

Elizabeth João Pavin

**EXPRESSÃO DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS NO
DIABETES MELLITUS INDUZIDO POR DROGAS (ALOXANA E
ESTREPTOZOTOCINA) E AVALIAÇÃO MORFO-FUNCIONAL
RENAL**

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do Título de Doutor em Medicina (Medicina Interna)*

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner²
UNICAMP**

**Campinas-SP
UNICAMP**

1995



Em 00076715-6

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	7/UNICAMP
	P288.e
VALOR	
TÍTULO	25469
PROG.	433/95
C	☐ ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/09/95
N.º CPD	

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP

Pavin, Elizabeth Joao

P289e Expressao de colageno IV e laminina urinarios no diabetes mellitus induzido por drogas (aloxana e estreptozotocina) e avaliacao morfo-funcional renal / Elizabeth Joao Pavin. Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciencias Medicas.

1. Diabetes mellitus experimental. 2. Membrana basal.
3. Nefropatiasdiabeticas. I. Zollner, Ricardo de Lima.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciencias Medicas. III. Titulo.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Elizabeth João Pavin

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

MEMBROS:

1. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
2. Prof. Dr. Sérgio Atalá Dib
3. Prof. Dr. Milton Lacerda
4. Prof. Dr. José Antonio de Paula Gonçalves
5. Prof. Dr. José Carvalho

Curso de pós-graduação em Medicina, área de Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - SP.

Data: 27/06/95

A
Wilton, Pedro e João Paulo,
para quem espero estar crescendo.

Meus agradecimentos,

Ao Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner, membro da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FCM-UNICAMP, meu orientador, por ter me apontado o verdadeiro caminho, incentivando-me e apoiando-me em todos os momentos.

Ao Professor Doutor José Antonio Rocha Gontijo, membro da Disciplina de Medicina Interna da FCM-UNICAMP, por suas valiosas sugestões e apoio, cedendo-me, gentilmente, seu laboratório.

Ao Professor Doutor José Vassallo, membro do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, por me guiar e me fazer descobrir o mundo fascinante da histologia.

Aos colegas da Disciplina de Endocrinologia da FCM-UNICAMP, pelo apoio e confiança incondicionais.

À Professora Doutora Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann, mais que colega de especialidade, exemplo de fidelidade e amizade.

À Professora Doutora Glauce Aparecida Pinto, co-responsável pelo Laboratório de Patologia Experimental (LAPE), pelo auxílio na realização dos procedimentos em imuno-histoquímica.

Ao Professor Doutor Gilberto Assumpção, coordenador do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental-UNICAMP, por iniciar-me na medicina experimental.

À Professora Doutora Célia Carneiro, do Instituto Ludwig de Pesquisas do Câncer, pelo gentil fornecimento de anticorpos antilaminina.

Ao Professor Doutor Cássio Raposo Amaral, Presidente do Sobrapar, pela autorização do uso do Biotério daquela instituição, possibilitando a imunização e preparo de anti-soros em coelhos.

À Professora Doutora Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela, membro do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP, pelo socorro imediato e sucesso na documentação fotográfica.

Aos Doutores Luís Henrique Barbosa Boechat e Maria Hortência Barberá, amigos que tanto me ajudaram ao longo do trabalho.

À Conceição Villela, bióloga do LICA, amiga incansável que, através de seu jeito meigo, possibilitou a realização de meu trabalho.

À Eliene Pinheiro, Margarida Oliveira e demais funcionários do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia pelo grande auxílio.

À Conceição Aparecida da Silva e Márcia Maria Pedroso, pela ajuda nas dosagens laboratoriais dos animais estudados; e à Wanda Vreck e Fernanda Oliveira, técnicas do Laboratório de Patologia Experimental que “emblocaram” e procederam aos cortes dos órgãos coletados.

À Professora. Izilda João, minha irmã, pela correção gramatical e versão para o inglês deste trabalho.

Ao Eng^o Wilton Pavin, meu marido e amigo, mais que colaborador nas áreas de estatística, informática e diagramação final, sempre companheiro.

Aos animais de experimentação, elementos muitas vezes esquecidos, mas fundamentais, sem os quais a pesquisa científica não poderia caminhar...

**Este trabalho foi idealizado e realizado
no Laboratório de Imunologia Clínica e
Alergia da Disciplina de Imunologia
Clínica e Alergia da FCM-UNICAMP.**

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	<u>LISTAS</u>	IV
	<u>RESUMO</u>	X
1	<u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE <i>DIABETES MELLITUS</i> INDUZIDO	2
1.3	NEFROPATIA DIABÉTICA	4
1.3.1	Etiopatogenia	5
1.3.2	Alterações Estruturais	8
1.4	MEMBRANA BASAL	10
1.5	MEMBRANA BASAL DA MATRIZ GLOMERULAR: ESTRUTURA E FUNÇÃO	14
1.6	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, BIOQUÍMICAS E FUNCIONAIS DA MATRIZ GLOMERULAR DIABÉTICA	17
1.7	CORRELAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS DA NEFROPATIA DIABÉTICA	24
1.8	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	29
2	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	31
2.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	31
2.2	DROGAS DE INDUÇÃO DE <i>DIABETES MELLITUS</i>	31
2.3	PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE <i>DIABETES MELLITUS</i>	31
2.4	NÚMERO DE ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL	32
2.5	CRITÉRIO PARA DIAGNÓSTICO DE <i>DIABETES MELLITUS</i>	32

2.6	CRITÉRIO DE INCLUSÃO PARA ESTUDO	35
2.7	COLETA DA URINA E SANGUE	35
2.8	CONTROLE DA DIETA	36
2.9	PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS E IMUNOQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS	36
2.9.1	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS	36
2.9.2	Eletroforese de Transferência seguida de “Immunoblotting”	37
2.10	FUNÇÃO RENAL	39
2.10.1	Clearance de Creatinina Endógeno	39
2.10.2	Estudo da Manipulação Tubular de Sódio (Na)	39
2.10.3	Dosagem de Lítio e Sódio	40
2.10.4	Fórmulas Utilizadas	40
2.10.4.1	Clearance de Creatinina (Ccr) e de Lítio (Cli)	40
2.10.4.2	Fração de Excreção de Sódio (FENa)	41
2.10.4.3	Reabsorção Proximal Fracional de Sódio (RPNa)	41
2.10.4.4	Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Sódio (RPPNa)	41
2.10.5	Dosagem de Proteinúrias de 15 horas	41
2.10.6	Dosagem de Albuminúrias de 15 horas	42
2.11	DOSAGEM DE GLICOSE	42
2.12	UTILIZAÇÃO DE CONSERVANTES	42
2.13	CONCENTRAÇÃO DAS URINAS	43
2.14	COLETA E PREPARO DO TECIDO RENAL	43
2.15	MICROSCOPIA ÓPTICA	43
2.16	TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	44
2.17	REAGENTES UTILIZADOS	46
2.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3	<u>RESULTADOS</u>	48
3.1	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DOS ANIMAIS ESTUDADOS	48
3.2	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	48
3.2.1	Clearance de Creatinina (Ccr)	48
3.2.2	Estudo da Manipulação Tubular de Sódio	49

3.2.2.1	Fração de Excreção de Sódio (FENa)	49
3.2.2.2	Reabsorção Proximal Fracional de Sódio (RPNa)	50
3.2.2.3	Reabsorção Pós Proximal Fracional de Sódio (RPPNa)	50
3.2.3	Avaliação das Proteinúrias	51
3.2.4	Avaliação das Albuminúrias	51
3.3	ANÁLISE QUALITATIVA DA PROTEINÚRIA ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS	52
3.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO ANTIGÊNICA DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS, SEGUIDA DE TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA E “IMMUNOBLOTTING”	74
3.4.1	Eletroforeses de Referência em Gel de Poliacrilamida-SDS	74
3.4.2	Eletroforeses de Transferência seguidas de “Immunoblotting” para Detecção de Colágeno IV e Laminina urinários.	74
3.5	ESTUDO MORFOLÓGICO RENAL ATRAVÉS DE COLORAÇÕES POR HEMATOXILINA E EOSINA (HE) E ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS)	76
3.6	ESTUDO DA EXPRESSÃO RENAL DE COLÁGENO IV E LAMININA NO <i>DIABETES MELLITUS</i> INDUZIDO	83
4	<u>DISCUSSÃO</u>	90
4.1	FUNÇÃO RENAL	91
4.2	ANÁLISE DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS	98
4.3	ASPECTOS MORFOLÓGICOS	102
5	<u>CONCLUSÕES</u>	107
6	<u>SUMMARY</u>	109
7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	111

LISTA DE TABELAS - GRÁFICOS - FIGURAS

TABELAS

Tabela 01	Estrutura e função dos componentes da membrana basal glomerular e da matriz mesangial.	18
Tabela 02	Valores médios de peso corporal dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.	54
Tabela 03	Valores médios de glicemia dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.	56
Tabela 04	Valores médios de volume urinário dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.	58
Tabela 05	Valores médios de clearance de creatinina (Ccr) no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	60
Tabela 06	Valores médios de FENa no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	62
Tabela 07	Valores médios de RPNa no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	64
Tabela 08	Valores médios de RPPNa no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	66
Tabela 09	Valores médios de proteinúrias no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	68
Tabela 10	Valores médios de albuminúrias no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	70
Tabela 11	Padrão da matriz mesangial renal através de coloração com PAS no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo.	82

Tabela 12	Padrão de expressão de colágeno IV e laminina glomerular renal, por imuno-histoquímica, no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo.	85
------------------	---	-----------

GRÁFICOS

Gráfico 01	Protocolo de indução de DM e estudo de diferentes grupos de animais, analisados em seguimentos independentes em função do tempo de doença.	33
Gráfico 02	Protocolo de indução de DM e seguimento linear dos animais estudados ao longo do tempo de doença.	34
Gráfico 03	Variação de peso corporal dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.	55
Gráfico 04	Variação de glicemia dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.	57
Gráfico 05	Variação de volume urinário dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.	59
Gráfico 06	Variação de clearance de creatinina (Ccr) no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	61
Gráfico 07	Variação de FENa no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	63
Gráfico 08	Variação de RPNa no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	65
Gráfico 09	Variação de RPPNa no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	67
Gráfico 10	Variação de proteinúrias no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	69
Gráfico 11	Variação de albuminúrias no <i>diabetes mellitus</i> experimental, em função do tempo de doença.	71

FIGURAS

Figura 01	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS, sob condições desnaturantes das urinas, não concentradas, do protocolo experimental com aloxana. Gel a 8%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250.	72
Figura 02	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS, sob condições desnaturantes das urinas, não concentradas, do protocolo experimental com estreptozotocina. Gel a 8%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250.	73
Figura 03	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com aloxana, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e “ <i>immunoblotting</i> ”, utilizando-se anticorpo de coelho anticolágeno IV na diluição 1:200.	77
Figura 04	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com estreptozotocina, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e “ <i>immunoblotting</i> ”, utilizando-se anticorpo de coelho anticolágeno IV na diluição 1:200.	78
Figura 05	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com aloxana, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e “ <i>immunoblotting</i> ”, utilizando-se anticorpo de coelho antilaminina na diluição 1:500.	79
Figura 06	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com estreptozotocina, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e “ <i>immunoblotting</i> ”, utilizando-se anticorpo de coelho antilaminina na diluição 1:500.	80

Figura 07	Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14% das urinas concentradas dos ratos controle, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e “ <i>immuno-blotting</i> ”, utilizando-se, respectivamente, anticorpo de coelho anticolágeno IV e antilaminina, nas diluições 1:200 e 1:500.	81
Figura 08	Controle - Glomérulo normal - PAS (330 X).	86
Figura 09	DM por estreptozotocina - Nota-se glomérulo com espessamento da matriz mesangial - PAS (528 X).	86
Figura 10 (a)	Controle - Colágeno IV - Nota-se membrana basal dos capilares glomerulares como linha contínua e delgada - IPX (528 X).	87
Figura 10 (b)	Controle - Laminina - Aspecto normal da matriz mesangial - IPX (330 X).	87
Figura 11 (a)	2º dia - DM por aloxana - Colágeno IV - MB normal - Nota-se aumento de número e tamanho de células glomerulares - IPX (528 X).	87
Figura 11 (b)	2º dia - DM por estreptozotocina - Laminina - Mesmo aspecto descrito anteriormente - IPX (528 X).	87
Figura 12 (a)	10º dia - DM por aloxana - Colágeno IV - Nota-se leve espessamento de MB dos capilares glomerulares e matriz mesangial- IPX (330 X).	88
Figura 12 (b)	10º dia - DM por estreptozotocina - Colágeno IV - Glomérulo de aspecto normal - IPX (528 X).	88
Figura 13 (a)	28º dia - DM por aloxana - Laminina - Nota-se moderado espessamento de MB dos capilares glomerulares e matriz mesangial - IPX (528 X).	88
Figura 13 (b)	28º dia - DM por estreptozotocina - Colágeno IV - Mesmo aspecto descrito anteriormente - IPX (528 X).	88
Figura 14 (a)	56º dia - DM por aloxana - Colágeno IV - Intenso espessamento de MB dos capilares glomerulares e matriz mesangial- IPX (528 X).	89
Figura 14 (b)	56º dia - DM por estreptozotocina - Laminina - Mesmo aspecto descrito anteriormente - IPX (528 X).	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP.....	Alanino amino-peptidase
β -GAL.....	β -galactosidase
β -NAG.....	β acetil-glicosaminidase
Ccr.....	Clearance de Creatinina
Cli.....	Clearance de Lítio
Col IV.....	Colágeno IV
DAB.....	3,3 Tetra-hidrocloro de diaminobenzidina
DM.....	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMID.....	<i>Diabetes Mellitus</i> Insulino Dependente
EHS, <i>tumor de</i>	Tumor de Engelbreth-Holm-Swarm
EIA.....	Enzima-imuno-ensaio
EV, <i>via</i>	Via endo-venosa
FENa.....	Fração de Excreção de Sódio
γ GT.....	γ glutamil-transpeptidase
HE.....	Hematoxilina e Eosina
IPX.....	Imuno-Histoquímica
K.....	Potássio
kDa.....	Unidade de peso molecular Dalton: 1 kDa = 1000 Daltons
Lam.....	Laminina
LAPE.....	Laboratório de Patologia Experimental
LDH.....	Desidrogenase Láctica
Li.....	Lítio
LICA.....	Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia
MB.....	Membrana Basal
MM.....	Matriz Mesangial
Na.....	Sódio
PAS.....	Ácido Periódico de Schiff

PBS	Solução salina tamponada
RPNa.....	Reabsorção Proximal Fracional de Sódio
RPPNa.....	Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Sódio
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TFG.....	Taxa de Filtração Glomerular
TRIS.....	Tris[hidro-metil]amino-acético

RESUMO

A excreção urinária de componentes da membrana basal, especificamente colágeno IV e laminina, foi determinada através de “*immunoblotting*”, e estudada em ratos Wistar machos, diabéticos-induzido por drogas (aloxana e estreptozotocina) EV, e comparada a controles, em função do tempo de doença.

Estudamos, também, as funções renais: glomerular e tubular, avaliando, respectivamente, clearance de creatinina e de lítio. Além disso, aspectos morfológicos renais foram analisados utilizando-se técnicas de PAS e de imuno-histoquímica, para colágeno IV e laminina, com o objetivo de verificar possíveis alterações da membrana basal.

Assim, pudemos observar excreções de frações urinárias de colágeno IV (88 e 75 kDa) e laminina (108 e 88 kDa), em ambos os modelos de DM, em todos os tempos estudados. Entretanto, a fração de 57 kDa da laminina, nos animais diabéticos-induzido por estreptozotocina, somente foi expressa a partir da 5ª semana de doença, enquanto nos diabéticos-induzido por aloxana sua excreção foi verificada precocemente (2º dia).

As alterações da função renal foram semelhantes nos dois modelos, porém de maneira mais intensa no modelo aloxânico. Dentre elas destacaram-se: diminuição progressiva da taxa de filtração glomerular, aumento da fração de excreção de sódio; e, diminuição da reabsorção proximal deste íon, não compensada por aumento da reabsorção distal.

Os achados morfológicos evidenciaram espessamento da membrana basal do capilar glomerular e aumento da matriz mesangial, iniciando-se precocemente no *diabetes mellitus* aloxânico.

De acordo com os dados observados neste estudo, concluímos que no DM induzido por aloxana e estreptozotocina, frações urinárias de colágeno IV e laminina podem ser utilizadas como marcadores precoces de nefropatia diabética. Outrossim, o DM induzido por aloxana promove alterações funcionais renais mais intensas, principalmente tubulares, quando comparado ao modelo induzido por estreptozotocina; em adição, as alterações morfológicas observadas pela técnica de imuno-histoquímica puderam ser correlacionadas às alterações bioquímico-funcionais-renais.

INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diabetes mellitus é doença metabólica caracterizada por hiperglicemia decorrente da secreção deficiente de insulina, absoluta ou relativa. Embora o diagnóstico e a resposta ao tratamento se estabeleçam através de níveis normais de glicemia, a síndrome caracteriza-se por intensas alterações no metabolismo intermediário, afetando proteínas, lipídeos e carboidratos.

Dentre as manifestações clínicas do *diabetes mellitus*, destacam-se poliúria e polidipsia secundárias ao estado de hiperglicemia. Esta alteração metabólica desencadeia manifestações crônicas que acometem a maior parte dos pacientes, dentre as quais destacamos as decorrentes de lesões nervosas (neuropatia), dos pequenos vasos sanguíneos (microangiopatia), tanto em rins (nefropatia) como retina (retinopatia), bem como as originadas por processos aterogênicos acelerados (macroangiopatia).

O *diabetes*, com suas complicações, encontra-se entre as primeiras causas de morte em vários países (SKYLER, 1992). Assim, pacientes diabéticos possuem risco aumentado para desenvolver doença arterial, coronariana e cerebral, e vascular periférica (GINSBERG, 1991). Além disso, representa causa de mais da metade de todas amputações, sendo, também, a principal responsável por cegueira adquirida em adultos (JERNELD, 1988). Adicionalmente, constitui importante causa de nefropatia em estado terminal (BRUNNER et al., 1988).

O grau de hiperglicemia está diretamente correlacionado à frequência, gravidade e velocidade de progressão das complicações (DAHL-

JORGENSEN et al., 1986). Estudos prospectivos têm demonstrado efeitos benéficos do tratamento intensivo, indicando ser o controle metabólico fundamental na prevenção de complicações crônicas do *diabetes* (REICHARD et al., 1991).

1.2 **MODELOS EXPERIMENTAIS DE *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO**

Modelos experimentais aplicados no estudo do *diabetes mellitus* têm sido utilizados há, aproximadamente, um século, fornecendo valiosa contribuição para a elucidação da etiopatogenia da doença, resultando no prolongamento da sobrevida de pacientes.

No *diabetes mellitus* induzido, agentes químicos são utilizados visando a produção de hiperglicemia (MORDERS & ROSSINI, 1981a). Tais substâncias podem ser classificadas em 3 categorias: toxinas célula-específicas que destroem células β ; aquelas desencadeadoras de inibição transitória da secreção de insulina; e, drogas que impedem a ação da insulina, a nível de tecidos periféricos, promovendo *diabetes mellitus* por defeito de receptor (MORDERS, ROSSINI, MILLER, 1981b).

As primeiras são as mais empregadas, pois simulam melhor as lesões que ocorrem nas células β das ilhotas pancreáticas, produzindo *diabetes mellitus* de maior duração e possibilitando estudos longitudinais. Dentre elas destaca-se a **aloxana**, descoberta por DUNN et al. (1943), uma pirimidina com semelhanças estruturais ao ácido úrico e à glicose. Ela se liga, instantaneamente, às membranas celulares das ilhotas pancreáticas produzindo inibição, "*in vivo*" e "*in vitro*", do mecanismo secretório de insulina. Trabalhos demonstram ação inibitória da aloxana a nível da glucoquinase, através de oxidação de grupos sulfidril (SH) no receptor de

glicose desta enzima, elemento fundamental na regulação da glicemia sanguínea e insulino-secreção (MIWA et al., 1984). O *diabetes* aloxânico apresenta, portanto, os mesmos sintomas do humano, incluindo perda de peso, polidipsia, poliúria, glicosúria, cetonúria e cetoacidose. Esta droga possui extrema instabilidade química em condições fisiológicas, podendo sofrer alterações também com tipo de dieta, idade e espécie de animal (PATTERSON et al., 1949). Nesse modelo de *diabetes* induzido não são observados processos relacionados à auto-imunidade como infiltração linfo-monocitária e presença de auto-anticorpos circulantes.

Outro agente químico é a **estreptozotocina**, a 2-desoxi-metil-nitrosuréia-glucopiranosse, composto produzido pelo *Streptomyces achromogenes*, possuindo propriedades diabetogênicas através da destruição seletiva de células β pancreáticas (JOHANSSON & TJÄLVE, 1978). A diabetogenicidade da estreptozotocina tem sido correlacionada à redução da concentração do nucleotídeo piridina da ilhota pancreática, que, por sua vez, tem propriedade de acumular tal droga em seu interior. ANDERSON et al. (1974) demonstraram captação da estreptozotocina pelas ilhotas de camundongos, por meio de radioatividade, 15 minutos após a administração de dose diabetogênica.

As N-nitrosuréias, às quais a estreptozotocina pertence, são também instáveis quimicamente, sendo suas ações carcinogênicas e biológicas devidas à alquilação de componentes celulares causada por reações intermediárias formadas pela degradação desta substância (JOHANSSON & TJÄLVE, 1978). Seu efeito citotóxico decorre da nitrosuréia, que aumenta a ativação da enzima poli(ADP-ribose)sintetase, resultando em diminuição da concentração de seu substrato NAD (OKAMOTO, 1981; OKAMOTO, 1985). Os efeitos metabólicos produzidos pela insulinopenia são semelhantes aos da aloxana (LeDOUX et al., 1986).

Estes agentes podem ser usados em diferentes modelos experimentais, tais como rato, cão e macaco, resultando em *diabetes* secundário à droga, com caráter insulino-requerente (MORDERS & ROSSINI, 1981).

1.3 NEFROPATIA DIABÉTICA

A nefropatia diabética, constitui importante causa de morbidade e mortalidade, contribuindo, de forma marcante, para altos custos sociais nos pacientes portadores de insuficiência renal. Dados epidemiológicos demonstram que 30 a 40% dos diabéticos insulino-dependentes desenvolvem nefropatia, caracterizada por proteinúria persistente, hipertensão arterial e perda progressiva da função renal (ANDERSEN et al., 1983).

Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que permitam o entendimento dos mecanismos responsáveis pela nefropatia diabética, propiciando estratégias de prevenção, ou, pelo menos, retardo de sua progressão.

A alteração característica da glomeruloesclerose diabética é o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares e expansão mesangial com diminuição da luz dos capilares e conseqüente interrupção do fluxo sanguíneo (STEFFES et al., 1989).

A membrana basal glomerular representa barreira seletiva no que diz respeito à carga como ao tamanho das macromoléculas do ultrafiltrado glomerular. Sua carga elétrica é determinada pela presença dos ácidos carboxílico e siálico, bem como de glicosaminoglicans, especialmente de heparan sulfato, que lhe confere carga negativa, fato demonstrado em

trabalhos experimentais através de análises bioquímicas (PARTHASARATHY et al., 1981).

Várias alterações foram encontradas na membrana basal glomerular no *diabetes*, como aumento na concentração de glicina, hidroxilisina, hidroxiprolina e dissacarídeos, presentes na porção colágena da membrana (SATO et al., 1975; CANIVET, CRUZ, MOREAU-LALANDE, 1979), além de aumento de laminina e fibronectina (OLGEMOLLER & SCHLEICHER, 1993). Destaca-se também, diminuição do conteúdo de heparan sulfato, evidenciada através de estudos utilizando modelos animais (COHEN & SUMA, 1981; BROWN et al., 1982) e humanos (PARTHASARATHY & SPIRO, 1982) que favoreceria o aumento da permeabilidade à passagem de proteínas, causando proteinúria (DECKERT et al., 1989). Na nefropatia diabética, inúmeros trabalhos atribuem aos fatores hemodinâmicos, a causa dos distúrbios morfológicos ou estruturais (HOSTETTER, 1992). Assim, a elevação da taxa de filtração glomerular, decorrente do aumento da pressão capilar tem sido utilizada como importante fator de risco para desenvolvimento de glomerulosclerose e proteinúria (MOGENSEN et al., 1984; ZATZ et al., 1985). A hipertensão intraglomerular poderia levar ao espessamento da membrana basal e expansão da matriz mesangial, alterações que promoveriam redução da superfície e velocidade de filtração, culminando na nefropatia clínica caracterizada pela proteinúria persistente (O'DONNELL, BERTRAM, KEANE, 1988).

1.3.1 Etiopatogenia

As alterações hemodinâmicas renais representam papel crítico na instalação e desenvolvimento da nefropatia diabética, podendo estar presentes em pacientes diabéticos insulino-dependentes mesmo no início do diagnóstico (MOGENSEN, 1971a). Diversas linhas de investigação

visam descobrir a causa destas alterações, tendo os fatores metabólico-hormonais recebido maior destaque.

A hiperglicemia pode, por si só, elevar a taxa de filtração glomerular em indivíduos normais (MOGENSEN, 1971b), provavelmente por alterações da autoregulação do fluxo sanguíneo renal e/ou por liberação de substâncias vasodilatadoras, como as prostaglandinas (BLANTZ et al., 1982; KASISKE, O'DONNELL, KEANE, 1985). O controle metabólico também desempenha papel importante na hiperfiltração glomerular, pois a redução nos níveis de glicemia através de insulino-terapia intensiva, em diabéticos insulino-dependentes, normaliza esta alteração hemodinâmica (WISEMAN et al., 1985a).

A deficiência insulínica constitui outra causa de desequilíbrio hemodinâmico glomerular. Assim, trabalhos utilizando modelo de *diabetes* experimental demonstraram que a infusão de insulina em ratos diabéticos, mesmo com manutenção de níveis glicêmicos elevados, diminui a pressão capilar glomerular conferindo, desta forma, ação direta da insulina na vasculatura renal, independentemente de seu efeito na glicemia (SCHOLEY et al., 1989). Receptores insulínicos contidos nas células mesangiais podem ser a base anatômica para explicar as alterações que ocorrem na contração do mesângio glomerular (SCHLONDORFF, 1987). Tal fato, provavelmente decorre da diminuição da entrada de cálcio para tais células, resultante da alteração da atividade das ATPases dependentes de Ca^{++} , Na^{+} e K^{+} (LEVY et al, 1988). Este efeito na reatividade mesangial pode modificar a permeabilidade e filtração glomerulares.

A ativação da via dos polióis, conseqüente à hiperglicemia, com acúmulo de sorbitol e diminuição de mio-inositol e da atividade de $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$, pode modificar a vasculatura renal. O tratamento com mio-inositol em animais diabéticos apresentando hiperfiltração glomerular,

levou à normalização desta alteração hemodinâmica, bem como sua prevenção em ratos com *diabetes* de início recente (GOLDFARB et al., 1991). Pacientes diabéticos insulino-dependentes, normoalbuminúricos e hiperfiltrantes, demonstraram redução na velocidade de filtração glomerular, quando tratados com inibidor de aldose reductase (PEDERSEN, CHRISTIANSEN, MOGENSEN, 1991).

A hiperglicemia modifica o tempo de duração de macromoléculas através da formação de produtos de glicosilação, não enzimática, avançada. Estes produtos estimulam diretamente os macrófagos a sintetizarem citocinas ou fatores de crescimento, levando a alterações nos componentes da matriz extracelular e na permeabilidade vascular (BROWNLEE et al., 1988; VLASSARA, BROWNLEE, CERAMI, 1986).

Aumento dos níveis de glucagon e hormônio de crescimento têm sido relacionados ao *diabetes*. Estes hormônios são capazes de induzir aumento na taxa de filtração glomerular em indivíduos normais, quando administrados em doses comparáveis àsquelas encontradas em pacientes diabéticos mal controlados (PARVING et al., 1980; SANDAHL-CHRISTIANSEN et al., 1981). Entretanto, tais afirmações têm sido questionadas (WISEMAN et al., 1985b).

Várias substâncias vasoativas parecem contribuir para o desencadeamento da alteração hemodinâmica renal. Assim, a infusão de anticorpos anti-fator natriurético atrial em ratos diabéticos resulta em queda da hiperfiltração glomerular (ORTOLA et al., 1987). Por outro lado, estudos recentes utilizando *diabetes* experimental atribuem ao fator de relaxamento derivado do endotélio, ação vasodilatadora renal (KING et al., 1990). KOCH-JENSEN et al. (1986) reforçam o papel dos elementos vasoativos quando, administrando indometacina para animais diabéticos, reduzem consideravelmente o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular. Da mesma forma, SCHAMBELAN et al. (1983), estudando

glomérulos isolados de ratos diabéticos, relatam aumento na síntese glomerular de prostaglandinas no *diabetes* experimental. Estes e outros estudos corroboram o papel das prostaglandinas renais nas alterações hemodinâmicas no *diabetes* recente (GAMBARDELLA et al., 1988).

No *diabetes* podem ocorrer distúrbios no eixo renina-angiotensina que, a nível glomerular, age modulando a passagem de macromoléculas para o mesângio através da constrição das células mesangiais. CHRISTLIEB (1974) utilizando animais diabéticos, demonstrou que a expansão do volume plasmático, secundária à hiperglicemia, provoca queda nos níveis de renina e alteração na síntese e conversão de pró-renina em renina, com aumento da forma inativa. Também foi relatado haver diminuição do número de receptores para angiotensina II nos glomérulos de ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina (BALLERMANN, SKORECKI, BRENNER, 1984).

A resposta à noradrenalina, tromboxano e calicreínas poderá estar alterada já no início do *diabetes* (TUCK et al., 1987), contribuindo também para distúrbios na hemodinâmica renal.

Portanto, evidências indicam que alterações precoces na hemodinâmica glomerular podem causar, ou potencializar, os estágios finais da glomerulopatia diabética, caracterizados por proteinúria, lesões estruturais e progressiva queda na taxa de filtração glomerular (HOSTETTER, 1992). Entretanto, a fisiopatologia da nefropatia diabética ainda não está de toda elucidada, constituindo-se num campo aberto à pesquisa experimental e clínica.

1.3.2 Alterações Estruturais

Na fase inicial do *diabetes mellitus* ocorre aumento renal devido à hipertrofia e hiperplasia celular, podendo persistir até o período clínico

quando os pacientes já apresentam síndrome nefrótica. Posteriormente, há substancial redução de tamanho, alcançando o estado de rim terminal (ØSTERBY et al., 1975).

As primeiras alterações microscópicas, a nível glomerular, são o espessamento difuso da membrana basal capilar, aumento da matriz e proliferação das células mesangiais (SCHLEICHER & OLGEMOLLER, 1992). Esses achados são precoces, podendo surgir vários anos antes do aparecimento da microalbuminúria patológica, constituindo os marcadores dos distúrbios morfológicos observados na nefropatia diabética em animais e humanos.

Com a perpetuação da hiperglicemia, vão aparecendo ramificações do material da membrana basal glomerular entre as células endoteliais, podendo-se observar lesões difusas, ao microscópio óptico, nesta etapa. A glomerulopatia diabética difusa, descrita por Fahr e Bell em 1942, apresenta-se como acúmulo de substância amorfa na parede do capilar glomerular e no mesângio, possuindo propriedade de reagir com o ácido periódico de Schiff (PAS). Posteriormente, essas lesões começam a agrupar-se caracterizando a forma nodular, descrita por Kimmelstiel e Wilson em 1936, considerada patognomônica.

Outras lesões renais comuns a pacientes diabéticos incluem hialinose arteriolar glomerular aferente e eferente, além de lesões exudativas hialinas, chamadas de cápsulas de fibrina, no espaço sub-endotelial e porção interna da cápsula de Bowman, chamada de gota capsular (MAUER et al., 1994).

Podem ocorrer expansão difusa do interstício renal e espessamento da membrana basal tubular com a evolução da doença para seus estágios finais.

Portanto, alterações estruturais renais da nefropatia diabética podem ser iniciadas primariamente por distúrbios metabólicos, particularmente hiperglicemia. Lesões específicas, tais como expansão da matriz mesangial e espessamento da membrana basal glomerular desencadeiam distúrbios funcionais do nefro, inicialmente aumentando a taxa de filtração glomerular, com posterior redução da superfície de filtração, hipertensão sistêmica e insuficiência renal (O'DONNEL et al., 1988).

1.4 MEMBRANA BASAL

A membrana basal constitui tipo especializado de matriz extracelular que separa vários tipos celulares do tecido conjuntivo subjacente (VRACKO, 1974; KEFALIDES, ALPER, CLARK, 1979). TODD & BOWMANN (1857) descreveram-na pela primeira vez como estruturas simples, finas e delicadas, situadas na base das células epiteliais. Inicialmente, o estudo da caracterização da membrana basal foi muito limitado, em decorrência da sua natureza insolúvel e de sua baixa concentração, dificultando seu estudo bioquímico (TIMPL & MARTIN, 1982). Com o advento de técnicas utilizando cultura de células, particularmente do tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo, foi possível avançar no estudo de componentes da membrana basal, pois tal cultura representa fonte geradora de colágeno IV, laminina e proteoglicano de heparan sulfato (TIMPL & MARTIN, 1982).

Heterogeneidade e alto grau de especialização são atributos da membrana basal, cujos constituintes proteicos variam de 20 a 500 nm de espessura (JOHANNESSEN, 1978; KEFALIDES et al., 1979). Possui atividade biológica potente, podendo influenciar na diferenciação, migração e fenótipo celular, tendo papel relevante no crescimento e reparo teciduais. É responsável pela ancoragem de células adjacentes,

compartimentalização e preservação da citoarquitetura, além de funcionar como barreira para a filtração de macromoléculas (BOSMANN et al., 1993). Estudos recentes demonstram que a membrana basal modula informações entre as células com as quais interage, através de suas delicadas estruturas, e possíveis variações espaciais e temporárias de seus componentes. Esses componentes são produzidos e depositados pelas células adjacentes, através de interações com receptores celulares específicos, permanecendo ligados à matriz extracelular (TIMPL, 1989; BOSMANN et al., 1989).

A membrana basal, observada através de microscopia eletrônica, apresenta 3 camadas: lâmina lúcida ou rara, lâmina densa e “*pars fbroreticularis*” (LEBLOND & LAURIE, 1986).

A lâmina rara (ou lúcida) é adjacente à membrana celular, sendo reluzente por apresentar baixa densidade. A lâmina densa, elétron-densa, justaposta à rara, representa a camada mais evidente. Ambas possuem espessura semelhante (40 a 60 nm), podendo a mesma variar de acordo com os tecidos e espécies correspondentes (INOUE & LEBLOND, 1988). A “*pars fbroreticularis*” é formada de fibras reticulares, microfibrilas e fibrilas sustentadoras, situando-se entre a lâmina densa e tecido conjuntivo.

Fazem parte da composição da membrana basal os seguintes elementos: colágeno tipo IV, laminina, entactina ou nidogênio, proteoglicano de heparan sulfato e fibronectina (YURCHENCO & SCHITTNY, 1990).

O **colágeno IV** é considerado o maior componente estrutural das membranas basais. Cada molécula de colágeno IV é composta de 3 cadeias, as quais podem ser divididas em 3 domínios: 7S, uma cadeia colágena amino-terminal (N-terminal), um domínio colágeno maior na região média, e NC-1, domínio não-colágeno globular com cadeia

carboxi-terminal. Os trimeros das cadeias α são organizados em forma de triplas hélices nos domínios 7S e colágeno maior, enquanto no domínio NC-1 cada cadeia é envolta por estrutura globular, estabilizada por ligações dissulfídicas. Assim, na cadeia C-terminal, cada molécula contém um glóbulo, podendo fundir-se com o glóbulo de outra molécula, enquanto na N-terminal cada molécula pode ligar-se a 3 outras resultando no chamado colágeno 7S (JOHANSSON et al., 1992). Estudos utilizando membrana basal glomerular bovina, evidenciaram 4 tipos de estruturas monoméricas com peso molecular ao redor de 27 kDa, identificadas como M1a, M1b, M2 e M3. A análise bioquímica dos dois primeiros monômeros mostraram que eles estavam presentes no segmento α_1 e α_2 do domínio NC-1, enquanto os monômeros M3 e M4 faziam parte de 2 novas cadeias chamadas de α_3 e α_4 , respectivamente (DESJARDINS et al., 1990). Sabendo-se que o colágeno tipo IV tem como função principal a formação de estruturas de sustentação, a diversidade de seus componentes pode explicar a heterogeneidade dos arranjos estruturais das membranas basais e, conseqüentemente, suas características funcionais.

A **laminina** é o componente não colágeno mais abundante da membrana basal e o melhor caracterizado. Esta glicoproteína tem peso molecular de 900 kDa, apresentando estrutura em forma de cruz composta de um braço longo (77 nm) e 3 braços curtos (37 nm), com domínios terminais globulares. Ela foi isolada e identificada por CHUNG et al. (1979), constituindo-se de 3 cadeias polipeptídicas: A (400 kDa), B1 e B2 (220 kDa) ligadas entre si por pontes dissulfídicas (ENGVALL, 1993). Tem a propriedade de ligar-se ao colágeno IV "*in vitro*" na presença de nidogênio (AUMAILLEY et al., 1989), apresentando potencial ligação com o proteoglicano de heparan sulfato no segmento C-terminal da cadeia A. Dentre suas principais funções destacam-se adesão, crescimento, motilidade e diferenciação celular, além da capacidade de interagir com células e modular o comportamento celular (BECK, HUNTER, ENGEL, 1990). A laminina pode ainda ligar-se às células através de receptores

pertencentes à família das integrinas, incluindo interações com proteoglicano de heparan sulfato e fosfolípidos (SONNENBERG et al., 1990).

A **entactina**, também denominada de **nidogênio** (TIMPL et al., 1983), foi isolada e identificada por CARLIN et al. (1981). Apresenta peso molecular de aproximadamente 150 kDa, possuindo grande capacidade de ligação celular, além de papel fundamental na síntese da membrana e remodelação tecidual, na embriogênese e cicatrização (WEBER, 1992).

O **proteoglicano de heparan sulfato** foi recentemente isolado da membrana basal glomerular (KANWAR & FARQUHAR, 1979; PARTHASARATHY & SPIRO, 1981) e do tumor EHS (HASSEL et al., 1980). Como outros proteoglicanos contém inúmeras cadeias de glicosaminoglicanos ligadas de forma covalente às cadeias heparan sulfato, conformação que confere à membrana basal propriedades de filtração seletiva dependente de carga e ataque celular. Está presente em várias membranas basais, tendo peso molecular que varia de 500 kDa a 1.000 kDa. As cadeias heparan sulfato, quando liberadas por proteólise dos proteoglicanos, possuem peso molecular médio de 70 kDa, indicando que a molécula intacta contém 6 a 12 dessas cadeias (TIMPL & MARTIN, 1981).

A **fibronectina** é glicoproteína adesiva, com peso molecular de 450 kDa, estando presente nas superfícies celulares, matrizes extracelulares, plasma, líquido amniótico e líquor (HYNES & YAMADA, 1982). Existem 2 tipos de fibronectina, plasmática e celular, as quais são muito semelhantes em composição e atividades biológicas. Dentre suas inúmeras funções, destacam-se adesão e propagação celular a substratos sólidos, como, por exemplo, plástico, gelatina, colágeno e fibrina (KLEINMAN, KLEBE, MARTIN, 1981). Transformação oncogênica, hemostasia e trombose,

migração celular e diferenciação embrionária são outras atividades por ela desenvolvidas (HYNES e YAMADA, 1982).

1.5 MEMBRANA BASAL DA MATRIZ GLOMERULAR: ESTRUTURA E FUNÇÃO

A membrana basal glomerular representa barreira seletiva do glomérulo, relativa à carga e tamanho, restringindo a passagem de proteínas plasmáticas. Estudos experimentais demonstram que macromoléculas são retidas na luz dos capilares glomerulares devido ao seu tamanho, forma e carga elétrica (DEEN, BOHRER, BRENNER, 1979). A função seletiva das paredes dos capilares glomerulares permite restrição quase completa das proteínas de alto peso molecular e da albumina; contudo, proteínas de baixo peso molecular são filtradas livremente e reabsorvidas a nível tubular (TOJO & HITOSHI, 1992).

Embora o glomérulo renal possua 3 matrizes extracelulares distintas, todas são compostas por elementos da membrana basal. A primeira, chamada cápsula de Bowman, consiste de matriz formada por dupla camada de membrana, a qual repousa sobre tecido conectivo intersticial pericapsular. O mesângio, representando a segunda matriz, contém praticamente, só matriz de membrana basal, a qual não é organizada como estrutura laminar comum a outros tecidos. E, a terceira, encontrada nas alças capilares glomerulares, constitui-se numa das membranas basais mais intensamente estudadas.

Todas as membranas basais contém colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos; porém, suas organizações específicas alteram-se de acordo com os tecidos onde se encontram. O colágeno IV representa verdadeiro citoesqueleto da membrana, caracterizando a lâmina densa, sendo, por sua vez, ladeada por camadas distintas: lâmina rara interna e

externa. Esta contém proteoglicano de heparan sulfato ligando-se a proteínas, tais como, laminina, entactina e outras glicoproteínas (SCHLEICHER & OLGEMOLLER, 1992).

Trabalhos utilizando técnica de imuno-histoquímica, revelaram distribuição heterogênea das cadeias de colágeno IV na membrana basal glomerular e matriz mesangial (KIM et al., 1991). Assim, haveria pelo menos 2 tipos diferentes de moléculas de colágeno IV: uma, composta de cadeias clássicas, $\alpha_1(\text{IV})$ e $\alpha_2(\text{IV})$, e outra contendo as cadeias $\alpha_3(\text{IV})$ e $\alpha_4(\text{IV})$. As primeiras encontrar-se-iam na matriz mesangial, cápsula de Bowman e membrana basal tubular, enquanto as últimas seriam características da membrana basal glomerular (KIM et al., 1991). As prováveis explicações para esses achados seriam atribuídas a diferentes locais de síntese, mecanismos de regulação independentes e vias degradatórias distintas. Entretanto, ainda não se conhecem as verdadeiras implicações de tais fatos nas possíveis alterações morfológicas, estruturais e funcionais da nefropatia diabética.

A matriz mesangial glomerular normal contém, além de colágeno IV, os colágenos V e VI; porém, não demonstra colágenos I e III, componentes classicamente conhecidos como fibrilares. Trabalhos feitos com culturas de células mesangiais de rato evidenciaram produção destes últimos componentes, com predomínio do colágeno I (ISHIMURA, STERZEL, BUDDE, 1989). Essa aparente discrepância de dados entre componentes presentes no glomérulo normal e expressão de colágeno em cultura de células mesangiais, corroboram a hipótese de que o mesângio apresenta, "*in vivo*", potencialidade para sintetizar elementos relacionados a processos de cicatrização ou esclerose (HARALSON, JACBSON, HOOVER, 1987).

Outro componente da membrana basal glomerular é a laminina, encontrada quase que totalmente ligada à entactina (nidogênio), sendo

constituída por 3 cadeias diferentes: A, B1 e B2; apresenta estrutura única em forma de cruz, que lhe confere capacidade de ampla interação celular (COUCHMAN, BEAVAN, McCARTHY, 1994).

A fibronectina consiste de glicoproteína também presente em diversas membranas basais, especialmente nas matrizes mesangiais e da cápsula de Bowman. Sua presença na membrana basal glomerular é controversa, porém, parece existir em pequenas quantidades sendo de origem plasmática (OBERLEY & MURPHY-ULLRICH, 1989). Além de poderem interagir com proteoglicanos e colágenos das matrizes extracelulares, muitos domínios da fibronectina podem ligar-se a receptores de superfície celular. Essas interações podem modular o comportamento celular através de eventos com sinalização transmembrana.

O proteoglicano de heparan sulfato constitui outro importante elemento da membrana basal renal. Ele compreende 3 cadeias laterais de heparan sulfato covalentemente ligadas à cadeia polipeptídica monomérica, com alto peso molecular (467 kDa), obtidas de linhagem celular de fibrossarcoma humano (KALLUNKI & TRYGGVASON, 1992). As cadeias laterais sulfatadas formam a barreira aniônica da unidade de filtração glomerular, desde que administração de anticorpos monoclonais dirigidos contra heparan sulfato, em ratos, resulta em albuminúria (van den BORN et al., 1992). Outra comprovação deste papel foi fornecida através de estudos utilizando tecidos renais humanos, onde a digestão específica das cadeias de heparan sulfato levam à penetração de proteínas aniônicas, como albumina e ferritina, para dentro da membrana basal glomerular (SCHLEICHER et al., 1989). Ligação e seqüestro de fatores de crescimento, além de adesão celular, são exemplos de outras importantes funções desse proteoglicano. SAKSELA & RIFKIN (1990) utilizando cultura de células endoteliais, demonstraram que o fator de crescimento de fibroblasto podia ligar-se fortemente ao heparan sulfato.

Desde que esse fator de crescimento exerce relevante papel nas doenças renais proliferativas, essa propriedade do proteoglicano renal merece destaque especial.

A **Tabela 01** (pág. 18) resume a estrutura e função dos componentes da matriz extracelular glomerular e suas propriedades moleculares.

1.6 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, BIOQUÍMICAS E FUNCIONAIS DA MATRIZ GLOMERULAR DIABÉTICA

As alterações morfológicas mais representativas da nefropatia diabética humana são espessamento da membrana basal glomerular e expansão da matriz mesangial. Desta maneira, inúmeras linhas de investigação, utilizando métodos imuno-histoquímicos, apontam o valor do aumento da deposição de componentes da matriz extracelular na patogênese da alteração renal no *diabetes*.

NERLICH & SCHLEICHER (1991) demonstraram, através de técnica de imuno-histoquímica e anticorpos monoclonais contra os vários componentes da membrana basal, alterações na matriz extracelular durante o desenvolvimento da nefropatia diabética.

Rins diabéticos com lesões leves (glomerulosclerose difusa inicial) apresentam aumento na intensidade de reação para todos elementos da membrana basal, exceto para proteoglicano de heparan sulfato; esse aumento tende a progredir com a piora da nefropatia, especialmente com relação às cadeias α_1 e α_2 do colágeno IV na matriz mesangial (KIM et al., 1991).

Tabela 01 Estrutura e função dos componentes da membrana basal glomerular e da matriz mesangial.

Componentes	Estrutura	Função
Colágeno tipo IV	Tripla hélice com segmentos não-helicoidais; 5 cadeias diferentes com 1.700 aminoácidos conhecidos.	Barreira tamanho-seletiva para passagem de moléculas e sustentação.
Cadeias α_1 e α_2	Presentes na matriz mesangial, cápsula de Bowman e membrana basal glomerular.	
Cadeias α_3 e α_4	Presentes somente na membrana basal glomerular.	
Laminina	3 cadeias polipeptídicas diferentes: A, B1 e B2 com peso molecular de 800 kDa.	Adesão celular.
Entactina (nidogênio)	1 cadeia polipeptídica com peso molecular de 140 kDa.	Idem à laminina.
Proteoglicano de heparan sulfato	3 cadeias laterais de heparan sulfato ligadas covalentemente a cadeia polipeptídica de 470 kDa.	Barreira seletiva de carga e crescimento celular.

Fonte: OLGEMÖLLER & SCHLEICHER (1992).

Observam-se, também, maior padrão de coloração para o colágeno V e ausência de proteoglicano de heparan sulfato mesangial. As cadeias α_3 e α_4 do colágeno IV mostram intensa reação de coloração na membrana basal glomerular espessada.

Contudo, na fase mais avançada da nefropatia, quando há lesões nodulares mais pronunciadas, verifica-se diminuição de coloração das cadeias α_1 e α_2 , laminina e fibronectina. Esses componentes, acrescidos de colágeno III, aparecem apenas na periferia dos nódulos, enquanto nas áreas hipocelulares centrais ocorre predomínio de colágeno V (NERLICH & SCHLEICHER, 1991). É importante ressaltar que colágeno I não está presente nas fases de lesões difusas ou nodulares; esse fato determina diferença marcante entre o processo de nefropatia diabética e o reparativo, dado que durante a cicatrização ambos, colágeno I e III, são sintetizados. Desta forma, durante o desenvolvimento da nefropatia diabética ocorre aumento de colágeno V, cadeias α_1 e α_2 de colágeno IV, laminina e fibronectina. Por outro lado, em estágios precoces da doença, há diminuição de proteoglicano de heparan sulfato. Presença de colágeno III na fase de glomerulosclerose difusa, com aumento progressivo na fase nodular, e ausência de tal componente em glomérulos normais, são fatos que poderiam refletir irreversibilidade desse processo patológico renal (OLGEMOLLER, 1993).

Recentemente, MAKINO et al. (1993) utilizando microscopias eletrônica de alta resolução e imunoeletrônica, descreveram importantes alterações ultraestruturais da matriz extracelular glomerular renal de pacientes com nefropatia diabética.

Dentre os achados, destacam-se: diminuição de densidade das partículas imunodetectadas para colágeno IV e proteoglicano de heparan sulfato, aumento do número absoluto de tais partículas para colágeno IV e maior

frequência e diâmetro de poros da membrana basal glomerular. Portanto, a diminuição de densidade e redistribuição dessas macromoléculas poderiam contribuir para perda da barreira seletiva da membrana basal, desencadeando nefropatia diabética.

Assim, estudos ultraestruturais, imuno-histoquímicos e bioquímicos, utilizando modelos animais e humanos, objetivam maior entendimento das alterações, qualitativas e quantitativas, que ocorrem durante o desenvolvimento das complicações diabéticas. Aumento de “turnover” e síntese de todos os componentes da matriz extracelular glomerular, exceto proteoglicano de heparan sulfato, associado a alterações enzimáticas, tais como diminuição da atividade da protease lisossomal (SCHAFER et al., 1992), constituem prováveis mecanismos desencadeadores da nefropatia diabética.

Estudos epidemiológicos apontam papel da hiperglicemia no desencadeamento da doença renal no *diabetes mellitus* (LARKIN & DUNLOP, 1992). São 3 os principais mecanismos bioquímicos envolvidos nesse processo: ação direta da hiperglicemia nas células, glicosilação não-enzimática das proteínas da matriz extracelular e via de polióis.

Na primeira possibilidade, a concentração elevada de glicose determinaria alterações na composição da membrana basal, teoria suportada por inúmeros trabalhos. Desta forma, LEDBETTER et al. (1990) demonstraram aumento dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) para cadeia α_1 de colágeno IV em rins de ratos diabéticos, utilizando técnica de “immunoblotting”. Estudos envolvendo cultura de células mesangiais de ratos diabéticos evidenciaram que a exposição prolongada a altas concentrações de glicose levam ao aumento da síntese de colágeno IV, laminina e fibronectina (HANEDA et al., 1991). Além disso, células mesangiais expostas à hiperglicemia sintetizam menos proteoglicano de

heparan sulfato (OLGEMOLLER et al., 1992). Elevação dos níveis de mRNA glomerular da cadeia α_1 do colágeno IV e das cadeias B1 e B2 da laminina foi demonstrada em 2 trabalhos independentes, utilizando rins de ratos diabéticos (FUKUI et al., 1992; LEDBETTER et al., 1990). Essas modificações precedem o espessamento da membrana basal, podendo ser revertidas com a normalização da glicemia, através de insulino-terapia. Torna-se claro, que a síntese aumentada do colágeno IV, laminina e fibronectina representa alteração bioquímica correlacionada ao desencadeamento de expansão da matriz mesangial e espessamento da membrana basal glomerular observadas histologicamente.

No segundo mecanismo fisio-patológico, a glicosilação não-enzimática das proteínas da matriz extracelular glomerular, decorrentes de níveis elevados de glicemia, promoveriam complicações renais tardias. BROWNLEE, CERAMI, VLASSARA, (1988) demonstraram que a extensão da glicosilação é dependente da concentração de glicose e da meia-vida das proteínas envolvidas no processo em questão. Numerosos trabalhos, estudando vários tecidos de indivíduos diabéticos e não-diabéticos, mostram que o nível de glicose ligada de forma não enzimática está aumentado em vasos arteriais, membranas basais glomerulares, tecidos conjuntivos e nervos periféricos, existindo correlação direta entre intensidade e extensão de complicação e quantidade de glicosilação de proteínas (VOGT, SCHLEICHER, WIELAND, 1982). O desenvolvimento das complicações diabéticas também pode ser explicado pela formação de “produtos finais de glicosilação avançada”. Esses produtos são resultado da glicosilação de proteínas com vida-média longa, onde resíduos glicosilados lisil reagem com grupos aminos livres, formando ligações não fisiológicas. Com isso, ocorre a síntese e secreção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento-1 (IGF-1), quando esses produtos finais se ligam a receptores específicos identificados em macrófagos (VLASSARA, BROWNLEE, CERAMI, 1986). Essas citocinas podem aumentar a

síntese de componentes da matriz extracelular e alterar a permeabilidade vascular. Recentemente, DOI et al. (1992) identificaram ação dos produtos finais de glicosilação em células mesangiais de camundongos, através de fator de crescimento derivado de plaquetas, promovendo síntese celular aumentada de colágeno IV, laminina e proteoglicano de heparan sulfato. Por outro lado, ratos diabéticos submetidos à administração de aminoguanetidina, componente inibidor da formação de produtos finais de glicosilação, apresentam menor comprometimento de suas paredes arteriais, quando comparados a controles não tratados (BROWNLEE et al., 1986).

O último processo envolve a participação do sorbitol intracelular, decorrente da hiperglicemia crônica. O acúmulo de sorbitol ocorre em vários tecidos, dentre eles, neurônios periféricos, cristalino e túbulos renais, como demonstrado em ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina (SCHMOLKE, SCHLEICHER, GUDER, 1992). A teoria da depleção de inositol, sugerida por GREENE (1988), sugere que os danos teciduais sejam decorrentes da diminuição da captação de mio-inositol, embora essa captação seja inibida, de forma competitiva, pela D-glicose, e, de forma não competitiva, pelo sorbitol intracelular hiperosmolar (LI et al., 1986). Estudos recentes mostram que tais células podem contraregular a depleção de inositol. Portanto, ainda não existe consenso firmado de que o aumento do sorbitol intracelular seja causa de alterações funcionais teciduais no *diabetes mellitus*. McCALEB et al. (1991) questionaram essa teoria quando, após tratar por 6 meses ratos diabéticos com inibidor de aldose-reductase, não obtiveram queda significativa da excreção de albumina urinária, sugerindo que outros mecanismos bioquímicos devam estar contribuindo para a glomerulopatia diabética.

Finalmente, o fator genético pode estar envolvido na gênese da glomerulosclerose diabética, uma vez que nem todos os pacientes

portadores de *diabetes* apresentam tal complicação. Polimorfismo de enzimas relacionadas ao metabolismo da matriz extracelular, pode ser a causa principal para tal variação na susceptibilidade genética em desenvolver albuminúria e outras complicações associadas (DECKERT et al., 1991). De acordo com essa teoria, pacientes diabéticos portadores de isoenzimas envolvidas na síntese de proteoglicano de heparan sulfato, sensíveis ao mau controle metabólico, evoluíram para nefropatia diabética; por outro lado, os portadores de isoenzimas menos vulneráveis, seriam protegidos de tal complicação. Esse mesmo estudo evidenciou diminuição da síntese desse proteoglicano somente em fibroblastos de pacientes com albuminúria. Na teoria patogénica postulada por ROHRBACH et al. (1982), a redução do proteoglicano de heparan sulfato glomerular desencadearia aumento de material extracelular, culminando com espessamento da membrana basal. Estudos bioquímicos apontam para o fato de que a hiperglicemia estimula a síntese de fibronectina, laminina e colágeno IV através de ação direta nas células mesangiais ou via formação de produtos finais de glicosilação não enzimática. Além disso, níveis de glicose aumentados produzem citocinas que contribuem para desequilíbrio do metabolismo proteico da matriz glomerular. Células mesangiais podem sintetizar grandes quantidades de diacilglicerol (DAG), intermediário do metabolismo de glicerolípides, quando submetidas a altas concentrações de glicose; esse composto participa da ativação da proteína quinase C, enzima chave na transdução de sinais extracelulares recebidos pelas células, tais como, fatores de crescimento, hormônios, drogas, etc, além de promover outras funções celulares, como a de proliferação.

AYO et al. (1990) demonstraram que células tratadas com análogo de DAG aumentavam significativamente as quantidades de fibronectina, laminina e colágeno IV, via ativação da proteína quinase C. Outro mecanismo envolvido na proliferação mesangial refere-se ao aumento da síntese e expressão endógena do fator transformador de crescimento- β

(TGF- β), em condições de hiperglicemia (WOLF et al., 1992). Tal fator induziria a secreção de proteínas da matriz glomerular, levando à expansão mesangial e ao espessamento da membrana basal. Paralelamente, a formação de produtos finais de glicosilação enzimática, após exposição prolongada à hiperglicemia, acarretaria em secreção de citocinas; estas, por sua vez, aumentariam a síntese de material extracelular. Entretanto, nenhuma dessas possibilidades explica a diminuição do conteúdo de heparan sulfato observado nos diabéticos.

Muitos estudos ainda serão necessários para que possam ser esclarecidos todos os mecanismos responsáveis pelas complicações crônicas do *diabetes mellitus*. Porém, a hiperglicemia continua sendo a principal causadora de tais eventos. Conseqüentemente, terapêuticas relacionadas à normalização do metabolismo alterado da glicose, como inibidores da via de polióis e da formação de produtos finais de glicosilação, têm-se destacado na prevenção, e provável tratamento, da microangiopatia diabética.

1.7 CORRELAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS DA NEFROPATIA DIABÉTICA

O espessamento da membrana basal, detectável após 2 anos de *diabetes*, é geralmente uniforme, envolvendo, primariamente, a lâmina densa (MAUER et al., 1984). Inúmeros estudos reforçam a heterogeneidade estrutural da matriz extracelular glomerular, indicando que as alterações dos componentes de membrana basal na nefropatia diabética são local-específicas. Assim, cadeias α_3 e α_4 de colágeno IV têm sua expressão aumentada ao longo de todo processo de instalação da complicação, permanecendo em estágios avançados da doença, enquanto cadeias α_1 e α_2 apresentam intensidade de reação diminuída à imuno-histoquímica na

parte interna (endotelial) da membrana basal glomerular (KIM et al., 1991). Semelhantemente, proteoglicano de heparan sulfato encontra-se reduzido na porção subepitelial da membrana, em fases muito tardias, quando os pacientes já apresentam proteinúria; esse componente mantém-se preservado nos estágios precoces e intermediários (normo ou microalbuminúria) do *diabetes* (VERNIER et al., 1992).

Esses dados fortalecem a teoria de que alterações estruturais de células epiteliais somente ocorram na presença de mudanças estruturais avançadas do *diabetes*, como expansão mesangial (ELLIS et al., 1987). Adicionalmente, espessamento da membrana basal glomerular não associa-se com alterações específicas dos componentes da matriz extracelular glomerular; porém, lesões tardias estão relacionadas com aumento ou diminuição de alguns desses componentes. MAUER (1994) coloca questão conceitual na discussão da nefropatia diabética, quando diferencia fatores ligados à progressão e à gênese da doença. Assim, alterações tardias estariam envolvidas com a evolução da complicação, enquanto as precoces, como espessamento da membrana basal, correlacionar-se-iam mais estreitamente com a gênese da doença renal no *diabetes*.

Com relação ao mesângio, sabe-se que aproximadamente 2/3 de sua expansão é conseqüente a acúmulo de matriz, ficando o restante como secundário ao aumento e/ou multiplicação celular (STEFFES et al., 1992), e que, inicialmente, o mesângio expandido contém quantidades elevadas de antígenos não usuais a ele (FALK et al., 1983). Ao contrário, na expansão mesangial avançada (glomerulosclerose difusa) ocorre diminuição das cadeias α_1 e α_2 de colágeno IV e de laminina, com aumento de deposição dos colágenos I e II (KIM et al., 1991).

A expansão do mesângio é conseqüente ao aumento absoluto e relativo do volume da matriz mesangial, estando intimamente ligada à função renal

na nefropatia diabética. Existe correlação inversa entre fração de volume mesangial e taxa de filtração glomerular (MAUER et al., 1984), provavelmente por comprometimento estrutural dos capilares glomerulares. A superfície de filtração glomerular inclui 3 componentes: membrana basal, célula endotelial e interface da célula epitelial; não existindo nenhuma participação mesangial nesse processo. Como o volume relativo do glomérulo ocupado pelo mesângio aumenta, há diminuição, também relativa, da superfície de filtração da parede capilar periférica. Por conseguinte, a soma dessa filtração por unidade glomerular é diretamente proporcional à taxa de filtração glomerular (ØSTERBY et al., 1988).

A progressão da expansão mesangial associa-se, freqüentemente, a manifestações da nefropatia declarada, como diminuição da taxa de filtração glomerular, proteinúria e hipertensão. Contudo, 25% dos pacientes com essas alterações não mostram elevação da pressão arterial (MAUER et al., 1984). Por outro lado, pacientes diabéticos insulino-dependentes, com graus discretos e/ou moderados de expansão mesangial, podem apresentá-la.

Excreção de albumina urinária constitui fator preditivo relevante no desencadeamento da hipertensão arterial e nefropatia declarada, estabelecendo limite entre a fase passível de tratamento com reversão do quadro e a irreversível (CHIVERS et al., 1989; STEFFES et al., 1989). Essa alteração renal pode ser conseqüente a distúrbios hemodinâmicos (HOSTETTER et al., 1982), e/ou desordens bioquímicas na composição da membrana basal glomerular, resultando em perda da barreira seletiva de carga (CHAKRABARTI et al., 1989).

Gambaro et al. (1992) demonstraram que alterações renais, tanto morfológicas quanto funcionais, podiam ser prevenidas pela administração de glicosaminoglicanos; assim, ratos diabéticos, sem insulino-terapia,

acompanhados por 8 meses sob essa intervenção, não manifestavam espessamento de membrana basal, diminuição de carga aniônica, hiperfiltração glomerular ou microalbuminúria. Portanto, glicosaminoglicanos devem ter outro mecanismo de ação, além da manutenção de carga aniônica, para explicar o não aparecimento de complicações (morfológicas e hemodinâmicas), uma vez que o fator hiperglicemia esteve presente em todo o tempo do experimento.

A membrana basal tubular renal também sofre alterações decorrentes da hiperglicemia. Essas podem ser divididas em 2 fases: precoce e tardia. Na precoce, ocorre hipertrofia tubular e aumento de síntese de vários componentes da matriz extracelular. SEYER-HANSEN, HANSEN, GUNDERSON, (1980) identificaram aumento do comprimento, do volume celular e do diâmetro da luz do túbulo proximal renal em modelo animal de *diabetes*, já no 4º dia de instalação da doença. Posteriormente, estudos "*in vitro*" indicam elevação da produção de colágeno IV, com envolvimento de mecanismos como glicosilação não-enzimática das proteínas e via dos polióis, além de espessamento da membrana basal tubular. WEIL, NOZAWA, KOSS, (1976) observaram vacuolização, corpúsculos mielóides e dilatação de retículo endoplasmático em células tubulares proximais de ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina.

Recentemente, alguns trabalhos destacam a importância da presença de distúrbios na reabsorção tubular renal na nefropatia diabética, incluindo o aparecimento de proteínas de baixo peso molecular (KANEDA & IWAO, 1992; CHOUTNARD, VIAU, GRESELIN, 1992a). Essas proteínas são a N-acetil glucosaminidase β , galactosidase β , aminopeptidase alanina, β_2 microglobulina e desidrogenase láctica. CHOUTNARD, VIAU, GRESELIN (1992a) verificaram aumentos significativos de tais elementos em urina de ratos tornados diabéticos, a partir da 1ª semana de doença. Essa disfunção tubular ocorre em fase precoce de nefropatia, na ausência de alterações glomerulares, uma vez que microalbuminúria não encontra-

se presente. O aparecimento de proteinúria tubular poderia indicar diminuição da capacidade reabsortiva proximal renal, constituindo teste sensível para detecção de alteração tubular em ratos (VIAU et al., 1986).

O emprego de métodos radio-imuno-químicos possibilitou a avaliação do estudo metabólico da membrana basal, através da quantificação das concentrações urinárias e séricas de seus componentes, como colágeno IV e laminina (RISTELI et al., 1982; PIETCHMANN et al., 1988; MATSUMOTO et al., 1990). HOGEMANN et al. (1986) demonstraram aumento dos níveis séricos de colágeno IV e laminina em pacientes portadores de *diabetes* quando comparados a grupos controle. Concentrações séricas aumentadas de laminina também foram evidenciadas na nefropatia diabética avançada (PIETCHMANN et al., 1988). RISTELI et al. (1982) verificaram aumento das concentrações séricas de colágeno IV e laminina, através de técnica de radioimunoensaio, em ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina, decaindo para valores próximos aos normais após insulinoaterapia. Adicionalmente, estudos relacionados à microangiopatia diabética, evidenciaram aumento dos mesmos componentes de membrana basal, tanto sérico quanto urinário, em pacientes controle e diabéticos, correlacionando-os com diferentes estágios da nefropatia diabética (HAGASHI, MAKINO, OTA, 1992).

Portanto, níveis séricos e urinários de colágeno IV e laminina poderiam servir como marcadores de possíveis alterações de membrana basal no *diabetes mellitus*, auxiliando no diagnóstico precoce de complicações diabéticas.

Contudo, não há na literatura referência disponível sobre demonstração de alterações e possíveis diferenças, na excreção urinária de componentes de membrana basal, em animais diabéticos-induzido por drogas, em função

do tempo de doença, como indicador de prognóstico no *diabetes mellitus*, sugerido por HAGASHI et al. no *diabetes* em humanos.

1.8 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais da membrana basal têm sido demonstradas em vários órgãos e tecidos no *diabetes* experimental e humano. Estudos bioquímicos e imuno-histoquímicos objetivam caracterizar as mudanças ocorridas nos componentes de membrana basal, especialmente a glomerular, destacando-se: colágeno IV, laminina, proteoglicano de heparan sulfato e fibronectina.

Além disto, existe possível correlação cronológica entre a alteração desses componentes e o aparecimento de mudanças estruturais e hemodinâmicas, desencadeando complicações diabéticas, como a nefropatia.

Desta forma, o *diabetes* induzido por drogas constitui um dos muitos modelos utilizados para melhor elucidação de tais mecanismos patológicos, contribuindo como valiosa ferramenta na procura de fatores prognósticos concretos, bem como eventuais intervenções precoces que visam impedir o aparecimento das temíveis complicações crônicas do *diabetes mellitus*.

Assim, o trabalho teve como principais objetivos:

- 1) Identificar presença de colágeno IV e laminina excretados na urina de animais diabéticos-induzido por drogas (aloxana e estreptozotocina), em função do tempo de doença.
- 2) Estudar e caracterizar tais componentes urinários, verificando se eles são os mesmos em ambos os modelos.

- 3) Utilizar esses componentes excretados na urina como marcadores de prognóstico de complicações no *diabetes mellitus*.
- 4) Estudar função renal, glomerular e tubular, na evolução da nefropatia diabética, comparando-a nos 2 modelos empregados.
- 5) Verificar possíveis correlações morfo-bioquímico-funcionais renais envolvidas nos processos de instalação e desenvolvimento do *diabetes* induzido por drogas.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais utilizados eram da linhagem Wistar-Hannover (WH), machos, com idade acima de 8 semanas, pesando, preferencialmente, entre 150 e 200 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

2.2 DROGAS DE INDUÇÃO DE *DIABETES MELLITUS*

Aloxana (Sigma, cat. A: 8128)

Estreptozotocina (Sigma, cat. S: 0130)

Controle (Solução Salina Estéril)

2.3 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE *DIABETES MELLITUS*

Após jejum de 16 horas, os animais eram injetados com aloxana na dose de 50 mg/kg/peso/rato, ou estreptozotocina na dose de 70 mg/kg/peso/rato, homogeneizadas em solução de citrato, pH 4,5, por via endovenosa (EV).

2.4

NÚMERO DE ANIMAIS POR GRUPO EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho, dois grupos de animais eram formados, segundo metodologia empregada.

Avaliação da Função Renal e Estudos de MO e Imuno-Histoquímica

Eram utilizados ratos agrupados em número mínimo de 2 e máximo de 12, estudados em seguimentos independentes, de acordo com o tempo de instalação de *diabetes* (dias: 2, 10, 28 e 56), conforme mostra o **Gráfico 01** (pág. 33).

Parâmetros fisiológicos, avaliação qualitativa da proteinúria e da expressão antigênica de colágeno IV e laminina através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS seguida de “immunoblotting”

Tais avaliações eram realizadas através de 15 ratos Wistar, distribuídos em número de 5 para cada um dos 3 grupos: controle, aloxana e estreptozotocina. Tais animais, após indução de DM por droga, ou salina em controles, eram seguidos por 56 dias após instalação da doença, como representado no **Gráfico 02** (pág. 34).

2.5

CRITÉRIO PARA DIAGNÓSTICO DE *DIABETES MELLITUS*

Para o diagnóstico do *diabetes*, optava-se pela monitorização das glicosúrias através de tiras reagentes da marca Boehringer.

Gráfico 01 Protocolo de indução de DM e estudo de diferentes grupos de animais, analisados em seguimentos independentes em função do tempo de doença.

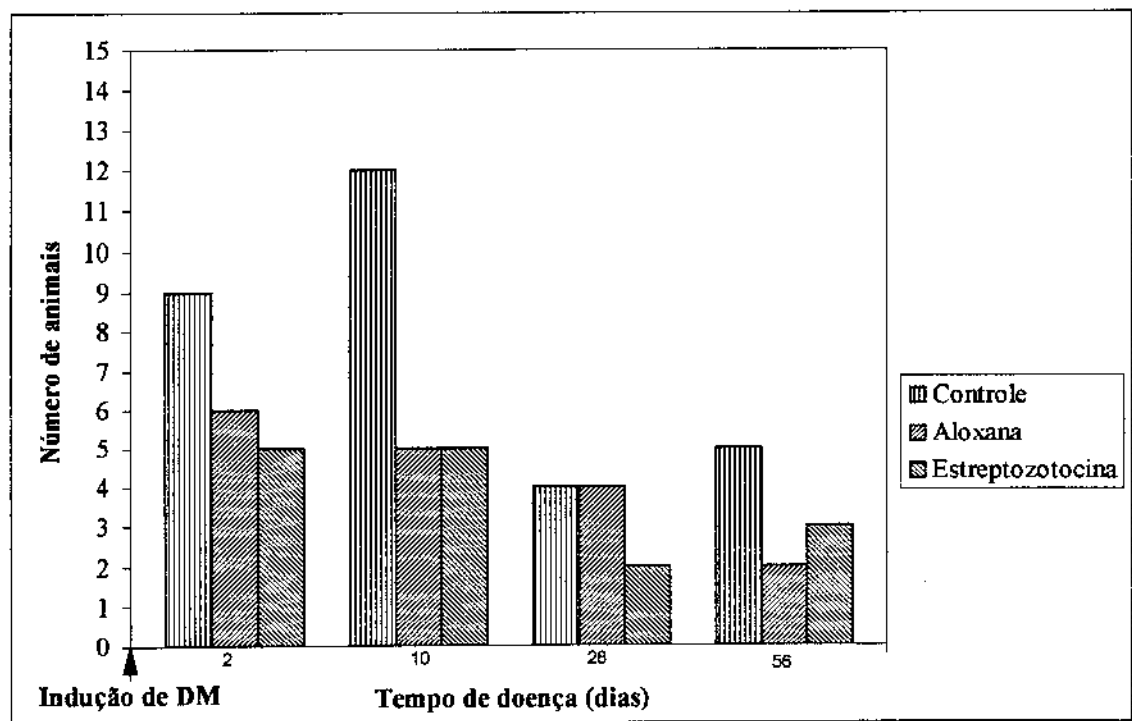
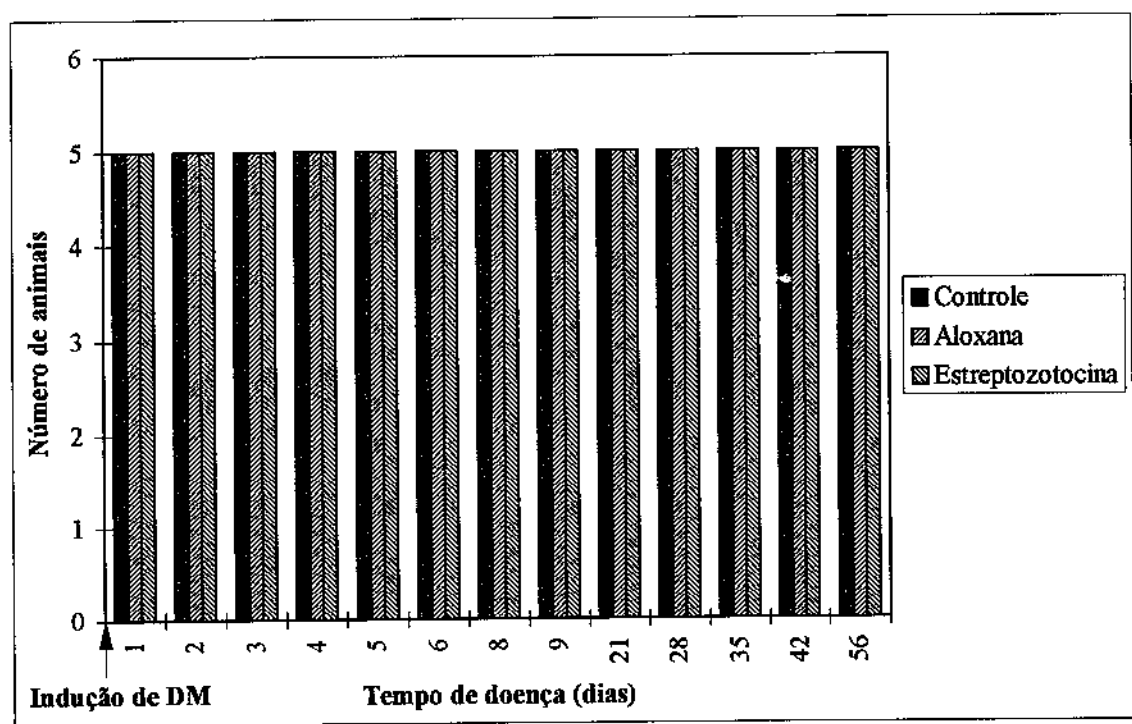


Gráfico 02 Protocolo de indução de DM e seguimento linear dos animais estudados ao longo do tempo de doença.



2.6

CRITÉRIO DE INCLUSÃO PARA ESTUDO

O animal somente era selecionado para o grupo experimental se apresentasse valores de glicosúrias ≥ 4 cruces (++++).

2.7

COLETA DA URINA E SANGUE

A coleta de urina dos animais utilizados para estudos bioquímicos e imunoquímicos era realizada da seguinte forma: os animais eram colocados em gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável (Movart, Ribeirão Preto, SP, ref. 306), no final da tarde do dia 0 do experimento padrão, onde permaneciam 15 horas, providos de água sem alimento, tendo seus pesos anotados previamente. Ao fim desse período, os volumes urinários eram anotados e coletados em provetas estéreis com 0,02% de azida sódica, sendo, posteriormente, alicotadas e armazenadas para análise bioquímica.

Na manhã seguinte, os animais eram pesados, agrupados em grupos de 5 e injetados com aloxana, estreptozotocina ou salina EV, conforme protocolo já descrito previamente, sendo seus pesos e volumes urinários monitorizados conforme parágrafo anterior, seguidos diariamente até o 9º dia de instalação de doença e, posteriormente, nos 21º, 28º, 35º, 42º e 56º dias.

Para dosagem de glicemia, procedia-se à coleta de sangue venoso, através de amputação da cauda, dos animais estudados, imediatamente após coleta de suas urinas, somente nos 2º, 10º, 28º e 56º dias do protocolo.

2.8 CONTROLE DA DIETA

O alimento empregado era ração balanceada, marca NUVILAB CR1-autoclavável, firma NUVITAL Nutrientes Ltda.

2.9 PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS E IMUNOQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS

2.9.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS

A análise das proteínas excretadas na urina dos animais experimentais era realizada, numa primeira fase, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em placa vertical de vidro lavada e desengordurada, seguindo basicamente o método de LAEMMLI (1970), modificado por SAUAIA & LAICINI (1977) e com adaptações desenvolvidas do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LICA).

A eletroforese apresentava as seguintes características:

Dimensões da Placa		Concentração do Gel	
Comprimento	14 cm	Gel de Empilhamento	5%
Largura	16 cm	Gel de Separação	8, 10 ou 14%
Espessura	0,2 cm	Amperagem	40 mA (*)

(*) Durante todo o processo

O corante azul de bromofenol era utilizado para orientação quanto à extensão da migração, de tal forma que a corrente era interrompida quando a linha do corante alcançava 1 cm da borda inferior do gel. Solução padrão foi utilizada como referência, contendo proteínas de peso molecular conhecido: miosina de músculo de coelho de 205 kDa, β

galactosidase de *Escherichia coli* de 116 kDa; fosforilase b de músculo de coelho de 97,4 kDa; albumina bovina de 66 kDa; ovoalbumina de 45 kDa e anidrase carbônica de eritrócitos bovinos de 29 kDa (MW-SDS-200 para pesos moleculares, Sigma Chemical Co., EUA).

A coloração dos peptídeos separados ao longo do gel foi realizada através de solução 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R 250, 45% de metanol e 10% de ácido acético durante uma noite. O excesso de corante era retirado com solução de 45% de metanol e 10% de ácido acético, seguindo-se secagem e posterior documentação. As amostras provenientes de cada urina foram preparadas para uma concentração em torno de 1mg/ml/urina, não concentrada, em tampão de amostra, sendo aplicados 120 µg de proteínas em cada poço.

2.9.2 Eletroforese de Transferência seguida de “Immunoblotting”

Foram realizadas eletroforeses em gel de separação a 14 e 12%, em poliacrilamida-SDS, como descrito acima, sendo aplicados, respectivamente, 60 µg de colágeno tipo IV (cod. C7521, ácido solúvel, de placenta humana, Sigma Chemical Co., EUA) e 40 µg de laminina (cod. L2020, de membrana basal de sarcoma de EHS em camundongo, Sigma Chemical Co., EUA) em cada poço, após redução das pontes dissulfídicas acrescentando-se 10% de 2-mercaptoetanol, seguida de fervura por 2 minutos. Urinas concentradas em polietilenoglicol, também reduzidas e desnaturadas, dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana ou estreptozotocina, foram aplicadas nos demais poços do gel numa concentração cerca de 20 vezes maior à utilizada anteriormente. Posteriormente à eletroforese das amostras, o gel foi transportado para a cuba de transferência utilizando-se tampão TRIS 24,8 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, acrescido de 20% de metanol. Assim, o material era transferido do gel para membrana de nitrocelulose (cod.

162-0115, 0,45 μ m, Bio-Rad Laboratories, EUA). Este procedimento seguiu-se de incubação à temperatura de 4°C, durante uma noite, fixando-se a corrente em 50 mA, segundo a técnica descrita por TOWBIN, STAEBELIN, GORDON (1979), modificada por De BLAS & CHERWINSKI (1983), com adaptações do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia. Foram analisadas todas as urinas dos ratos controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina.

Após a eletroforese, a membrana era acondicionada em recipiente contendo tampão de lavagem (PBS sem azida), efetuando-se 3 trocas, com duração de 5 minutos cada, à temperatura ambiente sob agitação suave. Após este procedimento, adicionava-se solução de bloqueio (3% de soro fetal bovino, 0,03% de gelatina, 0,05% de Tween 20 em PBS sem azida) dos sítios de ligação inespecífica, sob agitação suave, à temperatura ambiente, por 60 minutos. Procedia-se à nova lavagem das tiras com 3 trocas com tampão de lavagem, durante 5 minutos cada. Seguia-se a incubação das urinas dos animais experimentais com anticorpos policlonais monoespecíficas de coelho anti-colágeno IV e anti-laminina, na diluição de 1:200 e 1:500, respectivamente, em 1,5% de SFB e 0,015% de gelatina com 0,025% de Tween 20, em PBS sem azida durante uma noite, a 4°C. A solução era aspirada, sendo lavada posteriormente, com 3 trocas de tampão, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Seguia-se incubação da membrana durante uma hora com IgG de cabra anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Abbot Laboratórios do Brasil, diluição 1:1000), na proporção de 0,3 ml: 20 ml de 1,5% de SFB e 0,015% de gelatina com 0,025% de Tween 20 em PBS sem azida, à temperatura ambiente, sob agitação suave. Repetiam-se aspiração e 3 trocas com tampão de lavagem, com posterior incubação com solução de 3,3 diamino-benzidina (DAB, Sigma Chemical Co., EUA), cuja preparação era de 50 mg do reagente dissolvidos em 100 ml de PBS sem azida, seguida de filtração. Solução de cloreto de cobalto e 1% de sulfato de níquel (1 μ l/ml) eram adicionadas, logo após, deixando-se sob agitação

suave cerca de 10 minutos, à temperatura ambiente, para revelação com solução de 30% de H_2O_2 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Finalmente, aspirava-se a solução finalizando a reação com água deionizada. Os procedimentos eram documentados através de processamento das imagens obtidas por “*scanner*”, sendo fotografadas posteriormente.

2.10 FUNÇÃO RENAL

O estudo da função renal dos animais do protocolo experimental se desenvolvia através das análises do clearance de creatinina endógeno e manipulação tubular de sódio (Na), além das dosagens de proteinúria e albuminúria.

2.10.1 Clearance de Creatinina Endógeno

Concentrações de creatinina plasmática e urinária eram dosadas, espectrofotometricamente, segundo método colorimétrico de Brod-Sirota (1973). O clearance de creatinina (Ccr) era utilizado para estimar a taxa de filtração glomerular.

2.10.2 Estudo da Manipulação Tubular de Sódio (Na)

Realizado através do clearance de lítio, segundo método de THOMSEN (1984a), conforme descrito resumidamente a seguir:

- Iniciando-se às 8:00 horas da manhã, os animais recebiam cloreto de lítio (Merck) na dose de 0,06 mEq/100 g de peso corporal, administrado por gavagem, 14 horas antes do início dos experimentos. A partir deste

momento cada rato era colocado em uma gaiola metabólica, sem restrição de movimentos, em jejum para ração sólida e ingerindo água *ad libitum*.

- Os animais eram submetidos a período experimental de 2 horas, sendo administrada neste intervalo, sobrecarga hídrica de 10% do peso corporal, através de gavagem, para obtenção de fluxo urinário regular e estável, procedimento desenvolvido em 2 etapas: a primeira, constituída de volume de água correspondente a 5% do peso, chamada de 1ª sobrecarga hídrica (1ª SH), seguida de outra, de igual volume, após 60 minutos, chamada de 2ª sobrecarga hídrica (2ª SH). Após tempo de equilíbrio de 20 minutos, iniciava-se coleta urinária por período de 2 horas. No final do experimento, procedia-se à coleta de amostras sanguíneas, através de punção cardíaca, e de rins, sob anestesia com éter etílico.

2.10.3 Dosagem de Lítio e Sódio

Concentrações plasmática e urinária de lítio (Li) e sódio (Na) eram realizadas por fotômetro de chama, e os resultados expressos em mEq/ml (HOLD, 1947).

2.10.4 Fórmulas Utilizadas

Eram utilizadas as seguintes fórmulas para os cálculos dos resultados apresentados:

2.10.4.1 - Clearance de Creatinina (Ccr) e de Lítio (Cli)

Clearance = $U \times V' / P$ ($\mu\text{l}/\text{min}$),

onde: U é a concentração urinária de creatinina ou lítio, V' é o volume urinário por minuto e P é a concentração plasmática de creatinina ou lítio.

2.10.4.2 - Fração de Excreção de Sódio (FENa)

$$FENa = U \times P_{cr} / P \times U_{cr} (\%),$$

onde: U é a concentração urinária de Na; P_{cr} é a concentração plasmática de creatinina; P é a concentração plasmática de Na e U_{cr} é a concentração urinária de creatinina.

2.10.4.3 - Reabsorção Proximal Fracional de Sódio (RPNa)

$$RPNa = CF - AD / CF \times 100 (\%),$$

representa a fração de carga filtrada de sódio que foi reabsorvida pelo túbulo proximal; onde, CF é a carga filtrada de sódio e AD é o aporte distal de sódio.

2.10.4.4 - Reabsorção Pós-Proximal Fracional de Sódio (RPPNa)

$$RPPNa = (U_{na} \times V') / AD \times 100 (\%),$$

representa a fração do aporte distal que foi reabsorvida pelos segmentos distais do nefro, onde U_{na} é a concentração urinária de sódio.

2.10.5 Dosagem de Proteinúrias de 15 horas

A proteína urinária total, nesse período, era dosada pelo método de Hartree (Laurell modificado, 1972) e os resultados expressos em mg/ml/15h.

2.10.6 Dosagem de Albuminúrias de 15 horas

A excreção de albumina urinária foi realizada através do "*Rocket immunoelectrophoresis*" pela técnica de Laurell (1966) com modificações.

Anticorpo de coelho antialbumina de rato, na concentração de 2,5% ,foi incorporado a gel de agarose a 1% e após solidificação, utilizado como substrato para eletroforese das urinas dos animais estudados. Padrões contendo, respectivamente 0,625, 1,25 e 2,5 µg de albumina de rato, eram adicionados em poços, à parte, para construção de curva padrão, empregando-se 5 V/cm de lâmina, durante período de 6 horas. Os resultados eram expressos em µg/ml/15h.

2.11 DOSAGEM DE GLICOSE

A glicose plasmática era determinada através do método da glicose-oxidase (WASHIKO & RICE, 1961). Seus resultados eram expressos em mg/dl.

2.12 UTILIZAÇÃO DE CONSERVANTES

Às urinas coletadas, eram adicionadas azida sódica na concentração de 0,02%.

2.13 CONCENTRAÇÃO DAS URINAS

As urinas do protocolo experimental eram colocadas, individualmente, em sacos de diálise embebidos em Polietilenoglicol 20.000 e deixados em geladeira o tempo necessário para atingir concentração ideal em torno de 20 vezes a inicial.

2.14 COLETA E PREPARO DO TECIDO RENAL

A realização do preparo das amostras de tecidos renais, assim como coloração por hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff (PAS) ocorriam no Laboratório de Patologia Experimental (LAPE) do Centro de Atendimento Integrado à Saúde da Mulher (CAISM) da FCM-UNICAMP.

Os rins eram retirados dos animais que submeteram-se ao estudo de função renal, imediatamente após a punção cardíaca, sendo cortados longitudinalmente e imersos em 10% de formalina por um período mínimo de 24 horas. Seguiu-se inclusão em parafina através de métodos convencionais.

2.15 MICROSCOPIA ÓPTICA

Os diagnósticos eram analisados em conjunto por patologistas do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP.

Cada metade renal incluída em parafina proveniente de animais controle, diabéticos aloxânicos e por estreptozotocina, respectivamente no 2º, 10º, 28º e 56º dias de instalação da doença, era cortada em micrótomo em

fatias de 4 µm de espessura e cada corte montado em lâmina para microscopia. Após este procedimento, os cortes eram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS). A visualização era realizada em microscópio óptico comum.

2.16 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os procedimentos de imuno-histoquímica eram realizados no LAPE do CAISM, através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, descrita por HSU, RAINE, FANGER, (1981), com algumas modificações realizadas no próprio laboratório.

Os cortes histológicos de 4 µm de espessura dos blocos de parafina escolhidos eram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e silanizadas, permanecendo em estufa a 60°C por período mínimo de 24 horas. A desparafinização realizava-se através de um banho de xilol a 60°C, por 15 minutos e 2 banhos de xilol, à temperatura ambiente, por 10 minutos cada. Procedia-se à hidratação com imersão em álcoois com concentrações crescentes: 3 banhos de álcool absoluto, 2 minutos cada; um banho em álcool 80%, 2 minutos; uma vez em álcool 50%, 2 minutos; todos à temperatura ambiente. Seguia-se lavagem em água corrente durante 2 minutos e banho em água destilada, para efetuar-se o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 15 minutos em solução a 3% de H₂O₂ 30% em metanol. Posteriormente, realizava-se lavagem em água corrente e destilada, seguida de banho em tampão PBS, à temperatura ambiente.

Para a digestão enzimática utilizava-se pepsina (Pepsin, Sigma Chemical Co., EUA, código P 7012) 0,4 g em 100 ml HCl 0,01 N (0,4%), através de incubação das lâminas por 2 horas, a 37°C, com posterior lavagem em

água corrente e passagem por água destilada. Colocavam-se os cortes em tampão citrato 1mM, pH 6,0, submetidos à irradiação por microondas, a 70°C, por 5 minutos, 2 vezes, esfriando por 10 minutos e incubados com solução para bloqueio de reações inespecíficas formada por soro normal de suíno na diluição 1:10 em 0,1% de BSA, por 20 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente, com posterior retirada do excesso de soro, sem lavagem.

A incubação com anticorpo primário policlonal anticolágeno IV de coelho, à diluição 1:100 em 0,1% de BSA ou anti-laminina de coelho, à diluição 1:150 em 0,1% de BSA era de uma noite, a 4°C, em câmara úmida. Na manhã seguinte o excesso de anticorpo era retirado, efetuando-se 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Posteriormente, procedia-se à incubação com o anticorpo secundário biotinilado (Imunoglobulina porcina biotinilada anti-cabra, camundongo, coelho, Multi Link, cod. no E453, Dako, Denmark), diluído a 1:150 em tampão PBS com 0,02% de azida sódica, por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, seguida de mais 3 lavagens em PBS, com duração de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Seguia-se a incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABComplex, cod. no K377, Dako Corporation, USA) na diluição 1:10 em tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,6, por 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente, com posterior lavagem em tampão PBS.

A técnica de coloração era feita com DAB (3,3 tetra-hidroclorato de diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., código D 5637) 40 mg dissolvidos em 100 ml de tampão PBS e 40 µl de 30% de H₂O₂, à temperatura ambiente, em banho rápido até visualização de coloração discretamente acastanhada dos cortes, procedendo-se, a seguir, à lavagem em água corrente e passagem em água destilada. Para a contra-coloração utilizava-se Hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, à temperatura ambiente, com posterior lavagem em água corrente e destilada, passagem

em água amoniacal, lavagem em água corrente e passagem em água destilada. O processo de desidratação obedecia gradiente crescente de álcoois: um banho em álcool 50%, uma vez em álcool 80%, 3 vezes em álcool absoluto e passagem em 3 xilóis para a montagem das lâminas com Entellan (Merck, no 7961). A coloração da membrana basal de vasos era utilizada como controle positivo interno dos cortes. Para verificação dos resultados empregava-se microscópio óptico comum, sendo documentados em fotomicroscópio.

2.17 REAGENTES UTILIZADOS

Todos os reagentes utilizados sem a citação da procedência eram produtos “Pró-Análise” (PA).

2.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados, realizada em microcomputador, efetuava os cálculos da média, erro padrão da média, desvio padrão e variância, e empregava os métodos:

- *Anova - Fator Único* quando o que se pretendia era determinar se as médias de duas ou mais amostras teriam sido retiradas de populações com a mesma média; e,

- *Teste t de Student* para médias independentes, sempre que era feita comparação entre duas médias de variáveis que apresentavam distribuição normal;

Consideravam-se os resultados como estatisticamente significativos quando a probabilidade de sua casualidade era inferior a 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados segundo aspectos fisiológicos, funcionais, imunoquímicos e morfológicos.

3.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DOS ANIMAIS ESTUDADOS

As Tabelas 02, 03 e 04 (págs. 54, 56 e 58) e os Gráficos 03, 04 e 05 (págs. 55, 57 e 59) mostram, respectivamente, os valores médios de peso corporal, glicemia e volume urinário dos animais controle e diabéticos-induzido por aloxana e estreptozotocina, em relação ao tempo de duração de *diabetes*. Em ambos os modelos experimentais, a partir do 2º dia do protocolo, pudemos verificar declínio do peso dos animais diabéticos, assim como manutenção do “estado de hiperglicemia”, até o final do protocolo. Para os animais diabéticos aloxânicos a poliúria pôde ser observada até o 28º dia, e até o 10º dia para os ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina, quando comparados aos ratos controle. Entretanto, no 56º dia de doença, observamos queda significativa do volume urinário nos 2 grupos de animais diabéticos estudados.

3.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

3.2.1 Clearance de Creatinina (Ccr)

Os animais aloxânicos (Tabela 05, pág. 60 e Gráfico 06, pág. 61) apresentaram discreta diminuição do clearance de creatinina, a partir do

10º dia de instalação do *diabetes* ($180,8 \pm 48,8$ versus $201,5 \pm 30,7$ $\mu\text{l}/\text{min}/100$ g de rato). Entretanto, nos 28º e 56º dias do protocolo experimental, verificou-se intensificação desta queda, embora não tenha sido possível concluir a significância desse resultado devido ao pequeno número de animais neste grupo ($n = 2$). Contudo, os resultados obtidos sugerem tendência de queda da taxa de filtração glomerular a partir do 10º dia de *diabetes*, que se acentua nos 2 últimos dias do protocolo.

A Tabela 05 e o Gráfico 06 também representam o perfil do clearance de creatinina dos animais diabéticos-induzido por estreptozotocina. Observou-se queda significativa do clearance de creatinina, já a partir do 2º dia de doença ($130,3 \pm 16,9$ versus $188,1 \pm 31,7$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$, $p < 0,05$), persistindo até o 10º dia de instalação da doença ($152,4 \pm 49,9$ versus $201,5 \pm 30,7$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}/\text{rato}$). No 28º dia do protocolo, verificou-se elevação discreta do clearance, voltando a diminuir no último dia do estudo ($96,9 \pm 30,9$ versus $172,27 \pm 14,50$).

3.2.2 Estudo da Manipulação Tubular de Sódio

O estudo da manipulação tubular de Na compreendeu as seguintes avaliações:

3.2.2.1 - Fração de Excreção de Sódio (FENa)

No modelo de *diabetes* induzido por aloxana, verificamos tendência à elevação da FENa no 2º dia do protocolo experimental ($1,05 \pm 0,34$ versus $0,83 \pm 0,23$), que acentuou-se significativamente no 10º dia ($1,90 \pm 0,28$ versus $0,80 \pm 0,14$, $p < 0,05$), alcançando porcentagens máximas nos 2 últimos dias de doença (28º dia: $5,55 \pm 1,69$ versus $0,54 \pm 0,12$; 56º dia: $4,74 \pm 2,16$ versus $0,48 \pm 0,09$).

A **Tabela 06** (pág. 62) e o **Gráfico 07** (pág. 63) representam o comportamento da FENa em ambos os modelos de *diabetes* induzido quando comparado ao dos controles. Nos 2 primeiros dias de doença, os animais diabéticos-induzido por estreptozotocina apresentaram tendência a aumento da FENa (2º dia: $1,03 \pm 0,29$ versus $0,83 \pm 0,23$; 10º dia: $1,01 \pm 0,40$ versus $0,80 \pm 0,14$), intensificando-se no 28º dia ($1,58 \pm 0,46$ versus $0,54 \pm 0,12$) e no 56º dia ($1,55 \pm 0,14$ versus $0,48 \pm 0,09$).

3.2.2.2 - Reabsorção Proximal Fracional de Sódio (RPNa)

Os resultados obtidos na avaliação da RPNa estão demonstrados na **Tabela 07** (pág. 64) e no **Gráfico 08** (pág. 65), e ilustram as variações ocorridas na RPNa, de acordo com a duração de *diabetes*. Os ratos diabéticos aloxânicos apresentaram diminuição intensa desta reabsorção nos 2 últimos dias do protocolo experimental (28º dia: $51,9 \pm 0,64$ versus $84,2 \pm 1,66$; 56º dia: $53,7 \pm 3,9$ versus $74,4 \pm 6,1$).

Através do modelo de *diabetes*-induzido por estreptozotocina pudemos verificar a diminuição da RPNa em todos os dias do protocolo, exceto no segundo (10º dia), onde houve semelhança entre as médias encontradas nos ratos diabéticos e controles. As quedas demonstradas nos demais dias intensificaram-se progressivamente (2º dia: $67,4 \pm 5,20$ versus $85,00 \pm 1,55$, $p < 0,05$; 28º dia: $73,35 \pm 4,46$ versus $84,20 \pm 1,66$; 56º dia: $46,3 \pm 10,70$ versus $74,40 \pm 6,10$).

3.2.2.3 - Reabsorção Pós Proximal Fracional de Sódio (RPPNa)

Os animais diabéticos aloxânicos apresentaram elevação progressiva da RPPNa, acentuando-se expressivamente nos 2 últimos dias (28º dia: $42,50 \pm 1,04$ versus $15,20 \pm 1,67$; 56º dia: $41,5 \pm 6,25$ versus $25,1 \pm 6,16$).

O modelo induzido por estreptozotocina evidenciou nítido e significativo aumento na RPPNa no 2º dia do protocolo ($31,60 \pm 5,04$ versus $14,16 \pm 1,64$, $p < 0,05$), retornando aos valores do controle no 10º dia. Da mesma forma, foi observada elevação desta reabsorção nos últimos 2 dias (28º dia: $25,00 \pm 4,02$ versus $15,20 \pm 1,67$; 56º dia: $52,10 \pm 10,7$ versus $25,1 \pm 6,16$). A **Tabela 08** (pág. 66) e o **Gráfico 09** (pág. 67) representam os valores obtidos de RPPNa dos animais estudados.

3.2.3 Avaliação das Proteinúrias

A **Tabela 09** (pág. 68) resume os valores médios de proteinúrias, expressos em mg/ml/15h, dos animais controle, diabéticos-induzido por aloxana e por estreptozotocina, nos dias fixados do protocolo experimental.

Como mostra o **Gráfico 10** (pág. 69), ambos os modelos de *diabetes* experimental apresentaram significativo aumento da proteinúria, já nos primeiros dias de doença, com progressão ao longo do experimento. Quando comparamos os 2 modelos, observamos que as proteinúrias apresentadas pelos animais aloxânicos foram significativamente mais intensas no 10º dia ($17,09 \pm 6,87$ versus $11,13 \pm 5,32$ mg/ml/15h, $p < 0,05$) e no 56º dia ($21,38 \pm 4,88$ versus $14,50 \pm 5,95$ mg/ml/15h, $p < 0,05$), permanecendo semelhantes no 2º e 28º dias protocolo.

3.2.4 Avaliação das Albuminúrias

A análise das albuminúrias dos ratos diabéticos aloxânicos mostrou níveis de excreção protéica aumentados significativamente em relação a dos controles, tendo seus valores mais expressivos no segundo e último dias do protocolo, respectivamente, ($39,00 \pm 12,73$ versus $5,33 \pm 1,15$

$\mu\text{g/ml/15h}$, $p < 0,05$ e $35,67 \pm 3,51$ versus $4,33 \pm 1,53 \mu\text{g/ml/15h}$, $p < 0,05$).

A excreção de albumina urinária dos ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina apresentou elevação estatisticamente significativa, no 10º e 56º dias do protocolo, quando comparada à dos controles (10º dia: $16,20 \pm 6,91$ versus $4,00 \pm 1,73 \mu\text{g/ml/15h}$, $p < 0,05$; 56º dia: $17,00 \pm 6,24$ versus $4,33 \pm 1,53 \mu\text{g/ml/15h}$, $p < 0,05$). Nos demais dias não foram observadas diferenças significativas em relação ao modelo aloxânico.

A análise comparativa dos 2 modelos de DM, demonstrou que o *diabetes* aloxânico apresenta excreção urinária de albumina significativamente maior ao induzido por estreptozotocina no 2º e 56º dias do protocolo.

Os dados acima encontram-se resumidos na **Tabela 10** (pág. 70) e no **Gráfico 11** (pág. 71).

3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA PROTEINÚRIA ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

As análises qualitativas das proteínas urinárias foram realizadas em 5 animais de cada grupo (controle, aloxana e estreptozotocina), no dia 0 e nos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 8º, 9º, 21º, 28º, 35º, 42º e 56º dias após instalação de *diabetes*. Os padrões de proteínas urinárias encontrados foram reprodutíveis para todos os animais estudados em cada grupo do protocolo experimental.

As eletroforeses em gel de poliacrilamida-SDS, das urinas dos animais diabéticos-induzido por aloxana e estreptozotocina, demonstraram frações antigênicas com os seguintes pesos moleculares: > 205 , 82, 70, 66, 58, 50, 45, 15 e 11 kDa.

As urinas dos animais controle revelaram 3 bandas de proteínas, de fraca intensidade, com pesos moleculares de 58, 15 e 11 kDa; representadas nas primeiras colunas das **Figuras 01 e 02** (pág. 72 e 73).

No 1° e 2° dias de doença, as amostras urinárias dos diabéticos aloxânicos apresentaram, quando comparadas às urinas controle, intensidade de coloração de banda mais forte com peso molecular de 58 kDa e moderada expressão das com peso molecular de 66, 50, 15 e 11 kDa; as proteínas de peso molecular > 205, 82, 70, e 45 kDa revelaram-se com fraca intensidade de coloração refletindo baixa concentração relativa nestes dois 2 primeiros dias, tornando-se quase imperceptíveis nos dias subseqüentes. Todas estas frações reapareceram gradualmente a partir do 21° dia, com intensificação no 56° dia, semelhantemente ao 1° e 2° dias de *diabetes*, excetuando-se as bandas protéicas de peso molecular 15 e 11 kDa que permaneceram presentes em todos os dias analisados, tornando-se mais proeminentes no 56° dia (**Figura 01**, pág. 72).

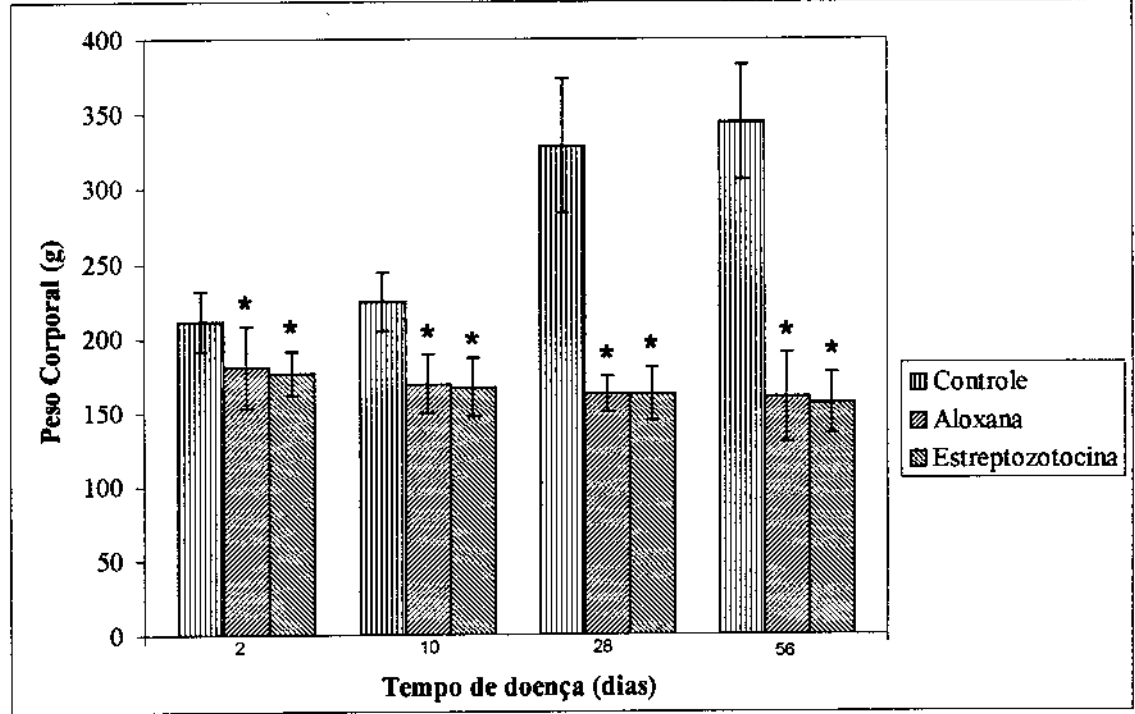
Os animais diabéticos-induzido por estreptozotocina apresentaram, no 1° e 2° dias do protocolo experimental, evidente intensificação da banda 58 kDa em relação às proteínas urinárias dos controles, ficando as de peso molecular > 205, 82, 70, 66, 50 e 45 kDa fracamente expressas. As proteínas de 15 e 11 kDa foram excretadas moderadamente até o último dia do experimento. A partir do 9° dia de instalação de doença ocorreu intensificação gradual das outras bandas, especificamente as de 58, 50 e 45 kDa, com maior excreção nos últimos 4 dias do protocolo experimental: 28°, 35°, 42° e 56° (**Figura 02**, pág. 73).

Tabela 02 Valores médios de **peso corporal** dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.

Peso Corporal (g)											
Dias	Controle			Aloxana			Estreptozotocina				
	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	desvio
2	5	211,88	20,50	5	180,75	27,59	*	5	176,60	14,77	*
10	5	225,00	19,81	5	169,33	20,03	*	5	167,00	19,72	*
28	5	328,50	44,76	5	162,40	12,05	*	5	162,33	17,93	*
56	5	344,25	38,58	5	160,20	30,39	*	5	156,33	20,53	*

(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Gráfico 03 Variação de peso corporal dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.



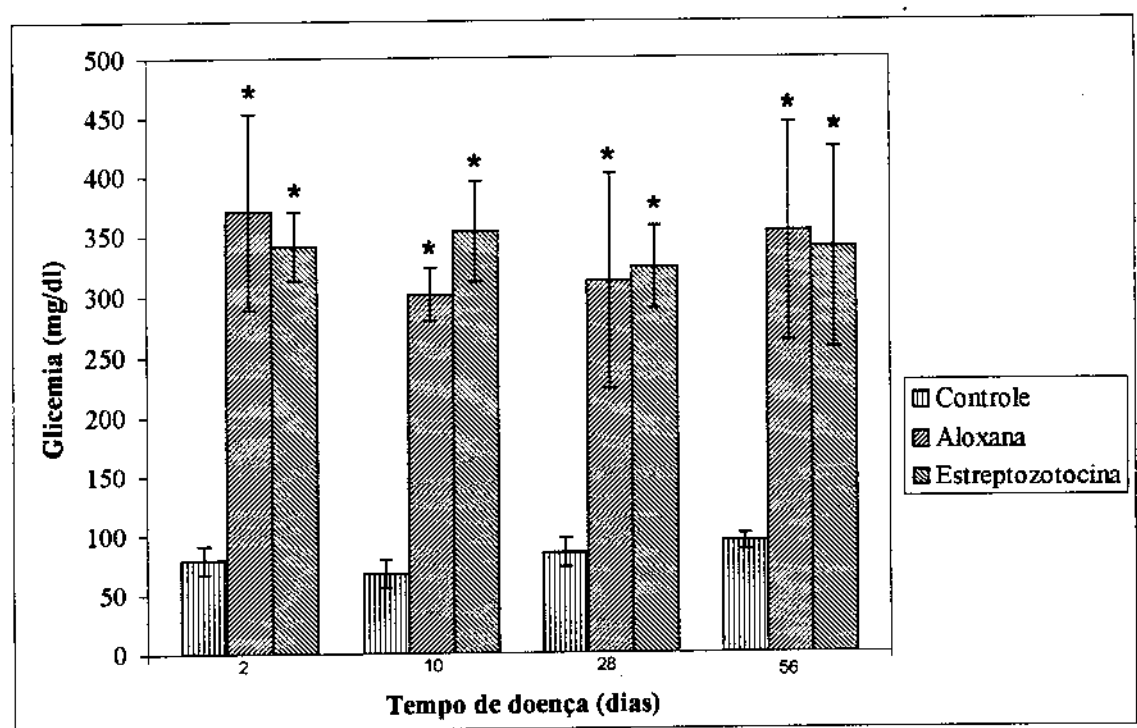
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Tabela 03 Valores médios de glicemia dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.

Glicemia (mg / dl)									
Dias	Controle			Aloxana			Estreptozotocina		
	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão
2	5	79,71	12,30	5	370,86	82,08	*	341,80	28,47
10	5	68,14	11,64	5	301,00	22,11	*	353,60	42,12
28	5	84,80	11,90	5	312,00	89,60	*	323,33	34,43
56	5	94,00	6,84	5	353,40	91,42	*	340,29	83,82

(*) p < 0,05 quando comparado ao Controle

Gráfico 04 Variação de glicemia dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.



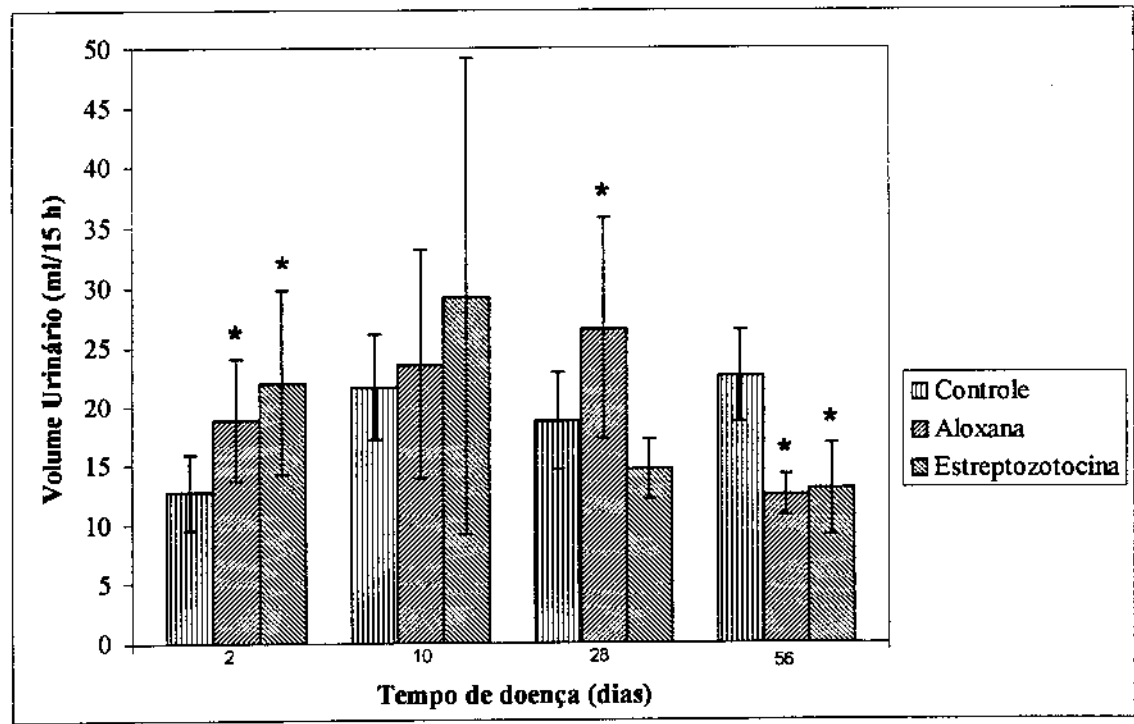
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Tabela 04 Valores médios de **volume urinário** dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.

Volume Urinário (ml / 15 h)										
Dias	Controle			Aloxana			Estreptozotocina			
	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n
2	5	12,75	3,15	5	18,89	5,18	*	5	22,00	7,81
10	5	21,63	4,47	5	23,50	9,63		5	29,20	19,97
28	5	18,78	4,15	5	26,50	9,25	*	5	14,67	2,52
56	5	22,60	3,85	5	12,50	1,73	*	5	13,00	3,83

(*) p < 0,05 quando comparado ao Controle

Gráfico 05 Variação de **volume urinário** dos animais controle e do protocolo experimental com aloxana e estreptozotocina em função do tempo de doença.



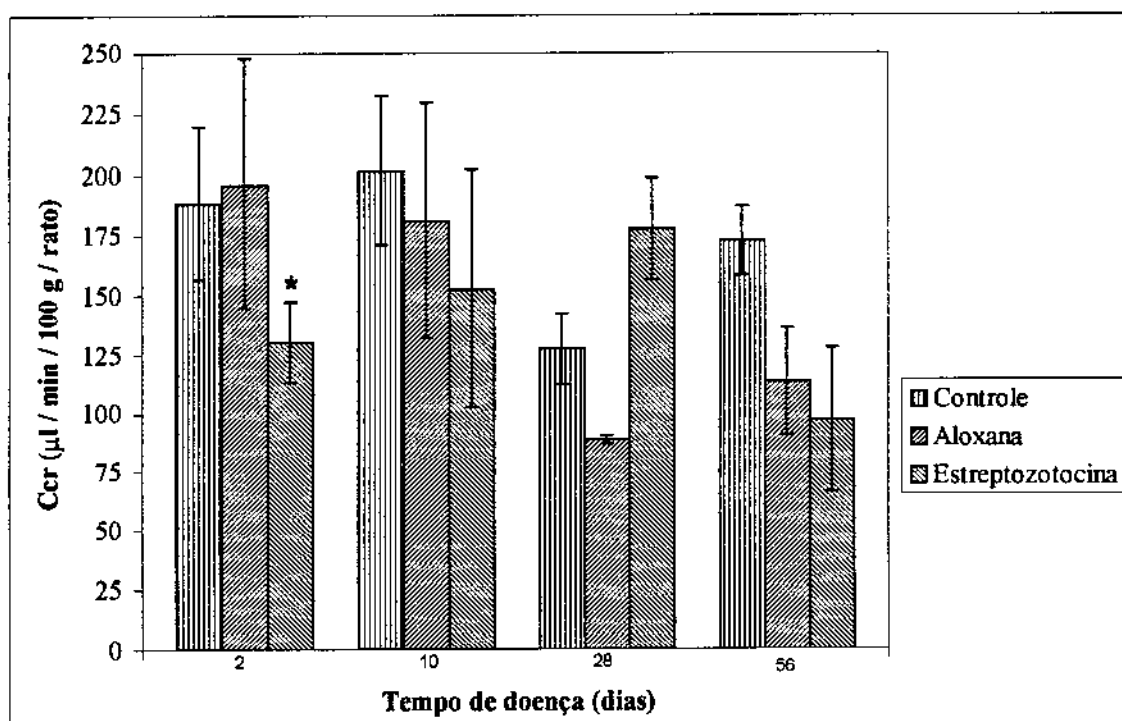
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Tabela 05 Valores médios de clearance de creatinina (Ccr) no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.

Clearance de Creatinina (Ccr) (ml / min / 100 g / rato)									
Dias	Controle			Aloxana			Estreptozotocina		
	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão
2	9	188,10	31,70	5	196,20	51,50	6	130,30	16,90 *
10	12	201,50	30,70	5	180,80	48,80	5	152,40	49,90
28	4	127,20	15,00	2	88,60	1,80	4	177,50	21,20
56	5	172,27	14,50	2	113,40	22,90	3	96,90	30,90

(*) p < 0,05 quando comparado ao Controle

Gráfico 06 Variação de clearance de creatinina (Ccr) no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.



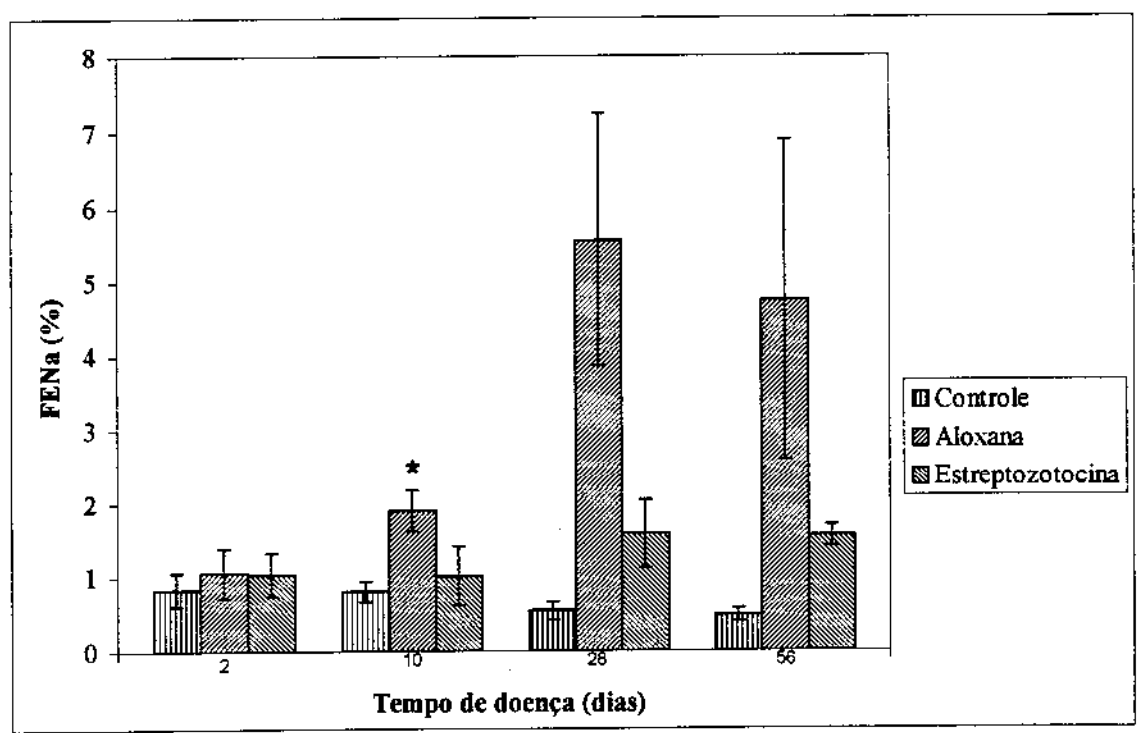
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Tabela 06 Valores médios de FENa no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.

FENa (%)									
Dias	Controle			Aloxana			Estreptozotocina		
	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão
2	9	0,83	0,23	5	1,05	0,34	6	1,03	0,29
10	12	0,80	0,14	5	1,90	0,28 *	5	1,01	0,40
28	4	0,54	0,12	2	5,55	1,69	4	1,58	0,46
56	5	0,48	0,09	2	4,74	2,16	3	1,55	0,14

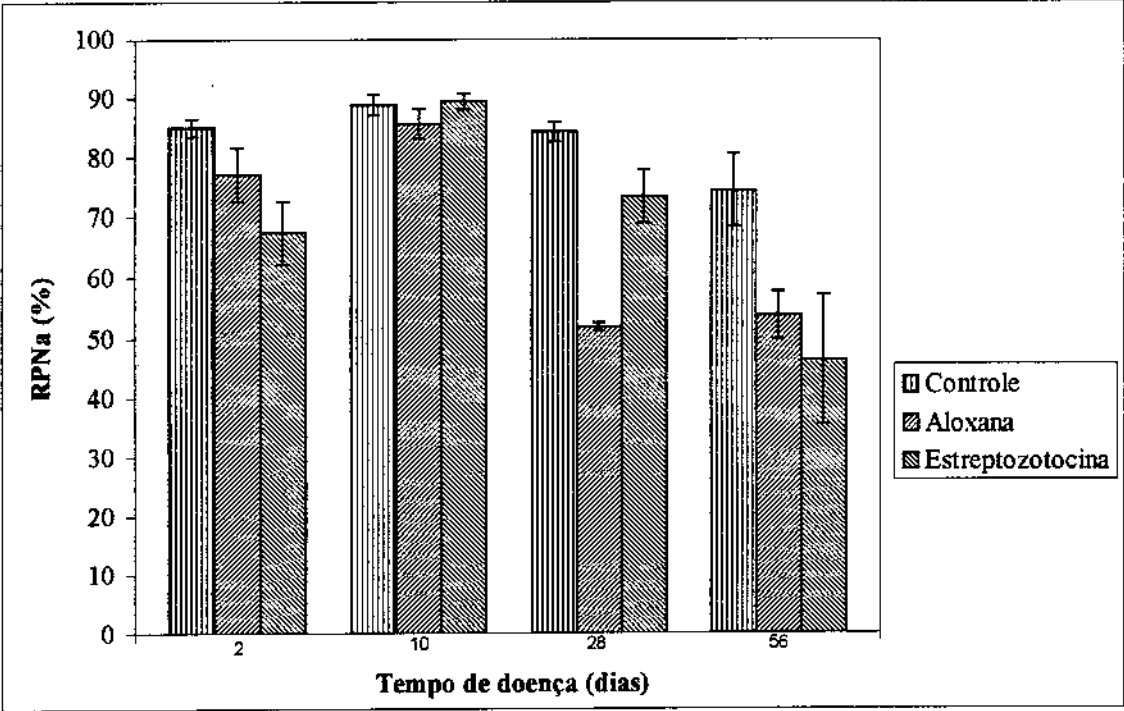
(*) p < 0,05 quando comparado ao Controle

Gráfico 07 Variação de FENa no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.



(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Gráfico 08 Variação de RPNa no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.



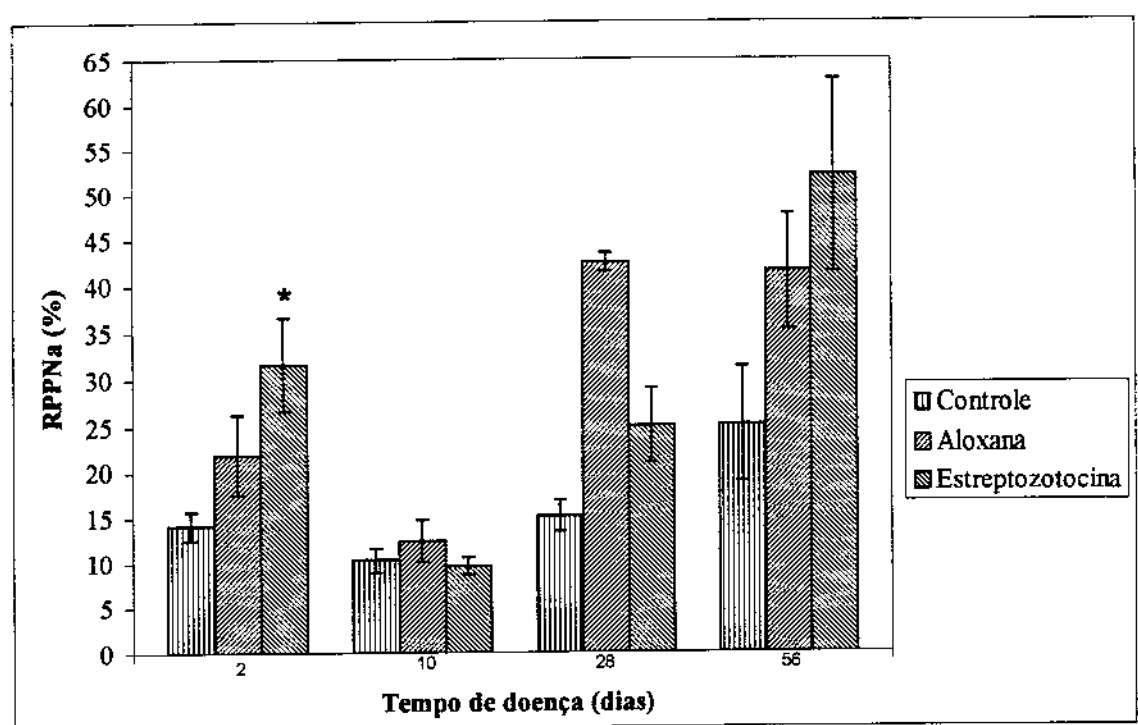
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Tabela 08 Valores médios de RPPNa no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.

Dias	RPPNa (%)									
	Controle				Aloxana				Estreptozotocina	
	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n
2	9	14,16	1,64	5	21,90	4,31	6	31,60	5,04	*
10	12	10,31	1,36	5	12,45	2,33	5	9,60	0,96	
28	4	15,20	1,67	2	42,50	1,04	4	25,00	4,02	
56	5	25,10	6,16	2	41,50	6,25	3	52,10	10,70	

(*) p < 0,05 quando comparado ao Controle

Gráfico 09 Variação de **RPPNa** no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.



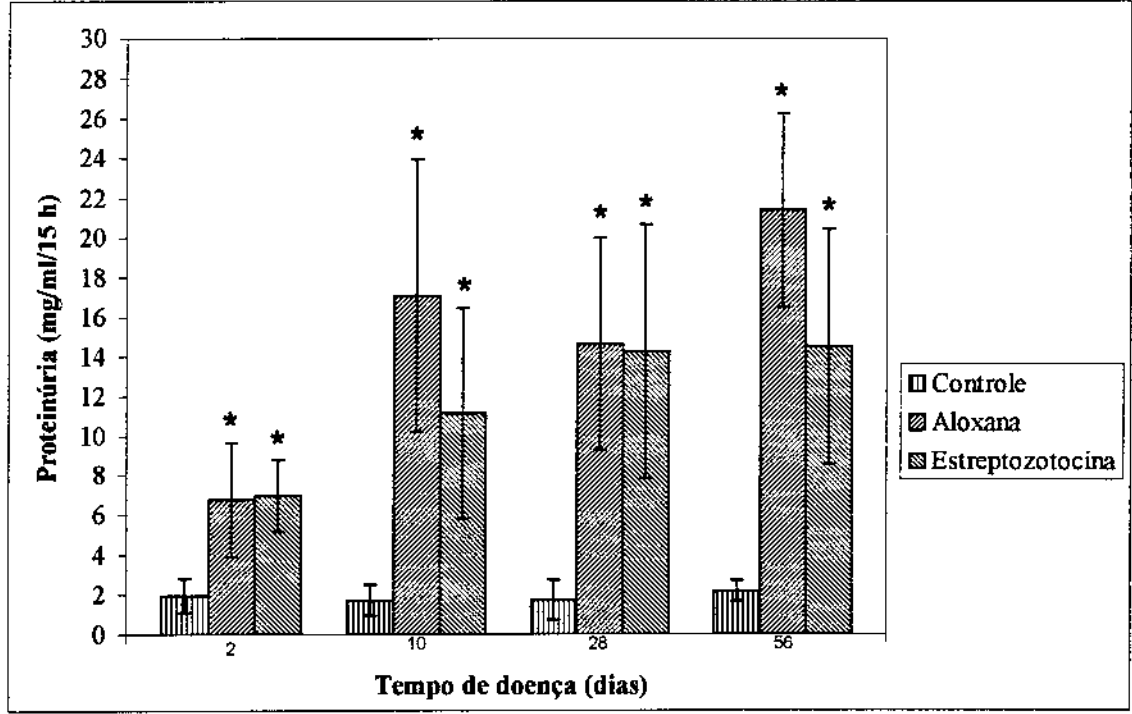
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Tabela 09 Valores médios de **proteinúrias** no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.

Dias	Proteinúrias (mg / ml / 15 h)							
	Controle				Aloxana			
	n	média	desvio padrão		n	média	desvio padrão	
2	7	1,95	0,84		10	6,78	2,89 *	7 6,97 1,80 *
10	10	1,72	0,78		7	17,09	6,87 *	8 11,13 5,32 *
28	9	1,73	1,02		5	14,65	5,35 *	7 14,26 6,42 *
56	7	2,18	0,51		4	21,38	4,87 *	6 14,50 5,95 *

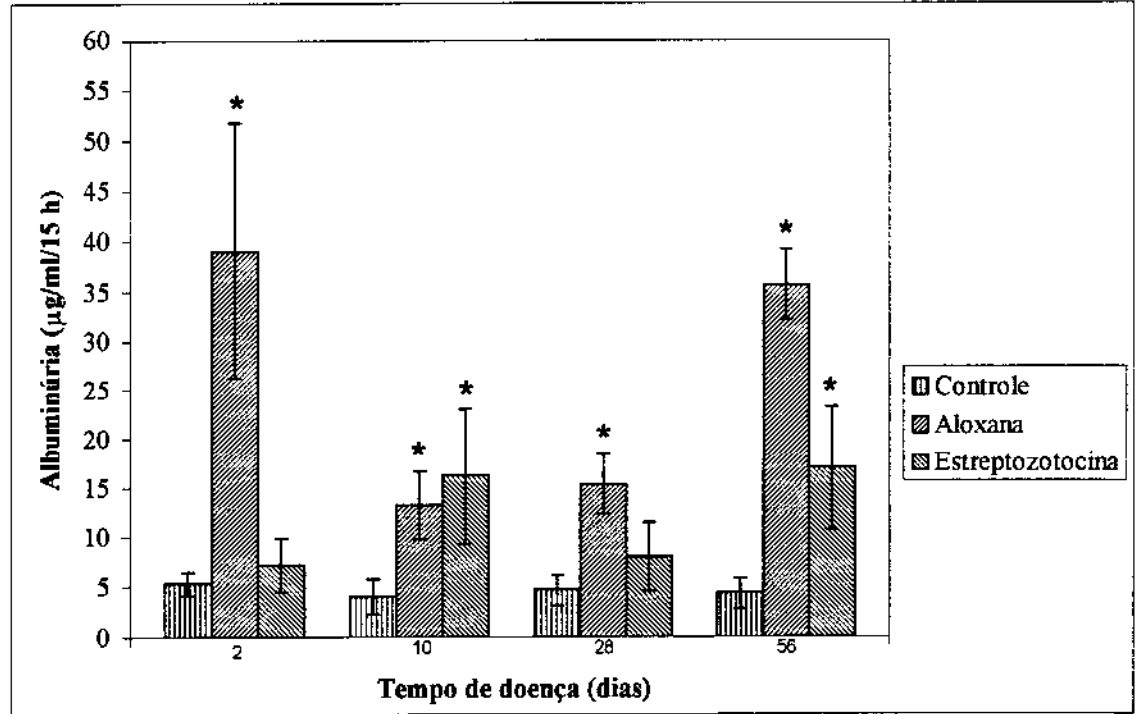
(*) p < 0,05 quando comparado ao Controle

Gráfico 10 Variação de **proteinúrias** no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.



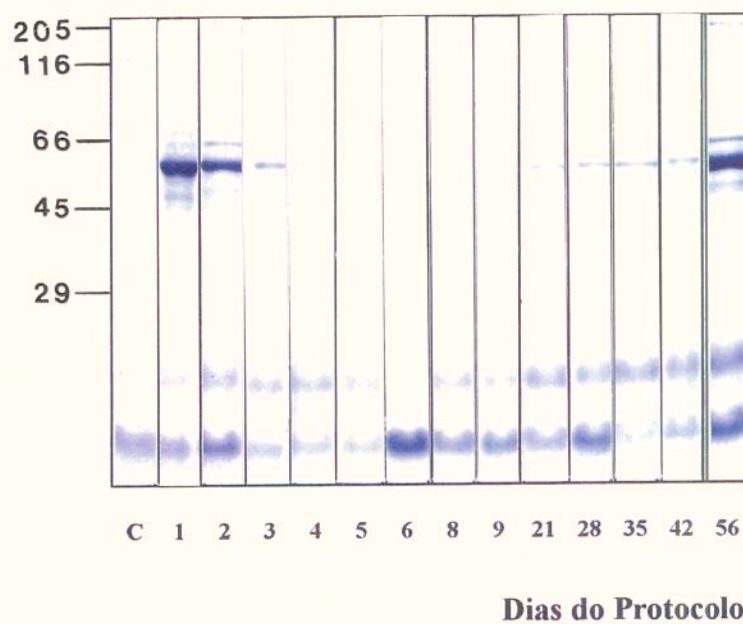
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Gráfico 11 Variação de albuminúrias no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo de doença.



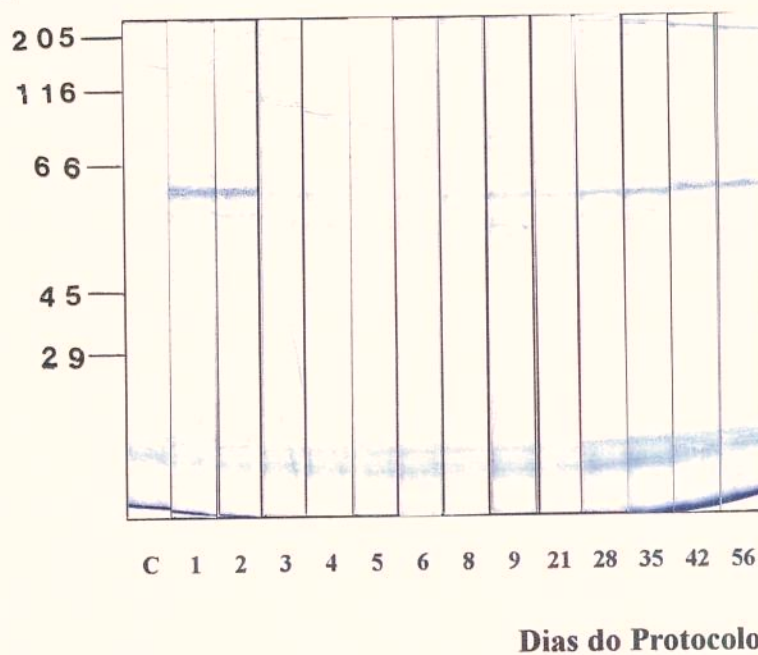
(*) $p < 0,05$ quando comparado ao Controle

Figura 01 Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS, sob condições desnaturantes das urinas, não concentradas, do protocolo experimental com aloxana. Gel a 8%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250.



(*) Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

Figura 02 Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS, sob condições desnaturantes das urinas, não concentradas, do protocolo experimental com estreptozotocina. Gel a 8%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250.



(*) Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO ANTIGÊNICA DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS, SEGUIDA DE TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA E “IMMUNOBLOTTING”

3.4.1 Eletroforeses de Referência em Gel de Poliacrilamida-SDS

A realização da eletroforese em gel a 14% em poliacrilamida-SDS do colágeno IV resultou em fragmentos com os seguintes pesos moleculares: > 205, 182, 150, 130, 125, 92, 88, 75, 70 e 60 kDa.

Utilizando-se gel a 12% de separação, após aplicação de laminina, observamos as seguintes frações protéicas: > 250, 152, 142, 108, 88, 70 e 57 kDa.

3.4.2 Eletroforeses de Transferência seguidas de “Immunoblotting” para Detecção de Colágeno IV e Laminina urinários.

O controle-positivo, obtido através de “immunoblotting”, compreendeu a reação de colágeno IV com soro de coelho contendo anticorpo policlonal monoespecífico anticolágeno IV, na diluição 1:200; esta reação revelou fragmentos de pesos moleculares semelhantes aos encontrados no gel de poliacrilamida-SDS: > 205, 182, 150, 130, 125, 92, 88, 75, 70 e 60 kDa (Figuras 03, 04 e 07, págs. 77, 78 e 81).

As urinas concentradas do mesmo grupo de animais utilizados no item 3.3. foram analisadas, juntamente com o controle-positivo para colágeno IV ou laminina, obedecendo os seguintes dias de instalação de *diabetes*: 1º, 2º, 3º, 35º, 42º e 56º.

Os ratos diabéticos aloxânicos apresentaram reatividade urinária para a fração de 75 kDa em todos os dias fixados do protocolo, com intensidade

moderada. Foi observada, também, reatividade fraca à fração de 88 kDa a partir do dia 35 de doença, passando à forte no 42° e 56° dias (**Figura 03**, pág. 77).

Todas as urinas dos animais diabéticos-induzido por estreptozotocina demonstraram reatividade para a fração de 75 kDa, com intensidade moderada, nos 6 dias estipulados para o estudo. Similarmente ao modelo aloxana, houve reação, inicialmente fraca e depois moderada, à fração de 88 kDa, a partir do 35° dia do protocolo (**Figura 04**, pág. 78).

As amostras urinárias dos animais controle não apresentaram nenhuma reatividade ao colágeno IV, em todos os procedimentos de “*immunoblotting*” realizados (**Figura 07**, pág. 81).

Para que se pudesse demonstrar o controle positivo para laminina foi realizado “*immunoblotting*” em gel a 12% e diluição 1:500 do anticorpo policlonal antilaminina de camundongo, encontrando-se bandas protéicas de pesos moleculares semelhantes às do gel de poliacrilamida-SDS: > 250, 152, 142, 108, 88, 70 e 57 kDa (**Figuras 05 e 06**, págs. 79 e 80).

A análise das amostras urinárias dos animais diabéticos aloxânicos para componentes de laminina mostraram que estas continham frações de 108, 88 e 57 KDa em todos os tempos determinados do protocolo. Entretanto, a intensidade das reações dos fragmentos de 88 e 57 kDa mostrou-se fraca nos 2 primeiros dias e intensa nos demais; contudo, a fração de 108 kDa reagiu intensamente em todos os tempos investigados no “*immunoblotting*” (**Figura 05**, pág. 79).

As urinas dos animais diabéticos-induzido por estreptozotocina revelaram frações 108 e 88 kDa, de intensidade moderada, nos 3 primeiros dias e intensa nos últimos dias do procedimento. Por outro lado, a fração de 57 kDa apresentou reação somente a partir do 35° dia, de forma moderada inicialmente, passando à intensa no 56° dia (**Figura 06**, pág. 80).

Similarmente ao colágeno IV, não observamos nenhuma fração de laminina nas urinas dos animais controle, quando analisadas através de “immunoblotting”. (Figura 07, pág. 81).

3.5 ESTUDO MORFOLÓGICO RENAL ATRAVÉS DE COLORAÇÕES POR HEMATOXILINA E EOSINA (HE) E ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS)

O estudo morfológico, através de microscopia óptica e método tintorial (HE) dos tecidos renais dos animais controle e do protocolo experimental, não evidenciou alterações significativas (dados não apresentados).

Quando procedemos à avaliação do espessamento mesangial, através de coloração com PAS, obedecemos a seguinte escala:

(-)	normal
(+/-)	discreto
(+)	leve
(++)	moderado
(+++)	intenso

Nos animais injetados com aloxana e estreptozotocina observou-se discreto espessamento da matriz mesangial, a partir do 10º dia do protocolo experimental, quando comparados aos animais controle (Figuras 08 e 09, pág. 86).

Os dados relativos à morfologia renal utilizando-se coloração com PAS estão sumarizados na Tabela 11 (pág. 82).

Figura 03: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com aloxana, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e "immunoblotting", utilizando-se anticorpo de coelho anticolágeno IV na diluição 1:200.

Observação: Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

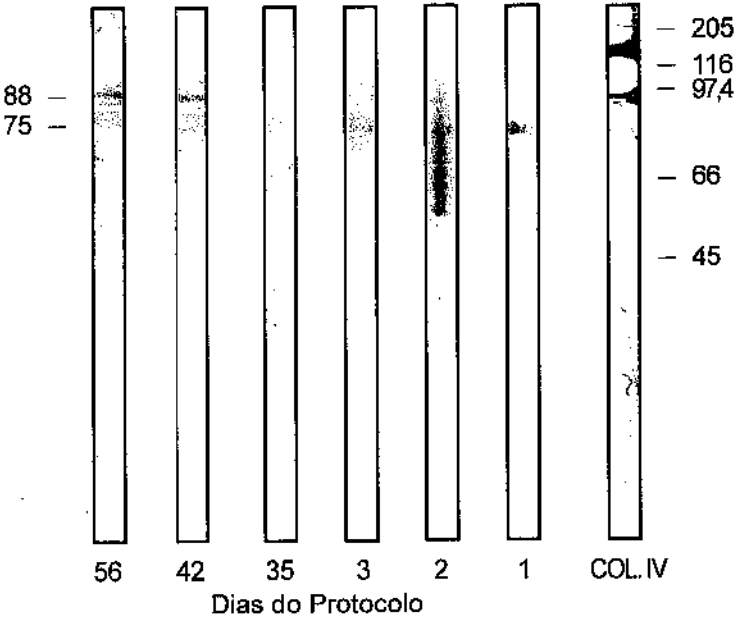


Figura 04: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com estreptozotocina, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e "immunoblotting", utilizando-se anticorpo de coelho anticolágeno IV na diluição 1:200.
Observação: Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

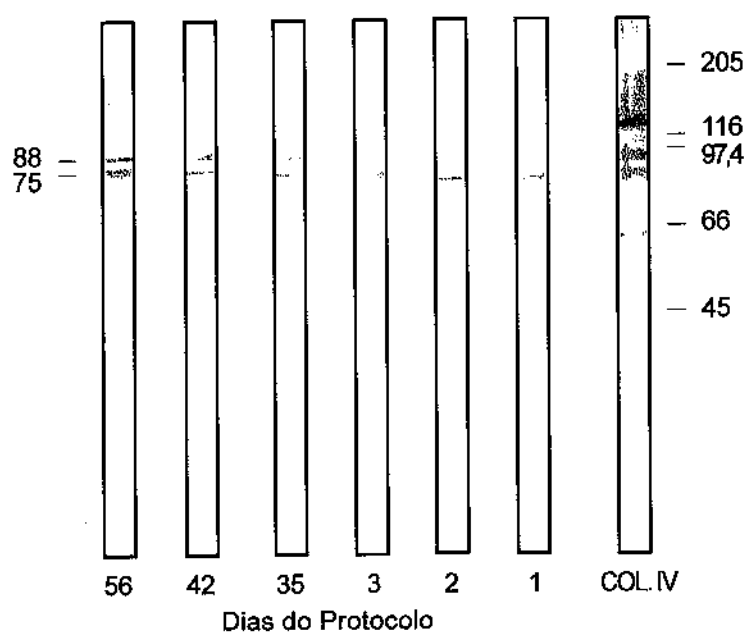


Figura 05: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com aloxana, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e "immunoblotting", utilizando-se anticorpo de coelho antilaminina na diluição 1:500.

Observação: Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

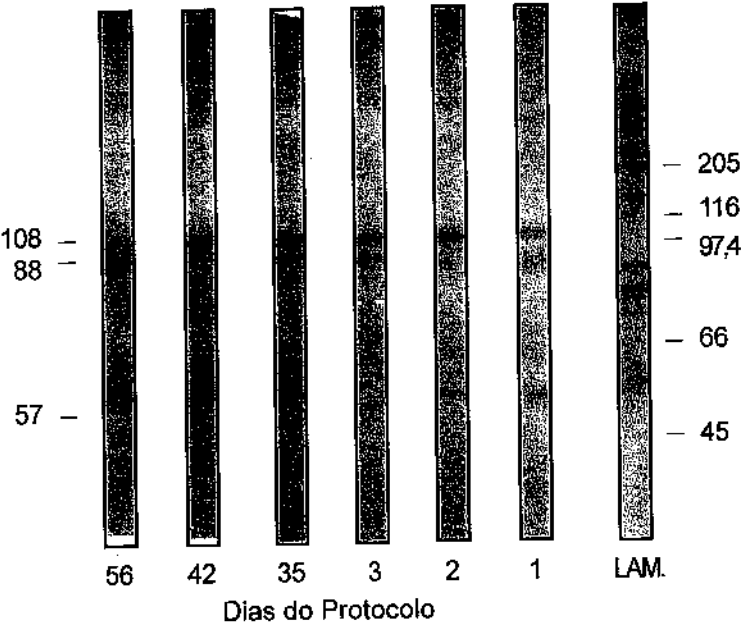


Figura 06: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 12% das urinas concentradas dos ratos do protocolo experimental com estreptozotocina, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e "immunoblotting", utilizando-se anticorpo de coelho antilaminina na diluição 1:500.

Observação: Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

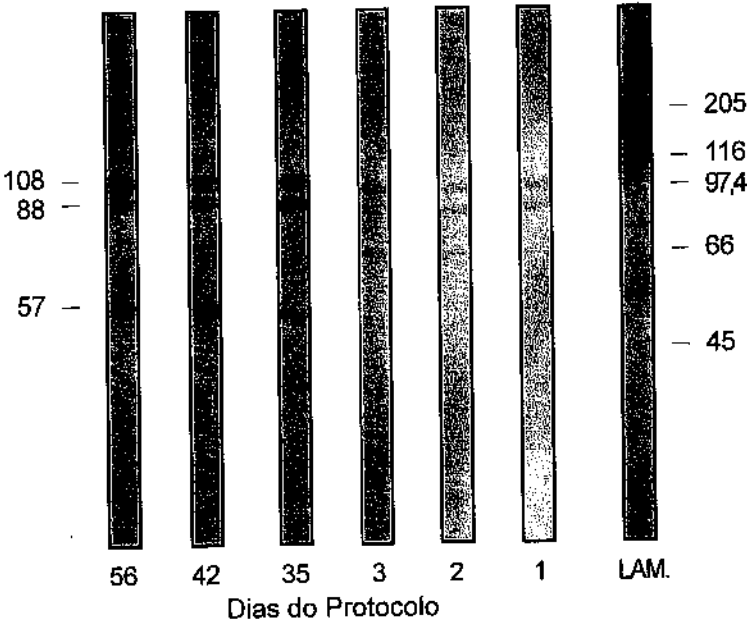


Figura 07: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS a 14% das urinas concentradas dos ratos controle, seguida de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e "immunoblotting", utilizando-se respectivamente anticorpo de coelho anticolágeno IV e antilaminina, nas diluições 1:200 e 1:500.

Observação: Os pesos moleculares dos peptídeos do padrão Sigma estão discriminados (kDa).

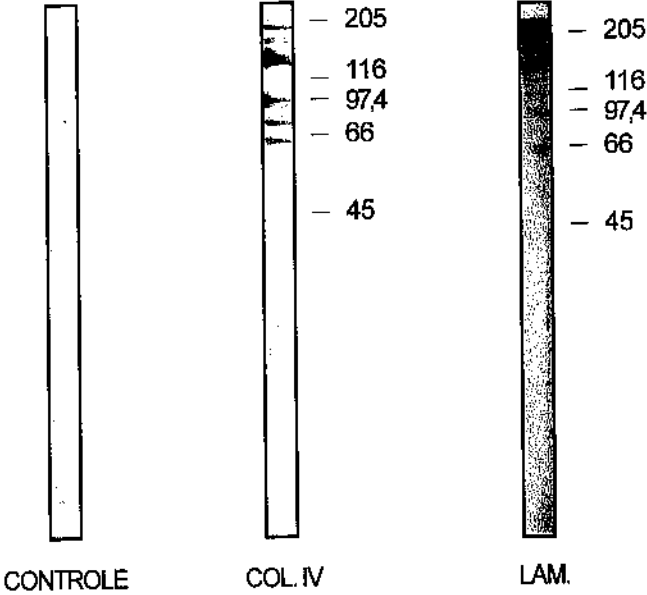


Tabela 11 Padrão da matriz mesangial renal através de coloração com PAS no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo.

Dias	Controle		Aloxana		Estreptozotocina	
	Espessamento (MM)	Nº animais	Espessamento (MM)	Nº animais	Espessamento (MM)	Nº animais
2	(-)	6	(-)	6	(-)	5
10	(-)	5	(+/-)	4	(+/-)	5
28	(-)	5	(+/-)	2	(+/-)	3
56	(-)	5	(+/-)	2	(+/-)	3

ESTUDO DA EXPRESSÃO RENAL DE COLÁGENO IV E LAMININA NO *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO

A expressão renal destes componentes foi avaliada através de coloração por técnica de imuno-histoquímica já descrita anteriormente. Analisou-se o padrão de espessamento dos componentes glomerulares, obedecendo a mesma classificação utilizada para a visualização da matriz mesangial, por PAS.

No tecido renal dos ratos controle o colágeno IV e laminina estavam presentes como linha contínua, delgada, de coloração acastanhada e espessura normal, em região de membrana basal do capilar glomerular, matriz mesangial, cápsula de Bowman, túbulos e vasos renais (**Figuras 10 a e 10 b**, pág. 87).

O aspecto da membrana basal glomerular dos animais diabéticos-induzido por aloxana, revelou leve espessamento dos capilares glomerulares e matriz mesangial (+), a partir do 10º dia de *diabetes*, passando para moderado (++) no 28º e intenso (+++) no 56º dias de doença (**Figuras 12 a, 13 a e 14 a**, págs. 88 e 89).

No modelo induzido por estreptozotocina, o estudo imuno-histoquímico renal apresentou moderado espessamento (++) na membrana basal do capilar glomerular e matriz mesangial a partir do 28º dia, e intenso (+++) no 56º dia do protocolo (**Figuras 12 b, 13 b e 14 b**, págs. 88 e 89).

No 2º dia de *diabetes* foram observadas, em ambos os modelos, alterações relacionadas ao tamanho e número das células glomerulares. Embora a técnica de imuno-histoquímica não seja indicada para este tipo de análise, apresentamos documentação fotográfica destes achados (**Figuras 11 a e 11 b**, pág. 87).

Portanto, a visualização da membrana basal glomerular mostrou nítida impressão de espessamento correlacionada ao tempo de duração da doença; entretanto, a quantificação de sua espessura não foi efetuada. A membrana basal tubular não apresentou alterações em ambos os modelos, tanto para colágeno IV como para laminina. Os achados relativos à imuno-histoquímica estão resumidos na **Tabela 12** (pág. 85).

Tabela 12 Padrão de expressão de colágeno IV e laminina glomerular renal, por imuno-histoquímica, no *diabetes mellitus* experimental, em função do tempo.

Dias	Controle		Aloxana		Estreptozotocina	
	Espessamento da MB+MM	Nº de animais	Espessamento da MB+MM	Nº de animais	Espessamento da MB+MM	Nº de animais
2	(-)	6	(-)	6	(-)	5
10	(-)	5	(+)	4	(-)	5
28	(-)	5	(++)	2	(++)	3
56	(-)	5	(+++)	2	(+++)	3

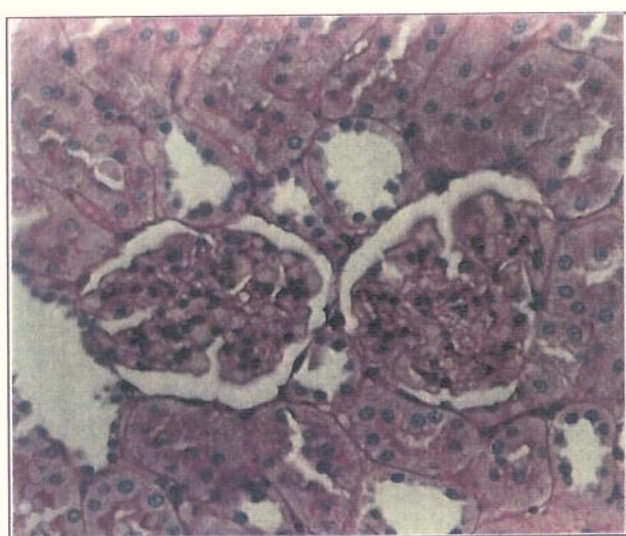


Figura 08 - Controle - Glomérulo normal - PAS (330 X).

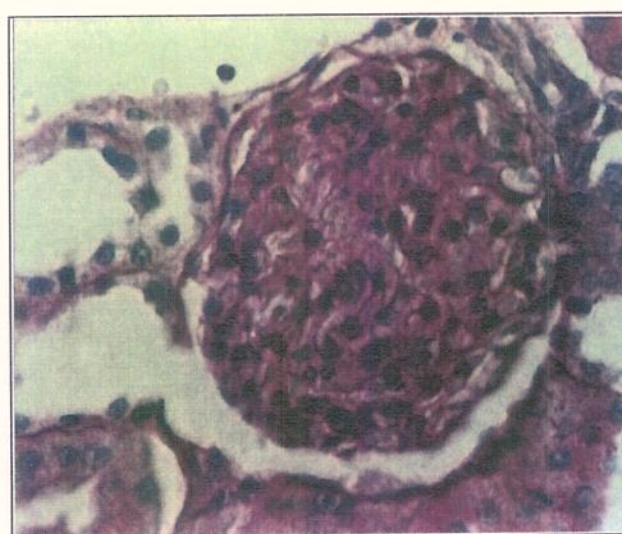


Figura 09 - DM por estreptozotocina - Nota-se glomérulo com espessamento da matriz mesangial - PAS (528 X).

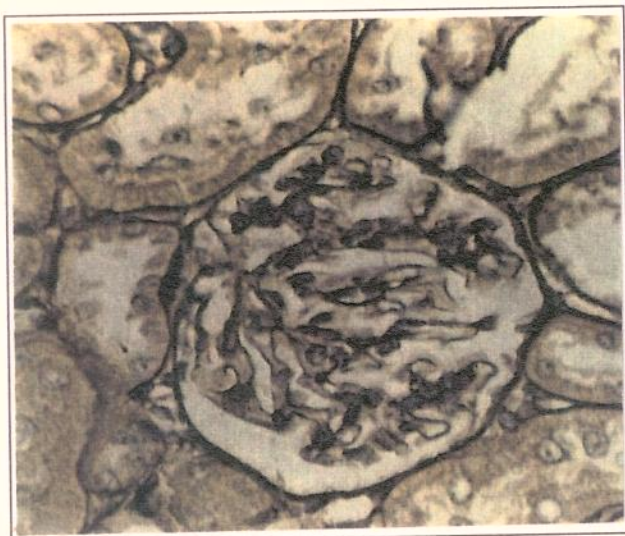


Figura 10 (a) - Controle - Colágeno IV -
Nota-se membrana basal dos capilares
glomerulares como linha contínua e delgada -
IPX (528 X).

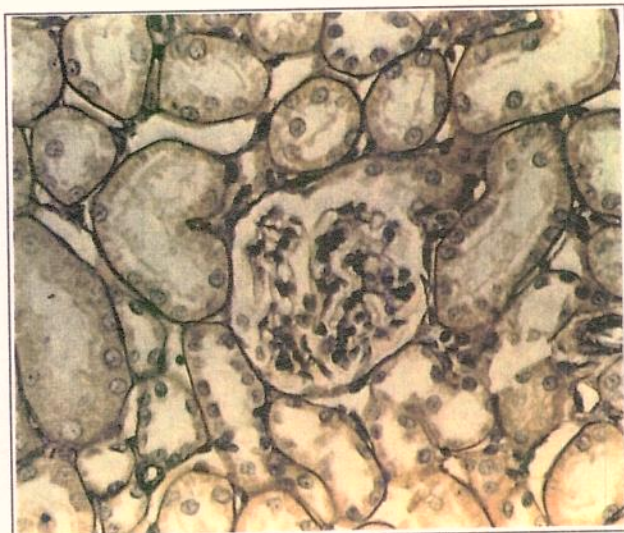


Figura 10 (b) - Controle - Laminina - Aspecto
normal da matriz mesangial - IPX (330 X).

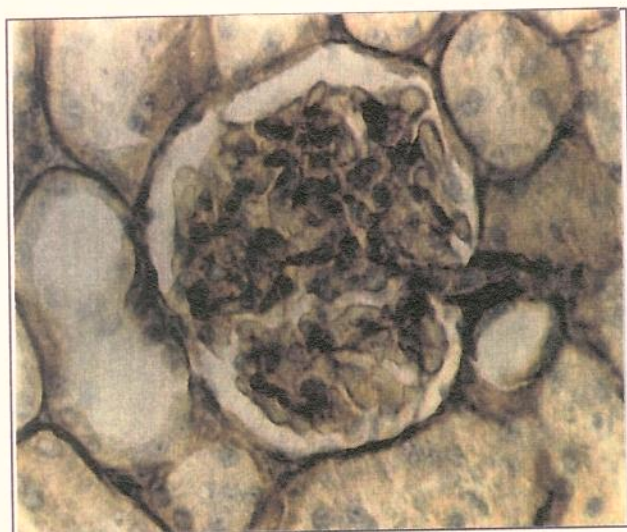


Figura 11 (a) - 2º dia - DM por aloxana -
Colágeno IV - MB normal - Nota-se aumento
de número e tamanho de células glomerulares -
IPX (528 X).

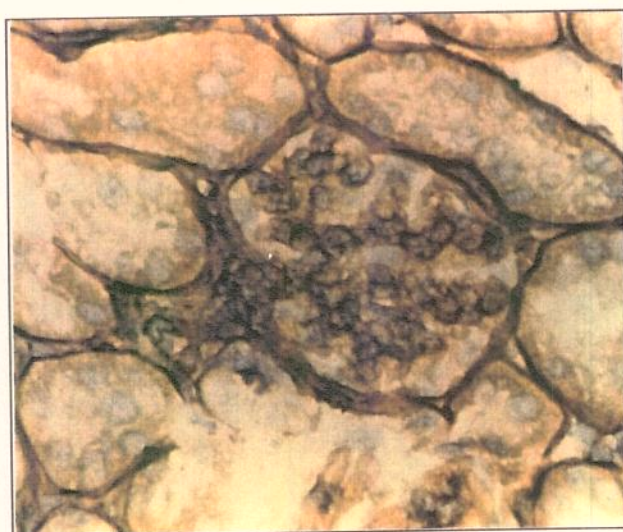


Figura 11 (b) - 2º dia - DM por
estreptozotocina - Laminina - Mesmo aspecto
descrito anteriormente - IPX (528 X).

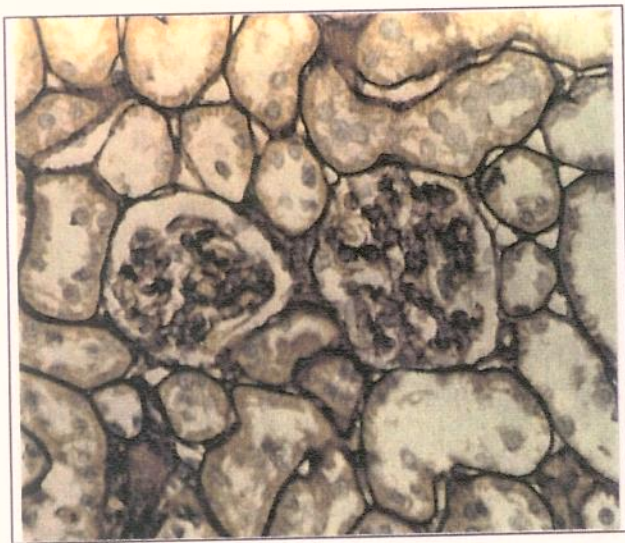


Figura 12 (a) - 10º dia - DM por aloxana - Colágeno IV - Nota-se leve espessamento de MB dos capilares glomerulares e matriz mesangial- IPX (330 X).



Figura 12 (b) - 10º dia - DM por estreptozotocina - Colágeno IV - Glomérulo de aspecto normal - IPX (528 X).

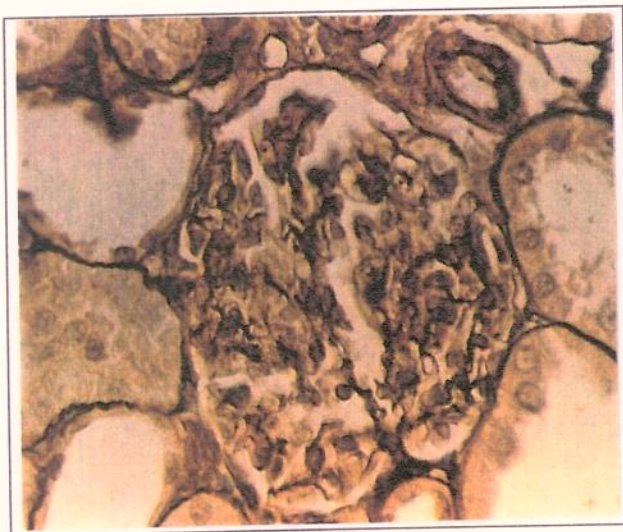


Figura 13 (a) - 28º dia - DM por aloxana - Laminina - Nota-se moderado espessamento de MB dos capilares glomerulares e matriz mesangial - IPX (528 X).

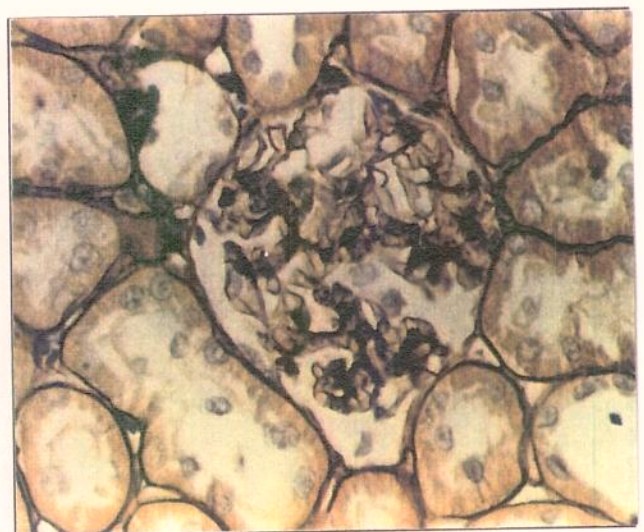


Figura 13 (b) - 28º dia - DM por estreptozotocina - Colágeno IV - Mesmo aspecto descrito anteriormente - IPX (528 X).



Figura 14 (a) - 56° dia - DM por aloxana - Colágeno IV - Intenso espessamento de MB dos capilares glomerulares e matriz mesangial- IPX (528 X).

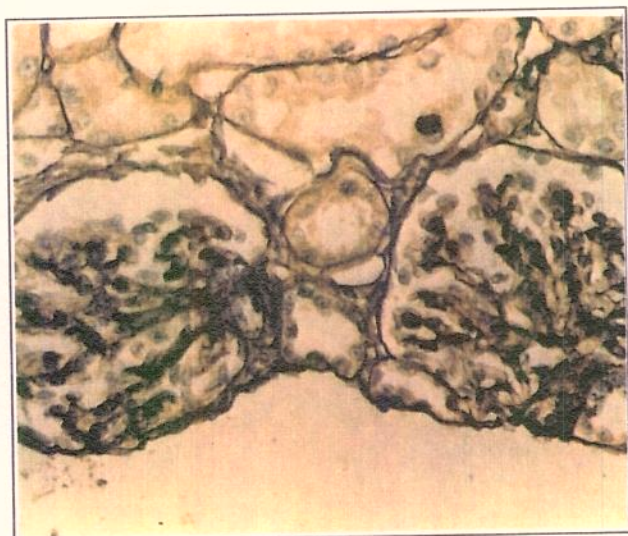


Figura 14 (b) - 56° dia - DM por estreptozotocina - Laminina - Mesmo aspecto descrito anteriormente - IPX (528 X).

DISCUSSÃO

Dentre as inúmeras complicações crônicas advindas do *diabetes*, as alterações microvasculares ocupam papel de destaque por serem importantes causas de morbidade e mortalidade do paciente diabético (NELSON et al., 1988). Neste contexto, a nefropatia constitui uma das mais graves complicações diabéticas, caracterizando-se, inicialmente, por hiperfiltração gradativa seguida de proteinúria maciça, síndrome nefrótica e falência renal nos estágios mais tardios da doença (MOGENSEN, 1976; MARKS, 1976).

Embora a nefropatia diabética seja alvo de ampla investigação, a elucidação de seus reais mecanismos pato-bioquímicos, ainda não está totalmente esclarecida (OLGEMÖLLER & SCHLEICHER, 1993). Contudo, estudos utilizando microscopia eletrônica e métodos bioquímicos têm fornecido contribuições valiosas para melhor esclarecimento da estrutura glomerular como unidade de filtração morfo-funcional (TIMPL, 1989).

Desta forma, alterações quantitativas e qualitativas de componentes da membrana basal glomerular no *diabetes mellitus* desencadeiam importantes distúrbios funcionais renais, principalmente associados à barreira seletiva para passagem de moléculas, em função da carga e tamanho molecular (SCHLEICHER et al., 1989).

Nesse contexto fisiopatológico, onde inúmeros fatores estão envolvidos e correlacionados, mas não de todo esclarecidos, é que os modelos experimentais destacam-se como importantes ferramentas para o estudo do *diabetes mellitus*. Dentre eles, os induzidos por drogas (Aloxana e Estreptozotocina), amplamente utilizados em pesquisa básica, foram por

nós escolhidos na tentativa de respondermos algumas questões, de fatos ainda pouco elucidados. Procuramos, ao induzir *diabetes* com 2 tipos diferentes de drogas, não somente, estudar a expressão de componentes de membrana basal urinários (colágeno IV e laminina) e as alterações morfo-funcionais renais (glomerulares e tubulares) dos animais diabéticos, como também verificar possíveis diferenças existentes entre os 2 modelos. Para discutirmos essas amplas questões, analisaremos os resultados por tópicos.

4.1 FUNÇÃO RENAL

O aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) é achado característico de pacientes com *diabetes mellitus* insulino-dependente (DMID) de diagnóstico recente. MOGENSEN (1971) demonstrou que, em média, 40% dos diabéticos insulino-dependentes recém-diagnosticados e, 25% dos que estão sob insulino-terapia por curto período de tempo, apresentam elevação da TFG. Embora a hiperfiltração glomerular possa persistir por muitos anos (WISEMAN et al., 1985a), apenas 30-40% dos diabéticos desenvolvem nefropatia, com diminuição progressiva da TFG, proteinúria persistente e hipertensão arterial sistêmica (VIBERTI et al., 1983).

Desde 1981, inúmeros trabalhos têm verificado alterações hemodinâmicas em modelos murinos de *diabetes* induzido por drogas como aloxana e estreptozotocina (HOSTETTER, TROY, BRENNER, 1981; JENSEN et al., 1981; MICHELS et al., 1981; MICHELS, O'DONNELL, KEANE, 1984; ZATZ et al., 1985; BANK et al., 1987). O comportamento hemodinâmico específico glomerular, frente ao *diabetes* experimental mostra dependência em relação ao controle metabólico e à linhagem de ratos utilizada, paralelamente ao que ocorre em humanos (JENSEN et al., 1987; O'DONNELL et al., 1988). A microalbuminúria é considerada

indicador de disfunção glomerular precoce, sendo utilizada amplamente na clínica como marcador de nefropatia insipiente (VIBERTI et al., 1982; MOGENSEN & CHRISTENSEN, 1984).

Por outro lado, mais recentemente, estudos utilizando animais diabéticos (CHOUINARD, VIAU, GRESELIN, 1992a; KANEDA et al., 1992; CHOUINARD & VIAU, 1992b) têm focado a importância das alterações tubulares renais no desencadeamento da nefropatia diabética. Isto porque o mecanismo de excreção urinária de microalbumina e proteínas de baixo peso molecular, presentes na nefropatia precoce, envolve não somente filtração glomerular como também reabsorção tubular.

Em nosso estudo, verificamos que os animais diabéticos, de ambos os modelos, apresentaram diminuição evidente do clearance de creatinina endógena no último dia do protocolo experimental. Entretanto, no modelo induzido por estreptozotocina verificamos precocidade desta queda, estatisticamente significativa, a qual, caracteristicamente, elevou-se acima dos valores apresentados pelos controles no 28º dia de doença, indicando provavelmente estado de hiperfiltração glomerular, sabidamente conhecido na evolução da nefropatia diabética, que precede a fase irreversível e é acompanhado de microalbuminúria (TUCKER, 1990). Por outro lado, o rato diabético aloxânico, diferentemente, não apresentou aumento da filtração glomerular, pelo menos que pudesse ser detectado nos dias analisados do protocolo experimental.

A maioria dos trabalhos que visa correlacionar estado hiperglicêmico e alterações funcionais renais, quer em humanos, quer em modelos animais, especificamente no que se refere à taxa de filtração glomerular, analisa o comportamento do clearance de creatinina em fases um pouco mais tardias da instalação do *diabetes*. Destacamos, como exceção a este fato, a publicação de TUCKER, RASCH, BLANTZ, (1993) que apresenta a variação do clearance de creatinina de ratos diabéticos-induzido por

estreptozotocina, nos dias 7 à 10 e 50 à 70 de doença, quando comparados aos dos controles, verificando alteração na TFG somente nos últimos dias do protocolo. Nós procuramos estudar a hemodinâmica glomerular dos animais diabéticos quase que simultaneamente à injeção das drogas, com o intuito de verificar quais seriam os mecanismos envolvidos nas prováveis alterações funcionais renais, independentes de fatores metabólicos. Assim, a diminuição do clearance de creatinina, apresentada pelo modelo induzido por estreptozotocina, no 2º dia de doença, provavelmente reflita disfunção glomerular decorrente da droga, desde que não houve tempo suficiente de hiperglicemia para desencadeamento de tal alteração.

Na tentativa de aprofundarmos o estudo tubular renal dos nossos animais diabéticos, optamos pela realização do clearance de lítio (Cli), descrito por THOMSEN et al (1969), por representar marcador fiel de reabsorção de Na e água pelo túbulo proximal. O íon lítio possui esta propriedade porque, além de ser filtrado livremente no glomérulo e reabsorvido no túbulo proximal, proporcionalmente ao Na e água, não é reabsorvido, nem secretado, nos segmentos distais do nefro (THOMSEN & OLESEN, 1984b). Assim, índices referentes à excreção e reabsorção fracionais proximais de sódio (FENa e RPNa) bem como, reabsorção pós-proximal fracional de sódio (RPPNa), constituem importantes e precisos indicadores de tubulopatias, associadas ou não, à glomerulopatias.

Observamos, nos 2 modelos de *diabetes* induzido, aumento progressivo da FENa em relação ao tempo de duração da doença. Entretanto, a excreção de sódio dos diabéticos aloxânicos foi nitidamente mais intensa, alcançando níveis extremamente elevados nos 2 últimos dias analisados do protocolo experimental. A significância estatística destes resultados não pôde ser estimada devido ao reduzido número de animais nestes tempos, respectivamente, 4 e 3.

Paralelamente à elevação das taxas de excreção de sódio, verificamos, de maneira geral, diminuição progressiva da reabsorção proximal de sódio, tanto no modelo aloxânico, quanto no induzido por estreptozotocina. Novamente, observamos que os animais do 1º modelo apresentaram tendência maior à queda da RPNa.

Quando estudamos o comportamento da reabsorção pós-proximal fracional de sódio dos nossos animais, pudemos observar que ambos os modelos apresentaram aumento deste parâmetro. A RRPNa apresentou níveis máximos no 28º dia de *diabetes* para o rato aloxânico e no 56º dia para o induzido por estreptozotocina.

O trabalho mais recente disponível na literatura que avalia função tubular no *diabetes* experimental, é o de KANEDA et al. (1992), que demonstra aumento da fração de excreção proximal de sódio em ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina no 15º dia de doença, quando comparados a ratos controle. Contudo, não verificamos presença de estudo utilizando clearance de lítio como marcador de tubulopatias proximal e pós-proximal no *diabetes* em relação ao tempo de doença, tão pouco estudos comparando possíveis diferenças entre os 2 modelos experimentais de tais alterações tubulares renais.

Nossos resultados referentes ao estudo da função tubular renal demonstram que, ambos os modelos de *diabetes* apresentam, além do comprometimento glomerular, evidente disfunção tubular, observada através do enorme aumento da FENa paralelo à queda da RPNa, não compensada por aumento na RPPNa. Esta tubulopatia foi mais severa no modelo aloxânico, revelando, possivelmente, maior toxicidade desta droga. MARTINO et al. (1986), estudando aspectos metabólicos e ultra-estruturais da glomerulopatia em ratos diabéticos aloxânicos, verificaram diminuição da atividade da bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, com subsequente alteração da fosforilação oxidativa, não revertida com a insulinização. O

trabalho conclui que no *diabetes* induzido por aloxana ocorrem importantes distúrbios metabólicos, que não parecem ser dependentes da doença propriamente dita. Analisando nossos dados, parece pouco provável que o estado hiperglicêmico por si só seja responsável por estes processos patológicos. Supondo-se que a tubulopatia inicia-se a partir do 2º dia de doença, não haveria tempo hábil para que a hiperglicemia promovesse alterações bioquímicas ou morfológicas capazes de explicar tal quadro. Novo protocolo experimental com grupo de animais insulinizados permitirá avaliar o real papel do descontrole metabólico na evolução da tubulopatia no *diabetes* induzido.

Na avaliação da proteinúria no *diabetes* experimental, verificamos sua rápida manifestação após a indução da doença, constituindo-se na principal alteração funcional renal em ratos cronicamente diabéticos (RASCH & MOGENSEN, 1980; PENNEL et al., 1981). Por outro lado, excreção aumentada de proteínas urinárias pode ser prevenida ou revertida através do transplante de ilhotas β pancreáticas ou por insulinoterapia (MAUER et al., 1978; RASCH, 1980). Dentre as proteínas excretadas na urina dos ratos diabéticos, a albumina tem sido exaustivamente estudada, por representar marcador importante de nefropatia diabética (TUCKER, 1990). Sabe-se que alterações glomerulares precoces ocorrem no *diabetes* produzindo aumento da filtração de macromoléculas. Destas, as principais são: hiperfiltração glomerular, hipertrofia e hiperplasia renais, glicosilação das proteínas, albumina circulante e alterações na composição da matriz extracelular glomerular (BRYAN et al., 1993).

Entretanto, trabalhos analisando cinética protéica urinária demonstram que o aumento da excreção de albumina urinária no *diabetes* experimental também se deve à diminuição da capacidade tubular renal em reabsorver proteínas; esta alteração mantém correlação diretamente proporcional ao tempo de doença e mau controle (ABRASS, 1984).

Estudos morfológicos indicam que o comprometimento da reabsorção tubular de proteínas está intimamente relacionado à diminuição da altura das bordaduras em escova das células tubulares proximais renais, desde que a albumina é reabsorvida por processo de endocitose (BRYAN et al., 1993).

A análise das proteinúrias dos animais do nosso protocolo experimental, revelou aumento tanto significativo quanto progressivo ao longo do tempo de doença. Elas foram intensas já a partir do 2º dia de *diabetes*, sendo mais graves no modelo aloxânico.

Quando estudamos a excreção de albumina urinária, verificamos que somente os ratos aloxânicos apresentaram aumento significativo da albuminúria, fato observado precocemente (2º dia de doença). Contudo, ambos modelos demonstraram albuminúrias elevadas significativamente nos demais dias do protocolo, com predomínio do modelo induzido por aloxana.

Estes resultados podem ser interpretados como sendo resultantes, tanto de fatores metabólicos alterando as funções glomerular e tubular renais, quanto de fatores tóxicos, inerentes à droga, desde que somente no *diabetes* aloxânico houve intensa albuminúria, praticamente simultânea à indução da doença.

A análise qualitativa da proteinúria, avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, em 5 ratos diabéticos de cada modelo induzido e 5 ratos controle seguidos em função do tempo de doença, revelou peptídeos com pesos moleculares variando de > 205 à 11 kDa nos diabéticos e de 58, 15 e 11 kDa nos controles. Em ambos os modelos experimentais, a intensificação de coloração das bandas com pesos moleculares 58, 15 e 11 kDa nos primeiros 2 dias de *diabetes*, pode ser explicada tanto por lesão tóxica das células renais, comprometendo a reabsorção das proteínas plasmáticas filtradas, como por mecanismos

relacionados à hiperglicemia. Desta forma, a rápida elevação na excreção de proteínas após a indução de *diabetes*, associada ao imediato declínio após instituição de terapia insulínica, sugere ser a proteinúria manifestação aguda de alteração da hemodinâmica glomerular (PENNEL & MEINKING, 1982). Trabalhos, utilizando ratos diabéticos, evidenciaram glicosilação não enzimática das proteínas plasmáticas, inclusive da albumina, imediatamente após elevação dos níveis de glicemia plasmática (DAY et al., 1979).

Quanto à excreção progressiva de proteínas urinárias, nos 2 modelos de *diabetes*, com pesos moleculares variando de >205 à 45 kDa, parece-nos razoável admitir que tal excreção se deva mais às alterações morfo-funcionais desencadeadas pelo estado metabólico alterado, do que propriamente por eventuais mecanismos tóxicos das drogas.

Em ambos os modelos, a intensificação de coloração das bandas com pesos moleculares baixos (58, 15 e 11 kDa), observada nos últimos dias do protocolo experimental, pode ser explicada tanto por alterações renais decorrentes do *diabetes*, quanto por fatores nefrotóxicos. Vale ressaltar, que as bandas protéicas dos ratos diabéticos aloxânicos apresentaram maior intensidade de coloração, quando comparadas às dos ratos diabéticos-induzido por estreptozotocina.

Estudos recentes utilizando modelos de *diabetes* induzido têm focado a importância das alterações tubulares renais, mais precisamente a enzimúria e proteinúria de baixo peso molecular, como marcadores de instalação de nefropatia diabética (CHOUTNARD, VIAU, GRESELIN, 1992a; CHOUTNARD & VIAU, 1992b). Dentre elas, destacam-se: β 2-microglobulina (peso molecular de 11,20 kDa), desidrogenase láctica (LDH), γ glutamil-transpeptidase (γ GT), alanino-amino-peptidase (AAP), β -D-galactosidase (β -GAL) e β -N-acetil-D-glicosaminidase (β -NAG). Os autores defendem a teoria de que a proteinúria tubular seria decorrente do

diabetes, uma vez que a normalização da glicemia resulta no retorno da excreção urinária protéica aos valores encontrados nos animais controle. Além disto, KARUNANAYAKE, HEARSE, MELLOWS, (1976) demonstraram que 70% da estreptozotocina injetada em ratos, por via EV, é eliminada em aproximadamente 6 horas, afirmando que proteinúrias mantidas até 12 semanas após a instalação da doença, dificilmente seriam explicadas por mecanismos nefrotóxicos.

Em nosso protocolo experimental, os animais tornados diabéticos apresentaram evidente elevação da excreção de proteínas com pesos moleculares de 15 e 11 kDa, que podem representar algumas dessas enzimas citadas acima e, eventualmente, a própria β 2-microglobulina.

Resta considerarmos se, realmente, as alterações promovidas por tais drogas indutoras de *diabetes* não poderiam perpetuar-se e, assim, constituírem-se em fatores, se não exclusivos, coadjuvantes no desencadeamento de proteinúrias tão elevadas.

4.2

ANÁLISE DE COLÁGENO IV E LAMININA URINÁRIOS

Outro aspecto, ao mesmo tempo fascinante e intrigante, do *diabetes mellitus* é o comprometimento morfo-funcional da membrana basal dos capilares, constituindo-se em causa final da microangiopatia diabética (RISTELI et al., 1982). Quando analisamos, especificamente, a nefropatia diabética, observamos que as principais alterações morfológicas com repercussão funcional diretamente correlacionada são: espessamento da membrana basal capilar glomerular e expansão da matriz mesangial. Trabalhos utilizando métodos bioquímicos, para quantificação de componentes de membrana basal, têm demonstrado diminuição do proteoglicano de heparan sulfato glomerular no *diabetes*, tanto em

humanos (KANWAR et al., 1983) como em animais (ROHRBACH et al., 1982), além de aumento de colágeno IV e laminina (BEISSWENGER & SPIRO, 1973; TAYLOR et al., 1980). Tais alterações desencadeiam distúrbios relacionados à função glomerular de transporte de macromoléculas e barreira seletiva de carga.

HANEDA et al. (1991), estudando cultura de células mesangiais glomerulares de ratos sob gradientes crescentes de glicose, demonstraram aumento progressivo de colágeno IV. Embora o grupo não tenha elucidado se este aumento é decorrente de elevação de biossíntese ou diminuição de degradação de colágeno IV, há maior favorecimento da primeira hipótese. Corroborando esta teoria, outros trabalhos demonstraram elevação da expressão de RNA mensageiro para colágeno IV em cultura de células endoteliais humanas (CAGLIERO et al., 1988) e em células do córtex renal de camundongos diabéticos (LEDBETTER et al., 1990).

Ao mesmo tempo, começaram a surgir trabalhos estudando o metabolismo da membrana basal através de quantificações por métodos imuno-químicos, primeiramente sérica e posteriormente, urinária, de algumas de suas proteínas, tais como colágeno IV, laminina e seus fragmentos (MATSUMOTO et al., 1990; PIETCHMANN et al., 1988; TORFFVIT et al., 1991; HAGASHI et al., 1992). HÖGEMANN et al. (1986), comparando pacientes diabéticos a controles, observaram aumento dos níveis séricos da fração 7S do colágeno IV e de laminina. HAGASHI et al. (1992) apontaram para a possibilidade de utilizarmos a concentração urinária de colágeno IV, quantificada por método de EIA, como marcador de lesão renal insipiente, em pacientes diabéticos sem nefropatia instalada.

Foi, norteados por estes fatos, que passamos a analisar a expressão antigênica de colágeno IV e laminina urinários de ratos tornados

diabéticos, com modelo droga-induzido, através de técnica de “*immunoblotting*”, que associa o poder analítico da eletroforese à alta especificidade da reação antígeno-anticorpo (STOTT, 1989).

Quando realizamos eletroforeses em gel a 14% de poliacrilamida-SDS do colágeno IV na forma reduzida, demonstramos diferentes peptídeos com padrões compatíveis aos descritos na literatura (RISTELI & TIMPL, 1980). Desta forma, o domínio NC-1 da molécula de colágeno IV, da membrana basal renal, após redução, mostrou componentes de peso molecular variando entre 187 e 164 kDa, originários das cadeias α_1 e α_2 , que por sua vez dão origem a grandes fragmentos da tripla hélice de 120 a 140 kDa, ligadas por pontes dissulfídicas. Estes últimos geram através de novas clivagens, elementos de 100 e 75 kDa, os quais posteriormente se quebram produzindo peptídeos com peso molecular entre 15 e 70 kDa (RAUTER & GLANVILLE, 1981). Fragmentos de pesos moleculares mais altos derivam da redução do domínio 7S do colágeno IV, de 360 kDa (RISTELI et al, 1980).

Igualmente ao analisarmos a laminina, através de técnica eletroforética, sob condições idênticas ao colágeno IV, verificamos fragmentos de pesos moleculares semelhantes aos descritos na literatura (FOIDART et al., 1980). Suas pontes dissulfídicas reduzidas originaram 2 cadeias polipeptídicas de 200 a 220 kDa e 400 a 440 kDa, cujas separações são dificultadas devida à sua reagregação, mesmo após redução. Mesmo assim, a estrutura proposta para a laminina define um grande componente de 290 kDa e outro de 45 kDa, juntamente com inúmeros outros de menor peso molecular (ROHDE, BÄCHINGER, TIMPL, 1980).

Nosso estudo revelou que animais diabéticos, tanto aloxânicos quanto induzidos por estreptozotocina, excretaram na urina as seguintes frações de colágeno IV demonstrado pelos “*immunoblottings*”, com anticorpo anti- colágeno IV: fração de 75 kDa, provavelmente derivada da cadeia α_2

do domínio NC-1 do colágeno IV, em todos os dias do protocolo experimental e fração de 88 kDa, de igual origem, a partir do 35º dia de doença.

Estes dados confirmaram a hipótese da existência de excreção urinária de fragmentos de colágeno IV no *diabetes mellitus* experimental, além de, mostrarem a semelhança de produtos de excreção em ambos os modelos. Por outro lado, não pudemos concluir se este achado foi decorrente de síntese aumentada e/ou diminuição da degradação dos componentes da membrana basal renal, levando ao seu acúmulo e espessamento.

Embora HAGASHI et al (1992) tenham observado excreção urinária do domínio 7S do colágeno IV, com peso molecular de 360 kDa, em pacientes diabéticos, é de esperar-se que não obtivéssemos resultados semelhantes, desde que nossa metodologia, diferentemente da técnica de EIA, não prevê detecção de peptídeos com pesos moleculares tão elevados.

A excreção urinária da fração de peso molecular 88 kDa a partir do 35º dia de doença, nos faz refletir sobre a possibilidade do rim diabético, em fases mais tardias da doença, perder a capacidade de reabsorção destes fragmentos, indicando deterioração da função renal.

Com relação à análise da excreção urinária de laminina, excetuando-se a fração protéica de 88 kDa, nossos resultados demonstraram haver certa diferença, quando comparamos os modelos de *diabetes* por aloxana e estreptozotocina. A fração urinária de laminina de peso molecular 108 kDa esteve presente em todos os dias do protocolo experimental, porém com intensidades variáveis. Assim, no modelo aloxânico, observamos reação de intensidade forte para a fração de 108 kDa, em todos os dias analisados, enquanto no modelo por estreptozotocina, esta reação ocorreu de forma gradativa em relação ao tempo de doença. Fato semelhante foi verificado quando analisamos a excreção urinária da fração de peso

molecular 57 kDa; no *diabetes* induzido por aloxana constatamos sua presença desde o 2º dia do protocolo, através de reação de intensidade fraca, a qual acentuou-se nos demais dias estudados. Entretanto, no modelo induzido por estreptozotocina esta reação só pôde ser verificada a partir do 35º dia de doença. Estes achados podem indicar, a nível renal, maior agressividade da droga no *diabetes* aloxânico, quando comparado ao induzido por estreptozotocina.

Os fatores desencadeantes da excreção urinária de laminina nos nossos animais diabéticos-induzido, são desconhecidos e discutidos de forma semelhante à de colágeno IV.

No protocolo experimental dos ratos-controle não foram detectadas excreção urinária de colágeno IV e laminina.

Embora estudos anteriores tenham comprovado reversibilidade do aumento sérico de tais componentes de membrana basal, através da normalização dos níveis glicêmicos com instituição de insulinoterapia (RISTELI et al., 1982), não encontramos informações disponíveis na literatura, analisando excreção urinária destes elementos em fases precoces de doença, nem tampouco, comparando modelos de *diabetes* induzido. Contudo, nossos achados merecem continuidade de investigação, incluindo insulinização dos animais diabéticos, para que possamos obter melhor compreensão de seus significados.

4.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A presença de espessamento da membrana basal tanto glomerular como tubular, além da expansão da matriz mesangial como achados característicos da nefropatia diabética, levaram à exaustiva investigação da

verdadeira alteração morfológica renal desencadeada pelo *diabetes mellitus*.

Assim, estudos imuno-citoquímicos possibilitaram a compreensão das alterações dos componentes da membrana basal quanto à localização e distribuição no glomérulo. Empregando-se microscopia óptica, FALK et al (1983) observaram aumento de colágeno IV nas fases precoce e intermediária da doença renal diabética. SCHLEICHER et al. (1988) demonstraram intensificação da reação imuno-histoquímica para colágeno IV e diminuição para proteoglicano de heparan sulfato na glomerulosclerose difusa diabética. Por outro lado, nas lesões nodulares renais do *diabetes*, não foi observado nenhum grau de reação para ambos componentes da membrana basal citados anteriormente. A nível ultra-estrutural, DESJARDINS et al. (1990), estudando rins normais, detectaram localização preferencial das cadeias α_1 e α_2 do colágeno IV nas porções subendoteliais e mesangiais glomerulares, quando comparadas às cadeias α_3 e α_4 que ocupam basicamente a camada epitelial. Tal heterogeneidade de distribuição dos elementos de membrana basal glomerular poderia indicar tanto diferenças na origem embrionária de tais componentes, como principalmente, variações do arranjo estrutural e funcional das membranas basais (DESJARDINS et al., 1990). Assim, enquanto a camada epitelial da membrana basal glomerular estaria organizada como matriz densa, a camada endotelial apresentaria estrutura mais frouxa, facilitando a penetração e passagem de proteínas séricas através da porção epitelial, como demonstrado, através de estudos imuno-citoquímicos, em animais diabéticos-induzido utilizando albumina endógena e imunoglobulinas séricas do tipo IgG (BENDAYAN, GINGRAS, CHAREST, 1986; DESJARDINS & BENDAYAN, 1989). Concomitantemente às alterações relacionadas ao colágeno IV, ocorrem aumento de laminina e fibronectina durante o desenvolvimento da nefropatia diabética (OLGEMÖLLER & SCHLEICHER, 1993).

Conhecendo-se as importantes funções destes elementos na manutenção da integridade da membrana basal, tais como, barreiras de filtração e suporte, além de adesão, migração e proliferação linfocitária, conclui-se que, alterações nos diferentes componentes da membrana basal, em condições patológicas, correlacionar-se-iam com eventuais distúrbios funcionais (HUDSON et al, 1989). Estudo morfológico analisando especificamente os componentes colágeno IV e laminina na membrana basal renal dos animais diabéticos utilizados no nosso trabalho, auxiliaria no entendimento de sua relação histopatológica com a alteração bioquímica-funcional encontrada.

Realizamos, inicialmente, o estudo morfológico da membrana basal glomerular e tubular renais através da coloração pelo PAS, que mostrou leve espessamento e expansão da matriz mesangial, em ambos os modelos de *diabetes*, a partir do 10º dia de doença. Alterações na espessura da membrana basal não puderam ser analisadas, desde que tal avaliação só seria possível através de medições utilizando-se microscopia eletrônica. O ácido periódico associado ao reagente de Schiff reagem com polissacarídeos do tecido, oxidando-os em polialdeídos, que por sua vez, são intensamente corados (HOTCHKISS, 1948). Portanto, o método PAS por corar glicoproteínas em geral, não é específico para componentes de membrana basal. De maneira contrária, o emprego da técnica de imuno-histoquímica, através de anticorpos anticolágeno IV e antilaminina, permite-nos identificação de regiões distintas da membrana basal nos diversos processos patológicos, bem como observação estrutural dos tecidos analisados (KATOH et al., 1993).

Quando procedemos à técnica de imuno-histoquímica para detecção de componentes da membrana basal em tecido parafinado, é indispensável fazer-se a digestão enzimática com pepsina. Presume-se que a pepsina tenha a capacidade de solubilizar porções do colágeno IV e laminina,

expondo os sítios antigênicos, eventualmente “mascarados” pela formalina.

A utilização do micro-ondas justifica-se pela acentuação da exposição de antígenos e intensificação da coloração por imunoperoxidase, especialmente de anticorpos contra antígenos de membrana, provavelmente decorrente da irradiação sobre o tecido (VAN VLIJMEN-WILLEMS & VAN ERP, 1993).

A avaliação imuno-histoquímica renal dos animais estudados revelou, somente nos ratos diabéticos aloxânicos, espessamento leve da membrana basal do capilar glomerular e da matriz mesangial no 10º dia de doença. Este espessamento foi moderado, no 28º dia do protocolo experimental, passando para intenso no 56º dia, em ambos os modelos de *diabetes* induzido, tanto para colágeno IV como laminina.

Estes achados corroboram o papel do *diabetes* nas alterações morfológicas da nefropatia diabética; além disso, mostram-nos que, pelo menos em parte, tais alterações podem estar relacionadas às ocorridas no colágeno IV e laminina, quer por aumento de síntese, quer por diminuição da degradação de tais componentes. O modelo aloxânico demonstrou precocidade para aparecimento de alterações, agora correlacionadas à morfologia renal, quando analisada através da técnica de imuno-histoquímica. Este comprometimento específico, sugere, provavelmente, maior gravidade de doença pela droga, desde que mecanismos nefrotóxicos, não poderiam explicar tais alterações. Entretanto, quando observamos os padrões de reação, tanto para colágeno IV como para laminina, no 2º dia de *diabetes*, em ambos os modelos, pudemos verificar alterações mesangiais, com aumento de tamanho e número de células, embora a técnica de imuno-histoquímica não seja a adequada para análise destes dados. De qualquer forma, documentamos fotograficamente estes achados por considerá-los enriquecedores no nosso estudo.

Dessa forma, acreditamos que o avanço no conhecimento das alterações morfo-bioquímico-funcionais renais, bem como o detalhamento da desestruturação de componentes da membrana basal e seu envolvimento na nefropatia diabética, trarão melhores subsídios para compreensão e possível intervenção precoce, desta grave, e ainda tão desconhecida patologia, o *diabetes mellitus*.

CONCLUSÕES

A análise da função renal dos animais do protocolo experimental demonstrou diminuição do clearance de creatinina em função do tempo de doença. O declínio na filtração glomerular foi acompanhado de elevação pronunciada da fração de excreção renal de sódio, associada à diminuição da reabsorção proximal deste ion, não compensada por aumento de sua reabsorção tubular distal. Além disso, pudemos observar elevações progressivas das taxas de proteinúrias e albuminúrias, praticamente simultâneas à indução do *diabetes mellitus*. Ressaltando que estas alterações renais foram mais pronunciadas nos animais diabéticos aloxânicos.

A excreção urinária de peptídeos de colágeno IV e laminina, detectados através da técnica de “immunoblotting”, pôde ser observada precocemente em ambos os modelos de DM experimental, permanecendo presente ao longo do tempo estudado. Ela foi semelhante para todas as frações de colágeno IV (88 e 75 kDa) e laminina (108 e 88 kDa), excetuando-se a de peso molecular de 57 kDa, detectada somente a partir do 35º dia de doença nos animais diabéticos-induzido por estreptozotocina.

Em ambos os modelos experimentais, analisando a morfologia renal através de coloração com PAS, observamos leve espessamento da matriz mesangial, a partir do 10º dia de *diabetes*. Os aspectos morfológicos estudados através da técnica de imuno-histoquímica, para colágeno IV e laminina, demonstraram espessamento precoce da membrana basal do capilar glomerular nos animais diabéticos aloxânicos, quando comparados aos induzidos por estreptozotocina. Contudo, nos tempos subseqüentes do protocolo experimental, verificamos semelhanças entre os resultados,

com intenso espessamento da membrana basal do capilar glomerular e aumento da matriz mesangial.

Concluimos, portanto, que o estudo das funções glomerular e tubular renais, no DM experimental, revelou alterações substanciais relacionadas à taxa de filtração glomerular e à mecanismos de excreção e reabsorção tubulares de sódio, desencadeadas não somente pelo estado hiperglicêmico, mas também por fatores intrínsecos à droga, destacando-se o aloxana. A excreção de frações de colágeno IV e laminina urinárias, podem ser utilizadas como indicadores precoces de nefropatia diabética, havendo correlação entre os achados bioquímico-funcionais e morfológicos renais em ambos os modelos estudados.

SUMMARY

The urine excretion of basement membrane components, specifically collagen IV and laminin, was determined by immunoblotting and analyzed in male diabetic Wistar rats diabetic-induced (alloxan and streptozotocin) and compared to controls, considering the disease period.

We also studied the renal functions: glomerular and tubular, evaluating creatinine and lithium clearance, respectively. Moreover morphological renal aspects were analyzed by using PAS and immunohistochemical staining, for collagen IV and laminin, with the purpose of examining possible alterations at the basement membrane.

In this way, we could observe urine fractions excretions of collagen IV (88, 75 kDa) and laminin (108, 88 kDa), in both DM models, in all periods of study. However the laminin fraction of 57 kDa, in the streptozotocin-induced diabetic animals, was expressed only from the 5th week of the disease, while in the alloxan-induced diabetic animals their excretion was verified earlier (on the 2nd. day).

The renal function alterations were similar in the two models, but with more intensity in the alloxan model. Among them we can underline following: progressive decrease of the glomerular filtration rate, increase of the fractional sodium excretion and decrease of the proximal reabsorption of this ion, not compensated by distal reabsorption increase.

The morphological findings showed a thickness of the capilar glomerular basement membrane and an increase of the mesangial matrix, beginning earlier at the alloxanic *diabetes mellitus*.

In accordance with the data observed in this study, we conclude that at the alloxan and streptozotocin induced DM, urine fractions of collagen IV

and laminin can be used as early markers of diabetic nephropathy. Besides this, the alloxan-induced DM produces functional renal alterations with more intensity, mainly tubular, when compared to the streptozotocin-induced model; in addition, the morphological alterations observed by the immunohistochemical technic could be related to the renal biochemical-functional alterations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASS, C.K.- Diabetic proteinuria: glomerular or tubular origin? **Anal. Nephrol.** 4:337-346, 1984.
- ANDERSEN, A.R.; SANDAHL-CHRISTIANSEN, J.; ANDERSEN, J.K.; KREINER, S.; DECKERT, T.- Diabetic nephropathy in type I (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. **Diabetologia**, 25: 496, 1983.
- ANDERSON, T.; SCHEIN P.S.; McMENAMIN M.G.; COONEY D.A.- Mecanism of action of streptozotocin. **J. Clin. Invest.**, 54: 672-682, 1974.
- AUMAILLEY, M.; WIEDEMANN, H.; MANN, K.; TIMPL, R.- Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. **Eur. J. Biochem.**, 143: 545-552, 1989.
- AYO, S.H.R.A.; RADNIK, W.F.; GLASS, J.A.; GARONI, E.R.; RAMPT, D.R.; KREISBERG, J.I.- Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells growth in high-glucose medium. **Am. J. Physiol.**, 260: F185-191, 1990.
- BALLERMANN, B.J.; SKORECKI, K.L.; BRENNER, B.M.- Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. **Am. J. Physiol.**, 247: F110-118, 1984.
- BANK, N.; KLOSE, R.; AYNEDJIAN, H.S.; NGUYEN, D.; SABLAY, L.B.- Evidence against increased glomerular pressure initiating diabetic nephropaty. **Kidney Int.** 31: 898-905, 1987.

- BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J.- Structure and function of laminin: Anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J.**, **4**: 148-160, 1990.
- BEISSWENGER, P.J.& SPIRO, R.G.- Studies on the human glomerular basement membrane: composition, nature of the carbohydrate units, and chemical changes in diabetes mellitus. **Diabetes**, **22**: 180-193, 1973.
- BENDAYAN, M.; GINGRAS, D.; CHAREST, P.- Distribution of endogenous albumin in the glomerular wall of streptozotocin-induced diabetic rats as revealed by high resolution immunocytochemistry. **Diabetologia**, **29**: 868-876, 1986.
- BLANTZ, R.C.; PETERSON, O. W.; GUSHWA, L.; TUCKER, B.J.- Effect of modest hyperglycemia on tubuloglomerular feedback activity. **Kidney Int.**, **22** (Suppl. 12): 5206-5212, 1982.
- BOSSMAN, F.T.; CLEUTJENS, J.; BECK, C.; HAVENITH, M.- Basement Membrane heterogeneity. **Histochem. J.**, **21**: 629-635, 1989.
- BROD-SIROTA, J.- Methods for the examination of renal function. In: **The Kidney**. London. Butterworth, 1973. Appendix 1. p. 608.
- BROWN, D.M.; KLEIN, D.J.; MICHAEL, A.F.; OEGEMA, T.R.- 35S-glycosaminoglycan and 35S-glycopeptide metabolism by diabetic glomeruli and aorta. **Diabetes**, **31**: 418-425, 1982.
- BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLISSARA, H.- Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N. Engl. J. Med.**, **318**: 1315-1321, 1988.
- BROWNLEE, M.; VLISSARA, H.; KOONEY, T.; ULRICH, P.; CERAMI, A.- Aminoguanidine prevents diabetes, induced arterial wall protein cross-linking. **Science**, **232**: 1629- 1632, 1986.

- BRUNNER, F.P.; BRYNGER, H.; CHALLAH, S.; FASSBINDER, W.; GEERLINGS, W.; SELWOOD, N.H.; TUFVESSON, G.; WING, A.J.- Renal replacement therapy in patients with diabetic nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, **3**: 585-595, 1988.
- CAGLIERO, E.; MAIELLO, M.; BOERI, D.; ROY, S.; LORENZI, M.- Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. **J. Clin. Invest.** **82**: 735-738, 1988.
- CANIVET, J.; CRUZ, A.; MOREAU-LALANDE, M.-Biochemical abnormalities of human diabetic glomerular basement membrane. **Metabolism**, **28**: 1206-1210, 1979.
- CARLIN, B.; JAFFEE, R.; BENDER, B.; CHUNG, A.E.- Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, **256**: 5209-5213, 1981.
- CHAKRABARTI, S.; MA, N.; SIMA, A.A.F.- Reduced number of anionic sites is associated with glomerular basement membrane thickening in the diabetic BB-rat. **Diabetologia**, **32**: 826-828, 1989.
- CHAUVERS, V.M.; BILOUS, R.W.; ELLIS, E.N.; STEFFES, M.W.; MAUER, S.M.- Glomerular lesions and urinary albumin excretion in type I diabetes without overt proteinuria. **N. Engl. J. Med.** **320**: 966-970, 1989.
- CHOUINARD, S.; VIAU, C.; ScD, GRESELIN, E.- Enzymuria and tubular proteinuria in diabetic rats: a 12-week follow-up study. **Ren. Fail.** **14**: 41-47, 1992a.
- CHOUINARD, S. & VIAU, C.- Reversibility of renal tubular dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **70**: 977-982, 1992b.

CHRISTLIEB, A.R.;- Renin, angiotensin, and norepinephrine in alloxan diabetes. **Diabetes**, **23**: 962-968, 1974.

CHUNG, A.E.; JAFFE, R.; FREEMAN, I.L.; VERGNES, J.P.; BRAGINSKI, J.E.- Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. **Cell**, **16**: 277-287, 1979.

COHEN, M.P.& SUMA, M.L.-[35S]sulfate incorporation into glomerular basement membrane glycosaminoglycan is decreased in experimental diabetes. **J. Lab. Clin. Med.**, **98**: 715-722, 1981.

COUCHMAN, J.R.; BEAVAN, L.Q.; McCARTHY, K.J.- Glomerular matrix: Synthesis, turnover and role in mesangial expansion. **Kidney Int.**, **45**: 328-335, 1994.

DAHL-JORGENSEN K.; BRINCHMANN-HANSEN O.; HANSEN K.F.; GANES T.- Effect of near normoglycaemia for two years on progression of early diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy: the Oslo study. **Br. Med. J.**, **293**: 1195-1201, 1986.

DAY, J.F.; THORNBURG, R.W.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W.- Nonenzymatic glucosylation of rat albumin. **J. Biol. Chem.** **254**: 9394-9400, 1979.

De BLAS, A.L.; & CHERWINSKI, H.M.- Detection of autoantigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. **Anal. biochem.**, **133**: 214-224, 1983.

DECKERT, R.; FELDT-RASMUSSEN, B.; BORCH-JOHNSEN, K.; JENSEN, T.; KOFOED-ENEVOLDSEN, A.- Albuminuria reflects widespread vascular damage. **Diabetologia**, **32**: 219-226, 1989.

- DECKERT, T.; HOROWITZ, I.M.; KOFOED-ENEVOLDSEN,; KJELLEN, L.; DECKEERT, M.; LYKKELUND, C.; BURCHARTH, F.- Possible genetic defects in regulation of glycosaminoglycans in patients with diabetic nephropathy. **Diabetes**, **40**: 764-770, 1991.
- DEEN, W.M.; BOHRER, M.P.; BRENNER, B.M.-Macromolecules transport across glomerular capillaries: Application of pore theory. **Kidney Int.**, **16**: 353-365, 1979.
- DESJARDINS, M. & BENDAYAN, M.- Ultrastructural distribution of endogenous IgGs in the glomerular wall of control and diabetic rats. **Histochem. J.** **21**: 731-740, 1989.
- DESJARDINS, M.; GROS, F.; WIESLANDER, J.; GUBLER M.; BENDAYAN, M.- Heterogeneous distribution of monomeric elements from the globular domain (NC1) of type IV collagen in renal basement membranes as revealed by high resolution quantitative immunocytochemistry. **Lab. Invest.**, **63**(4): 637-646, 1990.
- DOI, T.; VLASSARA, H.; KIRSTEIN, M.; YAMADA, Y.; STRIKER, G.E.; STRIKER, L.J.- Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet- derived growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 2873-2877, 1992.
- DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; McLETCHIE, N.G.B.- Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, **1**: 484-487, 1943.
- ELLIS, E.M.; STEFFES, M.W.; CHAVERS, B.; MAUER, S.M.- Observations of glomerular epithelial cell structure in patients with type I diabetes mellitus. **Kidney Int.** **32**: 736-741. 1987.

- ENGVALL, E.- Laminin variants: why, where and when? **kidney Int.**, **43**: 2-6, 1993.
- FALK, R.J.; SCHEINMAN, J.I.; MAUER, S.M.; MICHAEL, A.F.- Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. **Diabetes**, **32**: 34-39, 1983.
- FUKUI, M.; NAKAMURA, T.; EBIHARA, I.; SHIRATO, I.; TOMINO, Y.; KOIDE, H.- ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. **Diabetes**, **41**: 1520-1527, 1992.
- GAMBARDELLA, S.; ANDREANI, D.; CANCELLI, A.; Di MARIO, U.; CARDAMONE, I.; STIRATI, G.; CINOTTI G.A.; PUGLIESE, F.- Renal hemodynamics and urinary excretion of 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ and thromboxane B_2 in newly diagnosed type I diabetic patients. **Diabetes**, **37**: 1044-1048, 1988.
- GAMBARO, G.; CAVAZZANA, A.O.; LUZI, P.; PICCOLI, A.L BORSATTI, A.; GAETANO, C.; MARCHI, E.; VENTURINI, A.P.; BAGGIO, B.- Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. **Kidney Int.**, **42**(2): 285-291, 1992.
- GINSBERG, H.N. - Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states: relationship to atherogenesis. **Diabetes Care**, **14**: 839-943, 1991.
- GOLDFARB, S.; ZIYADEH, F.N.; KERN, E.F.O.; SIMMONS, D.A.- Effects of polyolpathway inhibition and dietary myo-inositol on glomerular hemodynamic function in experimental diabetes mellitus in rats. **Diabetes**, **40**: 465-471, 1991.
- GREENE, D.- The pathogenesis and its prevention of diabetic neuropathy and nephropathy. **Metabol.**, **37**(Suppl. 1): 25-29, 1988.

- HAGASHI, Y.; MAKINO, H.; OTA, Z.-Serum and urinary concentrations of type IV collagen and laminin as a marker of microangiopathy in diabetes. **Diabet. Med.**, **9**: 366-370, 1992.
- HANEDA, M.; KIKKAWA, R.; HORIDE, N.; TOGAWA, M.; KOYA, D.; KAJIWARA, N.; OOSHIMA, A.; SHIGETA, Y.-Glucose enhances type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. **Diabetologia**, **34**: 198-200, 1991.
- HARALSON, M.A.; JACOBSON, H.R.; HOOVER, R.L.- Collagen polymorphism in cultured rat kidney mesangial cells. **Lab. Invest.**, **57**: 513-523, 1987.
- HARTREE, E.F.- Determination of protein. A modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Ann. Biochem.**, **48**: 422-426, 1981.
- HASSEL, J.R.; ROBEY, P.G.; BARAUCH, H.J.; WILCZEK, J.; RENNAD, S.I.; MARTIN, G.R.- Isolation of a heparan sulfate containing proteoglycan from basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **77**: 4494-4502, 1980.
- HÖGEMANN, B.; BALLEISEN, L.P. RAUTERBERG, J.; VOSS, B.; GERLACH, U.- Basement membrane components (7S collagen, laminin P1) are increased in sera of diabetics and activate platelets in vitro. **Haemostasis**, **16**: 428-432, 1986.
- HOLD, P.M.- Photometer for the measurements of sodium and potassium in biological materials. **J. Biol. Chem.**, **45**: 400-408, 1947.
- HOSTETTER, T.H.- Diabetic Nephropathy- Metabolic versus hemodynamic considerations. **Diabetes Care**, **15** (9): 1205-1215, 1992.

- HOSTETTER, T.H.; RENNKE, H.G.; BRENNER, B.M.- The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathy. **Am. J. Med.** **72**: 375-380, 1982.
- HOSTETTER, T.H.; TROY, J.L.; BRENNER, B.M.- Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. **Kidney Int.** **19**: 410-415, 1981.
- HOTCHKISS, D.H.- A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. **Arch. Biochem.**, **16**: 131-141, 1948.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H.- Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedure. **J. Histochem. Cytochem.**, **29**: 557-568, 1981.
- HUDSON, B.J.; WIESLANDER, J.; WISDOM, B.J.Jr.; NOELKEN, M.E.- Good-Pasture syndrome: molecular architecture and function of basement membrane antigen. **Lab. Invest.** **61**: 256-265, 1989.
- HYNES, R.O.; YAMADA, K.M.- Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. **J. Cell Biol.**, **95**: 369-378, 1982.
- INOUE, S.; LEBLOND, C.P.- Three-dimensional network of cords: the main component of basement membrane. **Am. J. Anat.**, **181**: 341-352, 1988.
- ISHIMURA, E.; STERZEL, R.B.; BUDDE, K.- Formation of extracellular matrix by cultured rat kidney mesangial cells. **Am. J. Pathol.**, **134**: 843-855, 1989.

JENSEN, P.K.; CHRISTIANSEN, J.S.; STEVEN, K.; PARVING, H.-H.-
Renal function in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, **21**: 409-414,
1981.

JENSEN, P.K.; CHRISTIANSEN, J.S.; STEVEN, K.; PARVING, H.-H.-
Strict metabolic control and renal function in the streptozotocin diabetic
rat. **Kidney Int.** **31**: 47-51, 1987.

JERNELD, B.- Prevalence of diabetic retinopathy. A population study from the
Swedish Island of Gotland. **Acta Ophthalmol.**, (suppl.188), 1988.

JOHANNESSEN, J.V.- **Electron microscopy in human medicine**. McGraw-
Hill, New York, 1978.

JOHANSSON, C.; BUTKOWSKI, R.; WIESLANDER- The structural
organization of type IV collagen. **J. Biol. Chem.**, **267**(34): 24533-
24537,1992.

JOHANSSON, E.B. & TJÄLVE H.- Studies on the tissue-disposition and fate
of [¹⁴C] streptozotocin with special reference to the pancreatic islets.
Acta Endocrinol., **89**: 339-351, 1978.

KALLUNKI, P.; TRYGGVASON, K.- Human basement membrane heparan
sulfate proteoglycan core protein: a 467-kDa protein containing multiple
domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor,
laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. **J.**
Cell. Biol., **116**: 559-571.

KANEDA, K.; IWAO, J.; SAKATA, N.; TAKEBAYASHI, S.- Correlation
between mitochondrial enlargement in renal proximal tubules and
microalbuminuria in rats with early streptozotocin-induced diabetes. **Acta**
Pathol. JPN., **42**(12): 855-860, 1992.

- KANWAR, Y.S.; FARQUHAR, M.G.- Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76: 1303-1308, 1979.
- KANWAR, Y.S.; ROSENZWEIG, L.; LINKER, A.; JAKUBOWSKI, M.- Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: biochemical and autoradiographic evidence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80: 2272-2275, 1983.
- KARUNANAYAKE, E.H.; HEARSE, D.J.; MELLOWS, G.- Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. **Diabetologia**, 12: 483-488, 1976.
- KASISKE, B.L.; O'DONNELL, M.B.; KEANE, W.B.- Glucose-induced increases in renal hemodynamic function: possible modulation by renal prostaglandins. **Diabetes**, 34: 360-365, 1985.
- KATOH, R.; MURAMATSU, A.; KAWAOI, A.; KOMIYAMA, A.; SUZUKI, K.; HEMMI, A.; KATAYAMA, S.- Alteration of the basement membrane in human thyroid diseases: an immunohistochemical study of type IV collagen, laminin and heparan sulphate proteoglycan. **Virch. Archiv. A. Pathol. Anat.**, 423: 417-424, 1993.
- KEFALIDES, N.A.; ALPER, R.; CLARK, C.C.- Biochemistry and metabolism of basement membranes. **Int. Rev. Cytol.** 61: 167-228, 1979.
- KIM, Y.; KLEPPEL, M.; BUTKOWSKI, R.; MAUER, M.; WIESLANDER, J.; MICHAEL, A.-Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. **Am. J. Pathol.**, 138:413-420, 1991.
- KIM, Y.K.; KLEPPEL, M.M.; BUTTOWSKI, R.; MAUER, S.M.; WIESLANDER, J.; MICHAEL, A.F.- Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. **Am. J. Pathol.** 138: 413-420, 1991.

- KING, A.J.; ZAYAS, M.A.; TROY, J-L.; DOWNES, S.J.; BRENNER B.M.-
Inhibition of diabetes-induced hyperfiltration and hyperemia by N-
monomethyl-L- arginine (L-NMMA). **J. Am. Soc. Nephrol.**, **1**: 666-672,
1990.
- KLEINMAN, J.; KLEBE, K.R.J.; MARTIN, G.R.- Role of collagenous
matrices in the adhesion and growth of cells. **J. Cell. Biol.**, **88**: 473-478,
1981.
- KOCH-JENSEN, P.; STEVEN, K.; SANDAHL-CHRISTIANSEN, J.;
PARVING H-H.- The effects of indomethacin on glomerular
hemodynamics in experimental diabetes. **Kidney Int.** **29**: 490-496. 1986.
- LAEMMLI, U.K.- Cleavage of structural protein during the assembly of the
basal of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-688, 1970.
- LARKINS, R.G.; DUNLOP, M.E.- The link between hyperglycaemia and
diabetic nephropathy. **Diabetologia**, **35**: 499-504, 1992.
- LAURELL, C.B.- Quantitative stimation of proteins by eletrophoresis in
agarose gel containing antibodies. **An. Biochem.**, **15**: 45-52, 1966.
- LEBLOND, C.P.; LAURIE, G.W.- Morphological features of connective
tissues. **Reumathology**, **10**: 1-12, 1986.
- LEDBETTER, S.R.; COPELAND, E.J.; NOONAN, D.; VOGELI, GL/
HASSEL, J.R.- Altered steady-state in mRNA levels of basement
membrane proteins in diabetic mouse kidneys and thromboxane synthase
inhibition. **Diabetes**, **39**: 196-203, 1990.
- LeDOUX S.P.; WOODLEY, S.E.; PATTON, N.J.; WILSON, G.L.-
Mechanism of nitroso-urea-induced β -cell damage: alterations in DNA.
Diabetes, **35**: 866, 1986.

- LEVY, J.; ZEMEL, M.B.; SOWERS, J.R.- Role of cellular calcium metabolism in abnormalities in glucose metabolism diabetic hypertension. **Am. J. Med.**, **87** (Supl. 6A): 7-16, 1989.
- LI, W.; CHAN, L.S.; KHATAMI, M.; ROCKEY, J.H.- non-competitive inhibition of myo-inositol transport in cultured bovine retinal capillary pericytes by glucose and reversal by sorbinil. **Biochem. Biophys. Acta**, **857**: 198-208, 1986
- MAKINO, H.; YAMASAKI, Y.; HARAMOTO, T.; SHIKATA, K.; HIRONAKA, K.; OTA, Z.; KANWAR, S.- Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. **Lab. Invest.**, **68**(1): 45-55, 1993.
- MARKS, H.H- Longevity and mortality of diabetes. **Am. J. Publ. Health** **55**: 416-427, 1976.
- MARTINO, G.; BOTTE, L.; GUALÀ, L.; COVELLO, C.- Metabolic and ultrastructural aspects of experimental diabetic glomerulopathy. **J. Endocrinol. Invest. (ITALY)**, **9**: 87-95, 1986.
- MATSUMOTO, E.; MATSUMOTO, G.; OOSHIMA, A.; KIKUOKA, H.; BESSHO, H.; MIYAMURA, K.- Serum type IV collagen concentrations in diabetic patients with microangiopathy as determined by exzyme immunoassay with monoclonal antibodies. **Diabetes**, **39**:885-890, 1990.
- MAUER, S. M.; COHEN, J.J.; HARRINGTON, J.T.; MADIAS, N.E.- Structural-functional correlations of diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, **45**: 612-622, 1994.

- MAUER, S.M.; STEFFES, M.W.; ELLIS, E.N.; SUTHERLAND, D.E.R.; BROWN, D.M.; GOETZ, F.C.- Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **J. Clin. Invest.**, **74**: 1143-1155, 1984.
- McCALEB, M.L.; Mc KEAN, M.L.; HOHMAN, R.C.; LAVER, N.; ROBINSON, W.G.- Intervention with aldose reductase inhibitor, tolrestat, in renal and retinal lesions of streptozotocin diabetic rats. **Diabetologia**, **34**: 659-701, 1991.
- MICHELS, L.D.; DAVIDMAN, M.; KEANE, W.F.- Determinants of glomerular filtration and plasma flow in experimental diabetic rats. **J. Lab. Clin. Med.**, **98**: 869-885, 1981.
- MICHELS, L.D.; O'DONNELL, M.P.; KEANE, W.F.-Glomerular hemodynamic and structural correlations in long-term experimental diabetic rats. **J. Lab. Clin. Med.**, **103**: 840-847, 1984.
- MIWA, I.; HARA, H.; OKUDA, J.; MATSUNAGA, H.; OGAWA, S.- Inhibition of glucokinase in hepatocytes by alloxan. **Biochem Int.**, **9**: 595-602, 1984.
- MOGENSEN, C.E. & CHRISTENSEN, C.K.- Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. **N. Engl. J. Med.** **311**: 89-93, 1984.
- MOGENSEN, C.E.- Kidney function and glomerular permeability to macromolecules in early juvenile diabetes. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **28**: 91-95, 1971a.
- MOGENSEN, C.E.- Glomerular filtration rate and renal plasma flow in normal and diabetic man during elevation of blood sugar levels. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **28**: 177-182, 1971b.

- MOGENSEN, C.E.- Renal functional changes in diabetes. **Diabetes** 25 (suppl. 2): 872-879, 1976.
- MORDERS, J.P. & ROSSINI, A.A.- Animal models of diabetes. **Am. J. Med.**, 70: 353-364, 1981a.
- MORDERS, J.P.; ROSSINI, A.A.; MILLER, W.A.- Experimental and spontaneous diabetes in animals. In: **Diabetes Mellitus and Obesity**. Bleicher S. and Brodoff B., Eds. Baltimore, Williams & Williams, 1981b.
- NERLICH, A.; SCHLEICHER, E.- Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. **Am. J. Pathol.**, 139: 889-899, 1991.
- O'DONNELL, M.P.; BERTRAM L.K.; KEANE W.F.- Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. **FASEB J. (USA)**, 2: (8): 2339-2347, 1988.
- OBERLEY, T.D.; MURPHY-ULLRICH, J.E.- Fibronectin and the kidney. In: MOSHER, D.F. (ed)- **Biology of Extracellular Matrix: A series**. San Diego, California, Academic Press, 1989. p. 309-326.
- OKAMOTO, H.- Molecular basis of experimental diabetes: degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic β -cells of islets of Langerhans. **Bioessays**, 2: 15, 1985.
- OKAMOTO, H.- Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. **Mol. Cell. Biochem.**, 37: 43, 1981.
- OLGEMÖLLER, B. & SCHLEICHER, E.- Alterations of glomerular matrix proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clin. Investig.**, 71: S13-19, 1993.

- OLGEMÖLLER, B.; SCHWAABE, S.; GERBITZ, K.D.; SCHLEICHER, E.D.-Elevated glucose decreases the content of a basement membrane associated proteoglycan in proliferating mesangial cells. **Diabetologia**, **35**: 183-186, 1992.
- ORTOLA, F.V.; BALLERMANN, B.J.; ANDERSON, S.; MENDEZ, R.E.; BRENNER, B.M.- Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, **80**: 670-678, 1987.
- ØSTERBY, R.; GUNDERSON, H.J.G.- Glomerular size and structure in diabetes mellitus: early abnormalities. **Diabetologia**, **11**: 225-259, 1975.
- ØSTERBY, R.; PARVING, H.H.; NYBERG, G.; HOMMEL, E.; JORGENSEN, H.E.; LOKKEGAARD, H.; SVALANDER, C.- A strong correlation between glomerular filtration rate and filtration surface in diabetic nephropathy. **Diabetologia**, **31**: 265-270, 1988.
- PARTHASARATHY, N. & SPIRO, R.G.- Characterization of the glycosaminoglycan component of the renal glomerular basement membrane and its relationship to the peptide portion. **J. Biol. Chem.**, **256**: 507-511, 1981.
- PARTHASARATHY, N. & SPIRO, R.G.- Effect of diabetes on the glycosaminoglycan component of the human glomerular basement membrane. **Diabetes**, **31**: 738-741, 1982.
- PARVING, H.H.; CHRISTIANSEN, J.S.; NOER, I.; TRONIER, B.; MOGENSEN C.E.- The effect of glucagon infusion on kidney function in short-term insulin-dependent juvenile diabetes. **Diabetologia**, **19**: 350-356, 1980.

- PATTERSON, J.W.; LAZAROW, A.; LEVEY, S. - Alloxan and dialuric acid: their stabilities and ultraviolet absorption spectra. **J. Bio. Chem.**, **177**: 187-196, 1949.
- PEDERSEN, M.M.; CHRISTIANSEN, J.S.; MOGENSEN, C.E.- Reduction of glomerular hyperfiltration in normoalbuminuric IDDM patients by 6 mo of aldose reductase inhibition. **Diabetes**, **40**: 527-531, 1991.
- PENNELL, J.P.; YANAGAWA, N.; HWANG, K.H.; MILLARD, M.M.- Glomerular selective permeability to macromolecular neutral dextrans in experimental diabetes. **Diabetologia**, **20**: 223-227, 1981.
- PENNELL, J.P.; MEINKING, T.L.- Pattern of urinary proteins in experimental diabetes. **Kidney Int.** **21**: 709-713, 1982.
- PIETCHMANN, P.; SCHERNTHANER, G.; SCHNACK, C.H.; GAUBE, S.- Serum concentrations of laminin P1 in diabetics with advanced nephropathy. **J. Clin. Pathol.**, **41**: 929-932, 1988.
- RASCH, R. & MOGENSEN, C.E.- Urinary excretion of albumin and total protein in normal and streptozotocin diabetic rats. **Acta Endocrino.** **95**: 376-381, 1980.
- RAUTER, A. & GLANVILLE, R.W.- Pepsin fragments of human placental type IV collagen showing interrupted triple-helical amino acid sequences. **Physiol. Chem.**, **362**: 943-952, 1981.
- REICHARD P.; BERGLUND B.; BRITZ A.; CARS I.- Intensified conventional insulin treatment retards microvascular complications of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM): the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) after 5 years.**J. Intern Med.**, **230**: 101-112, 1991.

- RISTELLI, J.; DRAEGER, K.E.; REGITZ, G.; NEUBAUER, H.P.- Increase in circulating basement membrane antigens in diabetic rats and effects of insulin treatment. **Diabetologia**, **23**: 266-269, 1982.
- RISTELLI, J.; BÄCHINGER, H.P.; ENGEL, J.; FURTHMAYR, H.; TIMPL, R.- 7S collagen characterization of an unusual basement membrane structure. **Eur. J. Biochem.**, **108**: 239-247, 1980.
- ROHDE, H.; BÄCHINGER, H.P.; TIMPL, R.- Characterization of pepsin fragments of laminin in a tumor basement membrane. Evidence for the existence of related proteins. **Physiol. Chem.**, **361**: 1651-1660, 1980.
- ROHRBACH, D.H.; HASSEL, J.R.; KLEINMAN, H.K.; MARTIN, G.R.- Alterations in the basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. **Diabetes**, **31**: 185-188, 1982.
- SAKSELA, O.; RIFKIN, D.B.- Release of basic fibroblast growth factor heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. **J. Cell. Biol.**, **110**: 767-776, 1990.
- SANDAHL-CHRISTIANSEN, J.; GAMMELGAARD, J.; ORSKOV, H.; ANDERSEN, A.R.; TELMER, S.; PARVING H.H.- Kidney function and size in normal subjects before and during growth hormone administration for one week. **Eur. J. Clin. Invest.**, **11**: 487-493, 1981.
- SATO, S.; MUNAKATA, H.; YOSHINAGA, K.; YOSIGAWA, Z.- Comparison of the chemical composition of glomerular and tubular basement membranes obtained from human kidneys of diabetics and non-diabetics. **Clin. Chim. Acta.**, **61**: 145-150, 1975.
- SAUAIA, H. & LANCINE, E.M.- Vertical slab electrophoresis apparatus. **Anal. Biochem.**, **80**: 125-132, 1977.

- SCHAEFER, R.M.; PACZEK, L.; HUANG, S.; TESCHNER, M.; SCHAEFER, L.; HEIDLAND, A.-Role of glomerular proteinases in the evolution of glomerulosclerosis. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, **30**: 641-646, 1992.
- SCHAMBELAN, M.; BLAKE, S.; NIREZ, M-P.; SRAER, J.; ARDAILLOU, N.- The effects of indomethacin on glomerular hemodynamics in experimental diabetes. **Kidney Int.**, **29**: 490-496, 1986.
- SCHAMBELAN, M.; BLAKE, S.; NIREZ, M-P.; SRAER, J.; ARDAILLOU, N.- Prostaglandin production is increased in glomerulies isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Clin. Res.** **31**: A440-445, 1983.
- SCHLEICHER, E.D.; WAGNER, E.M.; OLGEMÖLLER, B.; NERLICH, A.G.; GERBITZ, K.D- Characterization and localization of basement membrane-associated heparan sulphate proteoglycan in human tissues. **Lab. Invest.** **61**: 323-332., 1989.
- SCHLONDORFF D.- The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. **FASEB J.**, **1**: 272-276, 1987.
- SCHMOLKE, M.; SCHLEICHER, E.; GUDER, W.G.- Renal sorbitol, myoinositol and glycerophosphorylcholine in streptozotocin-diabetic rats. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, **30**: 607-614, 1992.
- SCHOLEY, J.W.; MEYER, T.W.- Effect of insulin on glomerular hemodynamics in rats with diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, **83**: 1384-1389, 1989.
- SEYER-HANSEN, K.; HANSEN, J.; GUNDERSON, H.J.G.: Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study. **Diabetologia**, **18**: 501-505, 1980.

- SKYLER, J.S.- Complicaciones de la diabetes en los noventas. In: RULL, J.A.; ZORRRILLA, E.; JADZINSKY, M.N.; SANTIAGO, J.V.- **Diabetes Mellitus - Complicaciones Crónicas**. México. Interamericana, 1992. p.31-44.
- SONNENBERG, A.; SINDERS, C.J.T.; MODERMANN, P.W.; DAMSKY, C.H.; AUMAILLEY, M. TIMPL, R.- Integrin recognition of different cell bindin fragments of laminin (P1, E3, E8) and evidence that α -6- β -4 functions as a major receptor for fragment E8. **J. Cell. Biol.**, 110: 2145-2152, 1990.
- STEFFES, M.W.; BILOUS, R.W.; SUTHERLAND, D.E.R.; MAUER, S.M.- Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type I diabetes. **Diabetes**, 41: 679-684, 1992.
- STEFFES, M.W.; CHAVERS, B.M.; BILOUS, R.W.; MAUER, S.M.- The predictive value of microalbuminuria. **Am. J. Kidney Dis.** 13: 25-28, 1989.
- STEFFES, M.W.; ØSTERBY, R.; CHAVERS, B.; MAYER, S.M.- Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. **Diabetes**, 38: 1077-1081, 1989.
- STOTT, D.I.- Immunoblotting and dot blotting. **J. Immunol. Methods**, 119: 153-162, 1989.
- TAYLOR, S.A.; PRICE, R.G.; KANG, S.S.; YUDKIN, J.- Modification of the glomerular basement membrane in sucrose-fed and streptozotocin diabetic rats. **Diabetologia**, 19: 364-372, 1980.
- THOMSEN, K.- Lithium clearance: A new method for determining proximal and distal tubular reaabsorption of sodium and water. **Nephron**, 37: 217-223, 1984.

- THOMSEN, K.; SCHOU, M.; STEINESS, I.; HANSEN, H.E.- Lithium as an indicator of proximal sodium reabsorption. **Pflügers Arch.** **308**: 180-184, 1969.
- THOMSEN, K. & OLESEN, O.V.- Renal lithium clearance as a measure of the delivery of water and sodium from the proximal tubule in humans. **Am. J. Med. Sci.** **288**: 158-161, 1984.
- TIMPL, R.- Structure and biological activity of basement membrane proteins. **Eur. J. Biochem.** **180**: 487-503, 1989.
- TIMPL, R.; DZIADEK, M.; FUJIWARA, S.; NOWACK, S.; WICK, G.- Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. **Eur. J. Biochem.**, **137**: 455-462, 1983.
- TIMPL, R.; MARTIN, G.R.- Components of basement membranes. In: FUTHMAYR, H. (ed) **Immunochemistry of the extracellular matrix**.- Connecticut. Florida, CRC Press, 1981. cap. 5, p.119-143.
- TODD, P.B.; BOWMAN, W.- **The physiological anatomy and physiology of man**, ed. Blanchard and Lea. Philadelphia, 1857. p. 129,523,660.
- TOJO, A.; HITOSHI, E.- Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. **Am. J. Physiol.**, **263**: F601-606, 1992.
- TORFFVIT, O.; AGARDH, C.-D.; ALM, P.; WIESLANDER, J.- Urine and serum levels of the carboxyterminal domain (NC1) of collagen IV in membranous glomerulonephritis and diabetic nephropathy. **Nephron**, **59**: 15-20, 1991.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J.- Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**: 4350- 4364, 1979.

- TUCK, M.; CORRY, D.; TRUILLO, A.- Salt sensitivity blood pressure and exaggerated vascular reactivity in the hypertension of diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, **88**: 210-216, 1990.
- TUCKER, B.J.- Early onset of increased transcapillary albumin escape in the awake diabetic rat. **Diabetes**, **39**: 919-923, 1990.
- TUCKER, B.J.; RASCH, R.; BLANTZ, R.C.- Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in preproteinuric and proteinuric diabetic rats. **J. Clin. Invest.** **92**: 686-694, 1993.
- Van Den BORN, J.; Van Den HEUVEL P.W.J.; BAKKER, M.A.H.; BEERKAMP, J.H.; ASMANN, K. J. M.; BERDEN, J.H.M.- A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. **Kidney Int.**, **41**: 115-123, 1992.
- VAN VLIJMEN-WILLEMS, I. & VAN ERP, P.- Microwave irradiation for rapid and enhanced immunohistochemical staining: application to skin antigens. **Biotec. Histochem.**, **68**: 67-74, 1993.
- VERNIER, R.L.; STEFFES, M.W.; SISSON-ROSS, S.; MAUER, S.M.- Heparan sulfate proteoglycan in the glomerular basement membrane in type I diabetes mellitus. **Kidney Int.** **41**: 1070-1080, 1992.
- VIAU, C.; BERNARD, A.; LAUWERYS, R.- Determination of rat urinary measurement to selected nephrotoxicity models. **J. Appl. Toxicol.**, **6**: 191-195, 1986.
- VIBERTI, G.C.; BILOUS, R.W.; MACKINTOSH, D.; KEEN, H.- Monitoring glomerular function in diabetic nephropathy. **Am. J. Med.**, **74**: 256-264, 1983.

- VIBERTI, G.C.; JARRETT, R.J.; MAHMUD, U.; HILL, R.P.; ARGYROPOULOS, A.; KEEN, H.- Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. **Lancet**, **1**: 1430-1432, 1982.
- VLASSARA, H.; BROWNLEE, M.; CERAMI, A.- Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. **J. Exp. Med.**, **164**: 1301-1309, 1986.
- VOGT, B.W.; SCHLEICHER, E.D.; WIELAND, O.H.- Aminolysine bound glucose in human tissues obtained at autopsy: increase in diabetes mellitus. **Diabetes**, **31**:1123-1127, 1982.
- VRACKO, R.- Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. **Am. J. Path.** **77**: 314-346, 1974.
- WASHICO, M.E.& RICE, E.W.- Determinations of glucose by an improved enzymatic procedure. **Clin. Chem.** **7**: 542-545, 1961
- WEBER, M.- Basement membrane proteins. **Kidney Int.**, **41**: 620-632, 1992.
- WEIL, R.; NOZAWA, M.; KOSS, M.-The kidney in streptozotocin diabetic rats. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **100**: 37-49, 1976.
- WISEMAN, J.J.; REDMOND, S.; HOUSE, F.; KEEN, H.; VIBERTI G.C.- The glomerular hyperfiltration of diabetes is not associated with elevated plasma levels of glucagon and growth hormone. **Diabetologia**, **28**: 718-725, 1985b.
- WISEMAN, M.J.; SAUNDERS, A.J.; KEEN, H.; VIBERTI, G.C.- Effect of blood glucose control on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin-dependent diabetes. **N. Engl. J. Med.**, **312**: 617-621, 1985a.

WISEMAN, M.J.; SAUNDERS, A.J.; KEEN, H.; VIBERTI, G.C.- Effect of blood glucose control on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin-dependent diabetes. **N. Engl. J. Med.** **312**: 617-621, 1985c.

WOLF, G.; SHARMA, K.; CHEN, Y.; ERICKSEN, M.; ZIYADEH, F.N.- High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . **Kidney Int.**, **42**: 647-656, 1992.

YURCHENCO, P.D.; SCHITTNY, J.C.- Molecular architecture of basement membranes. **FASEB J.**, **4**: 1577-1590, 1990.

ZATZ, R.; MEYER, T.W.; RENNKE, H.G.; BRENNER, B.M.- Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **82**: 5963-5967, 1985.