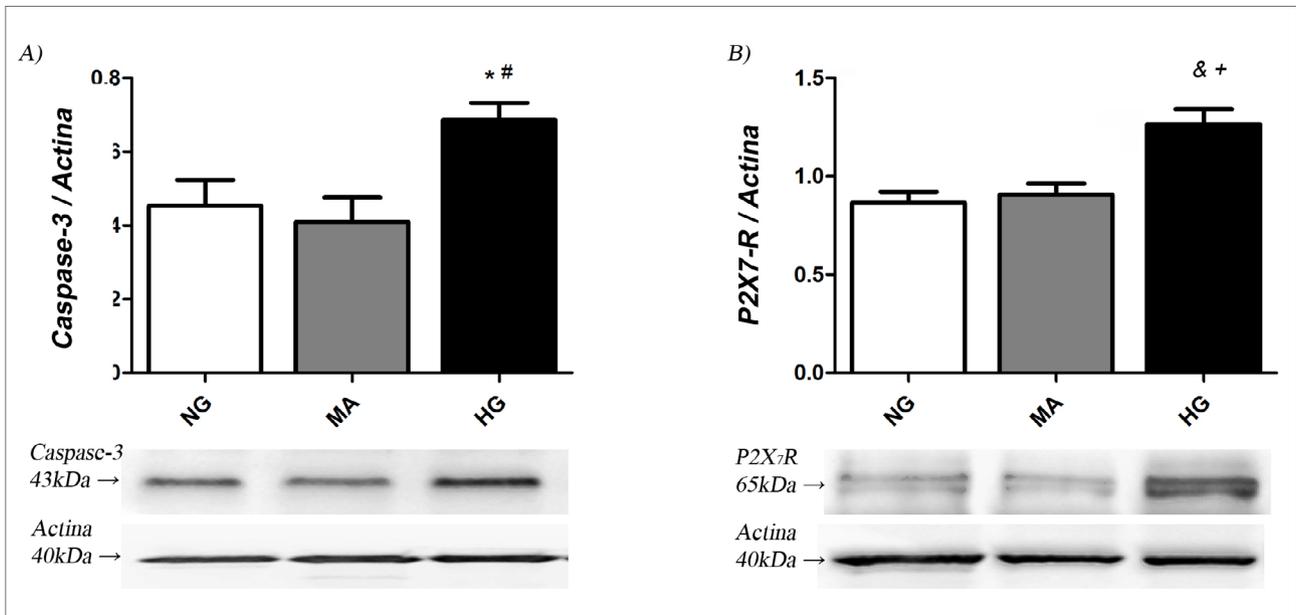


**Figura 2.** A) iNOS e B) eNOS após 72 h em condições de GE. iNOS: óxido nítrico sintase induzida; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; GN: glicose normal (5,5 mM); MA: manitol (30 mM); GE: glicose elevada (30 mM), n=12 por grupo. ANOVA unilateral com pós-teste de Newman-Keuls; p<0,05: <sup>\*</sup>vs GN; <sup>#</sup>vs MA.

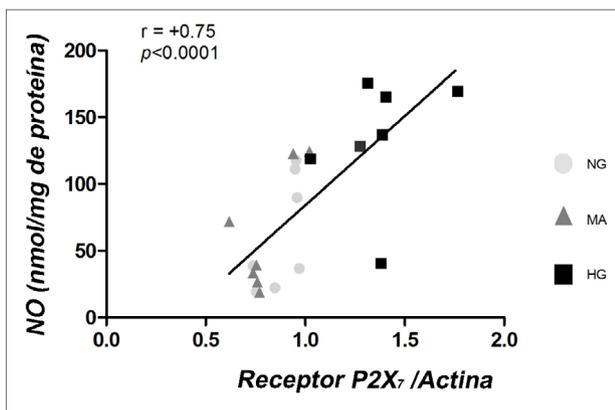
**ANÁLISE DE CASPASE-3 E DO RECEPTOR P2X<sub>7</sub> EM CMiC**

O conteúdo de proteína da caspase-3, um preditor de apoptose, estava aumentado no grupo GE após 72 h (0,68 ± 0,04), em comparação com os grupos GN ou MA (0,45 ± 0,07; 0,41 ± 0,06, respectivamente;

p<0,05), como mostrado na figura Figura 3A. O receptor P2X<sub>7</sub> aumentou significativamente no grupo GE após 72 h de tratamento (1,26 ± 0,07) comparado com os outros grupos, GN (0,87 ± 0,05) e MA (0,90 ± 0,05), Figura 3B.



**Figura 3.** Caspase-3 e B) P2X<sub>7</sub>R após 72 h em condições de GE. GN: glicose normal (5,5 mM); MA: manitol (30 mM); GE: glicose elevada (30 mM), n=12 por grupo. ANOVA unilateral com pós-teste de Newman-Keuls ou Teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn; p<0,05: \*vs GN; #vs MA.



**Figura 4.** Correlação entre o receptor P2X<sub>7</sub> e o NO em CMiC após 72 h em condições de GE. GN: glicose normal (5,5 mM); MA: manitol (30 mM); GE: glicose elevada (30 mM), n=7 por grupo. Teste de Pearson, coeficiente  $r = 0,75$ ,  $p < 0,0001$ .

#### RECEPTOR P2X<sub>7</sub> E CORRELAÇÃO DE NO

Foi encontrada uma correlação significativa, forte e positiva entre o receptor P2X<sub>7</sub> e os níveis de NO em todos os grupos ( $p < 0,0001$ ;  $r = +0,75$ ), como mostrado na Figura 4.

#### DISCUSSÃO

No presente estudo, a CMiC mostrou maior proliferação e mortalidade quando tratada com GE em comparação com células expostas à GN; acreditamos que a morte celular foi devida à apoptose, uma vez que a caspase-3 estava elevada neste grupo. No entanto, essas alterações não afetaram a viabilidade dessas células. No grupo GE, também foi observado um aumento no receptor P2X<sub>7</sub> e na isoforma iNOS.

Um dos principais achados de nosso estudo foi que o aumento do receptor P2X<sub>7</sub> estava fortemente correlacionado com a biodisponibilidade de NO em células cultivadas com GE. Suspeitamos que este aumento no NO foi devido à iNOS, já que não houve diferença na eNOS entre os grupos. O achado é importante porque pode explicar um dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz um aumento no receptor P2X<sub>7</sub>. Ao mesmo tempo, causaria um desequilíbrio do sistema nitrosativo/oxidativo, devido à combinação de NO com o ânion superóxido, levando à produção de peroxinitrito, um potente agente citotóxico<sup>16</sup>, resultando em maior dano glomerular durante a progressão da DM.

Vários estudos têm demonstrado que a GE pode estimular a proliferação de CM por diversos mecanismos, incluindo o acúmulo de ERO<sup>17,18</sup>. Um estudo recente mostrou que a proliferação de CM e a produção intensa de MEC são fatores-chave no desenvolvimento de ND<sup>19</sup>. Este estudo corrobora parcialmente nossos dados, já que as células tratadas em meio de glicose elevada apresentaram proliferação intensa.

As CMs têm várias funções sob condições fisiológicas, tais como moderação da síntese de MEC, endocitose, hemodinâmica glomerular, permeabilidade<sup>20</sup>, e síntese de NO<sup>21</sup>. A exposição dessas células ao meio de GE promove o aparecimento de estresse oxidativo e, consequentemente, um aumento na produção de NO via iNOS por meio da ativação da via PI3K / Akt<sup>22,23</sup>.

Estes achados são consistentes com nosso estudo na medida em que encontramos um aumento na síntese de iNOS, e colocamos a hipótese de que este é um fator crítico para o aumento na produção de NO, uma vez que a outra isoforma em estudo, eNOS, não mostrou diferença entre os grupos. A isoforma endotelial de NO sintase tem um papel importante na manutenção hemodinâmica sistêmica e renal<sup>24,25</sup>.

Solini et al. (2005)<sup>26</sup> mostraram que CMs expostas à glicose elevada aumentaram a produção de ATP em relação às células normais tratadas com glicose. Outro estudo demonstrou que a liberação de ATP pela ativação de PI3K, Rho quinase, ou aumento da concentração de cálcio é comum em meio com GE e ocorre em diferentes tipos de células<sup>27</sup>. Os eventos que resultam no aumento da concentração de ATP extracelular podem levar a uma cascata de ações como a estimulação da sinalização purinérgica<sup>28</sup>. Estudos anteriores de Vonend et al. (2004)<sup>12</sup> mostraram que o receptor P2X<sub>7</sub> em CMs é produzido a níveis baixos sob condições normais, mas em um ambiente inflamatório, sua síntese aumenta e requer grandes quantidades e estimulação contínua de ATP extracelular para sua produção<sup>29,30</sup>. Estes dados estão de acordo com nosso estudo, já que o receptor P2X<sub>7</sub> foi aumentado significativamente em CMs após 72 h de exposição a meio de GE.

O P2X<sub>7</sub> é um receptor de morte celular envolvido em apoptose e necrose, levando à formação de poros e ruptura da membrana plasmática<sup>31</sup>. Entretanto, alguns autores demonstraram que este receptor também participa da proliferação de células linfóides<sup>32</sup>, micróglia<sup>33</sup> e células glomerulares, incluindo as CMs<sup>12</sup>. Portanto, em nosso estudo, acreditamos que este receptor desempenhe um papel importante na proliferação e apoptose de células expostas a níveis elevados de glicose.

O P2X<sub>7</sub> também pode participar na produção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente IL-1 $\beta$ , IL-18, e TNF- $\alpha$ , o que pode resultar na ativação de iNOS e aumento da produção de ânion superóxido e níveis de NO<sup>11,34,35</sup>. Desde 1996, Park et al.<sup>36</sup> já haviam demonstrado que existia uma relação entre o aumento da concentração de cálcio intracelular e a expressão de iNOS, e essa interação ocorre pela ativação de receptores purinérgicos através de ATP em diferentes tipos de células<sup>37,38</sup>. Estes estudos corroboram nossos achados uma vez que a iNOS foi aumentada no grupo GE, o que provavelmente foi devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias mediada pelo receptor P2X<sub>7</sub>.

Em nossa pesquisa, mostramos que a expressão do receptor P2X<sub>7</sub> estava significativa e fortemente associada ao aumento dos níveis de NO nas células tratadas com GE, provavelmente devido ao aumento da produção de iNOS. Sabe-se que tanto a expressão da iNOS como a do P2X<sub>7</sub> são dependentes de agentes inflamatórios<sup>39,40</sup>, o que indica que existe uma lacuna a este respeito, e são necessários mais estudos para uma melhor caracterização e compreensão do perfil inflamatório de CMs em condições de GE, mas acreditamos que ambas têm um gatilho comum, além da estimulação por hiperglicemia.

Estes resultados podem levar a uma melhor compreensão de como a GE afeta as CMs e pode induzir a um alto índice de mortalidade, como foi demonstrado no presente estudo. Com a GE, há uma redução de algumas funções, que podem ser os elementos-chave para a progressão da ND. Assim, o receptor P2X<sub>7</sub> tornou-se um importante protagonista em terapias para doenças com altos níveis de estresse oxidativo e morte celular, como a ND. Um modelo de rato diabético mostrou que a inativação do P2X<sub>7</sub> por seu antagonista melhorou a lesão renal por meio da redução de macrófagos pró-inflamatórios<sup>41</sup>.

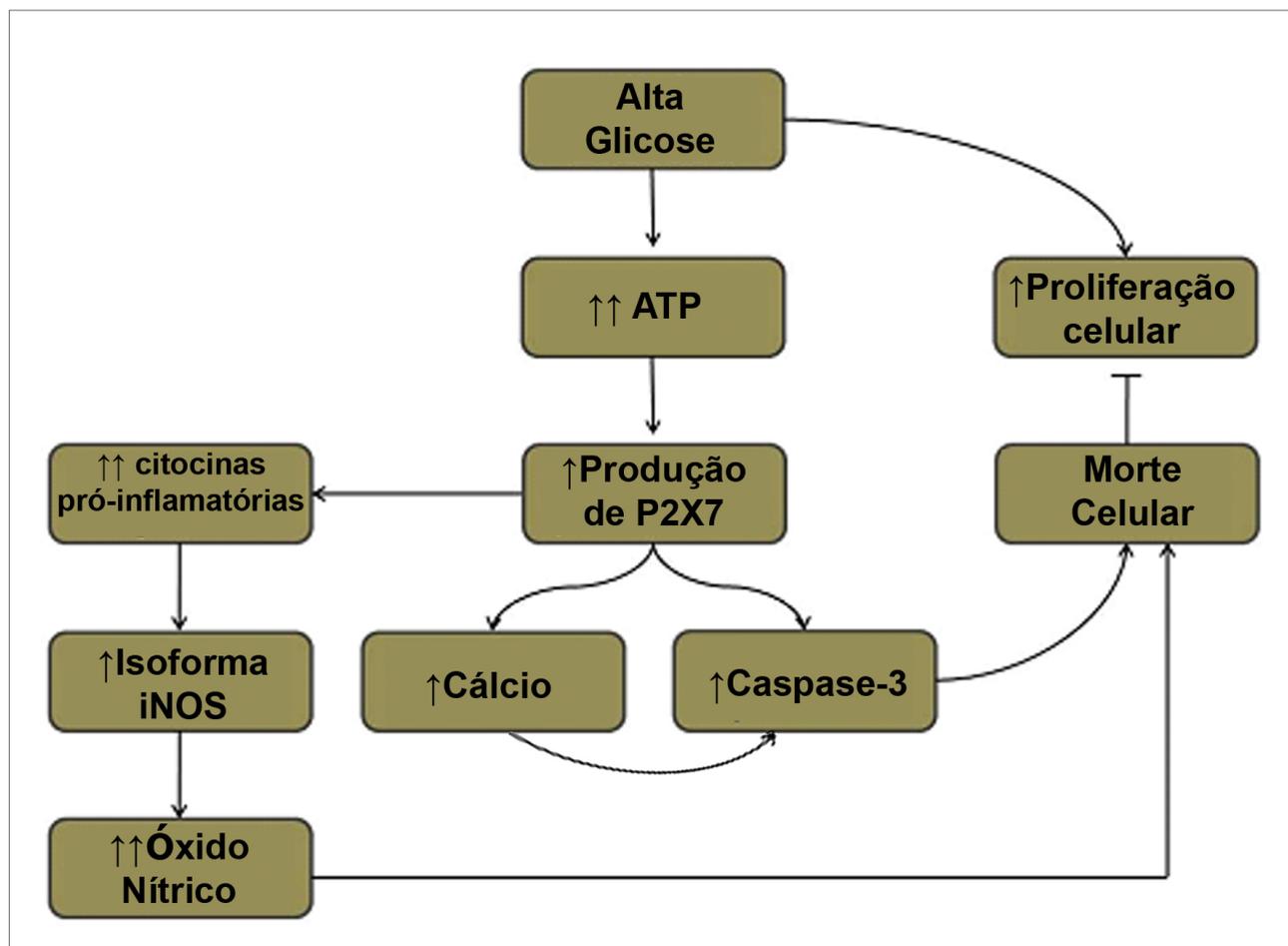
Um estudo realizado em nossa equipe mostrou que o receptor P2X<sub>7</sub> estava associado ao desequilíbrio redox em resposta ao controle do estresse oxidativo. Mais tarde mostramos que o P2X<sub>7</sub> foi expresso em pequenas quantidades durante as semanas de diabetes e teve um pico de expressão na 6<sup>a</sup> semana, resultando em alta peroxidação lipídica e níveis reduzidos de NO no rim<sup>42</sup>. Os achados deste estudo corroboram a fase inicial do estudo supracitado, em que os níveis ligeiramente elevados de P2X<sub>7</sub> foram acompanhados por níveis mais elevados de NO renal nesses rins diabéticos, visto que o tempo de incubação de CM em meio de GE foi de 72 h, ou seja, menos de uma semana de DM.

O silenciamento do receptor P2X<sub>7</sub> demonstrou seu efeito deletério renal, pois sua baixa expressão melhorou a função renal e equilibrou perfis oxidativos e nitrosativos, demonstrando que a inibição do P2X<sub>7</sub> pode beneficiar os rins e retardar a progressão da ND<sup>43</sup>. Além disso, descobrimos que a entrada de cálcio pelo P2X<sub>7</sub> era intensa quando não havia terapia adjuvante para DM. Altos níveis de cálcio livre no citoplasma acionam mecanismos apoptóticos manifestados por estresse mitocondrial, liberação de citocromo C, e formação de caspase 3, demonstrando que o P2X<sub>7</sub> eleva consideravelmente

o cálcio intracelular<sup>43</sup>. Também observou-se que a ausência parcial de P2X<sub>7</sub> modula o sistema renina-angiotensina e aumenta os níveis de NO<sup>44</sup>.

As limitações de nosso estudo foram a falta de marcadores de estresse nitrosativos, como análises de 3-nitrotirosina ou peroxinitrito, avaliação de outros elementos da cascata apoptótica, e medição dos níveis de cálcio.

Para resumir nossos achados, apresentamos a forma como acreditamos que funciona o mecanismo hipotético pelo qual a GE inicialmente leva a um aumento na produção de P2X<sub>7</sub>, desencadeando uma cascata de eventos e resultando em proliferação de CM e/ou apoptose (organograma Figura 5).



**Figura 5.** Organograma - O esquema mostra como a glicose elevada provavelmente age sobre as células mesangiais. ATP - adenosina trifosfato; iNOS - óxido nítrico sintase induzida; ↑ - aumento.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Margaret G Mouro pela assistência técnica. Este estudo foi apoiado por “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, “Fundação de Apoio à Pesquisa da UNIFESP (FAP)” e “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP”. (Número do subsídio 2011/12578-1).

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

TOF conduziu a pesquisa, analisou os dados e redigiu o manuscrito. AMR auxiliou no manuseio de animais

e técnicas de laboratório. GRP auxiliou nas técnicas do estudo animal, conduziu a interpretação dos resultados e revisou o manuscrito. DYL auxiliou na interpretação dos dados e na revisão do manuscrito. EMSH supervisionou o estudo e revisou o manuscrito.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Lim AKH. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014;7:361-81.
2. Zhang R, Li J, Huang T, Wang X. Danggui buxue tang suppresses high glucose-induced proliferation and extracellular

- matrix accumulation of mesangial cells via inhibiting lncRNA PVT1. *Am J Transl Res.* 2017;9(8):3732-40.
3. Yano N, Suzuki D, Endoh M, Zhang W, Xu YC, Padbuty JF, et al. In vitro silencing of the insulin receptor attenuates cellular accumulation of fibronectin in renal mesangial cells. *Cell Commun Signal.* 2012 Oct;10(1):29.
  4. Kong YL, Shen Y, Ni J, Shao DC, Miao NJ, Xu XI, et al. Insulin deficiency induces rat renal mesangial cell dysfunction via activation of IGF-1/IGF-1R pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2016 Jan;37(2):217-27.
  5. Meng XM. Inflammatory mediators and renal fibrosis. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:381-406.
  6. Potier M, Elliot SJ, Tack I, Lenz O, Striker GE, Strike LJ, et al. Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Feb;12(2):241-51.
  7. Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, et al. Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines. *PLoS One.* 2014;9(1):e85594.
  8. Perlman A, Lawsins LM, Kolachana P, Saji M, Moore Junior J, Ringel MD. Angiotensin II regulation of TGF-beta in murine mesangial cells involves both PI3 kinase and MAP kinase. *Ann Clin Lab Sci.* 2004 May;34(3):277-86.
  9. Guan Z, Osmond DA, Inscho EW. P2X receptors as regulators of the renal microvasculature. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Dec;28(12):646-52.
  10. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002 Oct;82(4):1013-67.
  11. Lenertz LY, Gavala ML, Hill LM, Bertics PJ. Cell signaling via the P2X(7) nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking. *Purinergic Signal.* 2009 Jun;5(2):175-87.
  12. Vonend O, Turner CM, Chan CM, Loesch A, Dell'Anna GC, Srani KS, et al. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int.* 2004 Jul;66(1):157-66.
  13. Rodrigues AM, Bergamaschi CT, Fernandes MJS, Paredes-Gamero EJ, Curi MV, Ferreira AT, et al. P2X(7) receptor in the kidneys of diabetic rats submitted to aerobic training or to N-acetylcysteine supplementation. *PLoS One.* 2014 Jun;9(6):e97452.
  14. Chuang CT, Guh JY, Lu CY, Chen HC, Chuang LY. S100B is required for high glucose-induced pro-fibrotic gene expression and hypertrophy in mesangial cells. *Int J Mol Med.* 2015 Feb;35(2):546-52.
  15. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Appendix 3:3B.
  16. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jun;115(23):5839-48.
  17. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney Int.* 1992 Sep;42(3):647-56.
  18. Yuan P, Xue H, Zhou L, Qu L, Li C, Wang Z, et al. Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Jul;26(7):2119-26.
  19. Wang D, Guan MP, Zheng ZJ, Li WQ, Luv FP, Pang RY, et al. Transcription factor Egr1 is involved in high glucose-induced proliferation and fibrosis in rat glomerular mesangial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(6):2093-107.
  20. Rodriguez-Barbero A, L'Azou B, Cambar J, López-Novoa JM. Potential use of isolated glomeruli and cultured mesangial cells as in vitro models to assess nephrotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16(3):145-53.
  21. Stockand JD, Sansom SC. Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):723-44.
  22. Zhai YP, Lu Q, Liu YW, Cheng Q, Wei YQ, Zhang F, et al. Overproduction of nitric oxide by oxidative stress-induced activation of the TGF-beta/PI3K/Akt pathway in mesangial cells cultured in high glucose. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 Apr;34(4):507-14.
  23. Noh H, Ha H, Yu MR, Kang SW, Chou KH, Han DS, et al. High glucose increases inducible NO production in cultured rat mesangial cells. Possible role in fibronectin production. *Nephron.* 2002 Jan;90(1):78-85.
  24. Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014 Jan;2:251-8.
  25. Forbes MS, Thornhill BA, Park MH, Chevalier RL. Lack of endothelial nitric-oxide synthase leads to progressive focal renal injury. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170(1):87-99.
  26. Solini A, Iacobini C, Ricci C, Chiozzi P, Amadio L, Prizzi F, et al. Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney Int.* 2005 Mar;67(3):875-85.
  27. Woodward HN, Anwar A, Riddle S, Taraseviciene-Stewart L, Frago M, Stenmarck KR, et al. PI3K, Rho, and ROCK play a key role in hypoxia-induced ATP release and ATP-stimulated angiogenic responses in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 Nov;297(5):L954-64.
  28. Jiang LH, Caseley EA, Muench SP, Roger S. Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP. *Purinergic Signal.* 2021 Sep;17(3):331-44.
  29. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001 Feb;97(3):587-600.
  30. Erb L, Lao Z, Seye C, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *PLugers Arch.* 2006 Aug;452(5):552-62.
  31. Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B, et al. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):F962-71.
  32. Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buel G, et al. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem.* 1999 Nov;274(47):33206-8.
  33. Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C, et al. A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem.* 2006 Nov;99(3):745-58.
  34. Labasi JM, Petruschova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol.* 2002 Jun;168(12):6436-45.
  35. Di Virgilio F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal.* 2007 Mar;3(1-2):1-3.
  36. Park YC, Jun CD, Kang HS, Kim HD, Chung HT. Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology.* 1996 Feb;87(2):296-302.
  37. Scott RS, Uvelius B, Arner A. Changes in intracellular calcium concentration and P2X1 receptor expression in hypertrophic rat urinary bladder smooth muscle. *NeuroUrol Urodyn.* 2004;23(4):361-6.
  38. Song Z, Vijayaraghavan S, Sladek CD. ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purinergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Jan;292(1):R423-31.
  39. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 2000 May;6(5):347-73.
  40. Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflamm (Lond).* 2007 Mar;4:5.
  41. Menzies RI, Booth JWR, Mullins JJ, Bailey MA, Tam FWK, Norman JT, et al. Hyperglycemia-induced renal P2X7 receptor activation enhances diabetes-related injury. *EBioMedicine.* 2017 May;19:73-83.
  42. Rodrigues AM, Serralha RS, Farias C, Punaro GR, Fernandes MJS, Higa EMS. P2X7 receptor and klotho expressions in diabetic nephropathy progression. *Purinergic Signal.* 2018 Jun;14(2):167-76.
  43. Rodrigues AM, Serralha RS, Lima DY, Punaro GR, Visona I, Fernandes MJS, et al. P2X7 siRNA targeted to the kidneys increases klotho and delays the progression of experimental diabetic nephropathy. *Purinergic Signal.* 2020 Jun;16(2):175-85.
  44. Nascimento M, Punaro GR, Serralha RS, Lima DY, Mouro MG, Oliveira LCG, et al. Inhibition of the P2X7 receptor improves renal function via renin-angiotensin system and nitric oxide on diabetic nephropathy in rats. *Life Sci.* 2020 Jun;251:117640.