

ROBERTO BLEUEL AMAZONAS

**ALTERAÇÕES RENAIIS PRECOCES EM UM MODELO
EXPERIMENTAL QUE COMBINA HIPERTENSÃO
ARTERIAL GENÉTICA E DIABETES MELLITUS:**

efeitos do tratamento anti-hipertensivo

CAMPINAS

2006

Processo Fapesp nº 03/07588-1

ROBERTO BLEUEL AMAZONAS

**ALTERAÇÕES RENAIIS PRECOSES EM UM MODELO
EXPERIMENTAL QUE COMBINA HIPERTENSÃO
ARTERIAL GENÉTICA E DIABETES MELLITUS:**

efeitos do tratamento anti-hipertensivo

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção de título de
Doutor em Clínica Médica, área de concentração
em Clínica Médica..*

Orientador: José Butori Lopes de Faria

CAMPINAS

2006

Processo Fapesp nº 03/07588-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Am 15 a Amazonas, Roberto Bleuel
Alterações renais precoces em um modelo experimental que combina hipertensão arterial genética e diabetes mellitus : efeitos do tratamento anti-hipertensivo / Roberto Bleuel Amazonas. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : José Butori Lopes de Faria
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diabetes Mellitus. 2. Neuropatias diabéticas. 3. Hipertensão arterial. 4. Inibidores de Enzima Conversora da Angiotensina. I. Faria, Roberto Bleuel. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Early renal abnormalities in a experimental model that combinnd genetic arterial hypertension and diabetes mellitus : effect of anty-hypertensive treatment

Keywords: • Diabetes Mellitus
• Diabetic nephropathy
• Arterial hypertension
• Angiotensin-converting enzyme inhibitor

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Doutorado em Clinica Médica

**Banca examinadora: Prof Dr José Butori Lopes de Faria
Prof Dr Carlos Eduardo Poli de Figueiredo
Prof Dr Stephen Hyslop
Prof Dr Kleber Gomes Franchini**

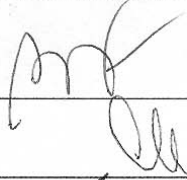
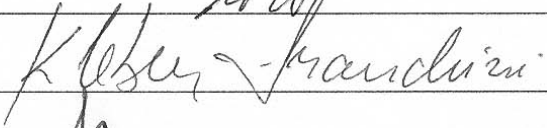
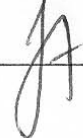
Data da defesa: 04-09-2006

Processo Fapesp n° 03/07588-1

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Bento Fortunato Cardoso dos Santos _____ 
2. Prof(a). Dr(a). Carlos Eduardo Poli de Figueiredo _____ 
3. Prof(a). Dr(a). Stephen Hyslop _____ 
4. Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini _____ 
5. Prof(a). Dr(a). José Butori Lopes de Faria _____ 

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 04/09/2006

DEDICATÓRIA

A minha mãe:

Um exemplo de luta e integridade a ser seguido.

Obrigado por tudo que você me ensinou.

A minha mulher e meu filho que trouxeram brilho e força para prosseguir nos momentos difíceis.

A meus irmãos que se mantiveram firmes durante toda a jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador por ter aberto as portas do seu laboratório para aprimorar o meu conhecimento.

Aos professores da disciplina de nefrologia por tudo que me ensinaram ao longo destes anos.

Aos colegas de laboratório, em especial Lília, Valéria, Kamila, Camila, Jaqueline e Subrata pelo que me ensinaram, e por estarem sempre disponíveis a ajudar durante os experimentos.

Aos grandes amigos Wilson e Marco Antônio por estarem sempre dispostos a ajudar com seus conselhos e grande conhecimento, e dividir todas as dificuldades ao longo do tempo.

Aos professores Kleber e Gontijo pelos ensinamentos de perfusão renal.

Ao senhor Adilton pelas pacientes horas de ensinamento nos experimentos de perfusão renal.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	31
2- OBJETIVOS.....	49
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1- Animais.....	55
3.2- Indução do <i>diabetes mellitus</i>.....	55
3.3- Protocolo 1.....	56
3.4- Protocolo 2.....	57
3.5- Confirmação do diabetes mellitus e randomização para tratamento anti-hipertensivo.....	57
3.6- Glicemia.....	58
3.7- Pressão arterial e determinação do peso corpóreo.....	59
3.8- Coleta de urina e determinação da albuminúria.....	59
3.9- Isolamento de glomérulos.....	60
3.10- Imunofluorescência.....	60
3.11- Western Blot.....	62

3.12- Imunohistoquímica.....	63
3.13- Morfometria.....	64
3.14- Análise Estatística.....	64
4- RESULTADOS.....	65
4.1- Peso Corporal.....	67
4.2- Pressão arterial.....	67
4.3- Glicemia.....	67
4.4- Volume urinário e excreção urinária de albumina.....	72
4.5- Peso do rim.....	72
4.6- Nefrina.....	74
4.5- Análise morfológica.....	77
4.6- Sistema TGF β e Fibronectina.....	77
4.7- Replicação celular, p21 ^{cip1} e p27 ^{kip1}	82
5- DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÃO.....	97
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
8- APÊNDICE.....	123
8.1- Trabalho publicado.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AT 1	receptor tipo 1 da angiotensina II
CAP	tratamento com captopril
CDK	cinase dependente de ciclina
CKIs	inibidores de cinase dependente de ciclina
CTGF	connective tissue growth factor
DM	diabetes mellitus
DM tipo 1	diabetes mellitus tipo 1
DM tipo 2	diabetes mellitus tipo 2
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	excreção urinária de albumina
FITC	isotiocianeto de fluoresceína
HA	hipertensão arterial
HRP	horse radish peroxidase
IECA	inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IRCT	insuficiência renal crônica terminal
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LOS	tratamento com losartan

MAPK	proteínas quinases ativadoras de mitógenos
ND	nefropatia diabética
PKC	proteína cinase C
PSA	amônio per sulfato
RAGE	receptor dos produtos de glicosilação avançada
RPM	rotações por minuto
SMAD	proteínas de sinalização intracelular
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SRA	sistema renina-angiotensina
STZ	estreptozotocina
TA	temperatura ambiente
TGF β	transforming growth factor β
TGF β1	transforming growth factor β 1
TGF β IIR	receptor tipo 2 do transforming growth factor β
TFM	meio congelador de tecido
TRI	tratamento tríplice
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
WKY	Wistar Kyoto

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Parâmetros fisiológicos nos ratos estudados (protocolo 1).....	68
Tabela 2- Parâmetros fisiológicos nos ratos estudados (protocolo 2).....	69
Tabela 3- Glicemia, diurese e albuminúria dos animais estudados (protocolo 1)....	70
Tabela 4- Glicemia, diurese e albuminúria dos animais estudados (protocolo 2)....	71
Tabela 5- Peso do rim e razão peso do rim/peso do animal (protocolo 1).....	73
Tabela 6- Peso do rim e razão peso do rim/peso do animal (protocolo 2).....	74

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Imunofluorescência para nefrina.....	75
Figura 2- Western blot para nefrina.....	76
Figura 3- Morfologia glomerular.....	78
Figura 4- Imunofluorescência para fibronectina.....	79
Figura 5- Western blot para fibronectina.....	80
Figura 6- Western blot para TGF β IIR.....	81
Figura 7- Imunohistoquímica para PCNA.....	83
Figura 8- Western blot para p27 ^{kip1}	84
Figura 9- Western blot para p21 ^{cip1}	85



RESUMO

No diabetes mellitus (DM), a hipertensão arterial (HA) é o principal fator associado ao desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética (ND). Os mecanismos de interação entre HA e DM no agravamento da ND são pouco conhecidos. No presente trabalho investigamos a contribuição da HA nas alterações renais precoces de um modelo que combina HA e DM. Ratos machos com 4 semanas de idade, espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles Wistar Kyoto (WKY), foram tornados diabéticos através da injeção endovenosa de estreptozotocina. Os ratos SHR com DM foram randomizados para tratamento com captopril, losartan, terapia tríplice (hidroclorotiazida, reserpina e hidralazina) e nenhum tratamento por 20 dias. O aumento na pressão sistólica foi igualmente prevenido pelos diversos esquemas anti-hipertensivos. A expressão glomerular de nefrina estava reduzida nos animais SHR controle em relação aos animais WKY, e de forma mais acentuada no grupo SHR DM. A prevenção da HA foi capaz de evitar a redução na nefrina, bem como reduzir a albuminúria. A superfície, expressão de fibronectina e TGF β 1 glomerulares estavam significativamente aumentadas no grupo SHR diabético em relação ao grupo SHR controle e foi prevenida pelos diversos tratamentos. A replicação de células renais foi significativamente menor no grupo SHR diabético em relação ao controle, e restaurado com a prevenção da hipertensão arterial. A expressão glomerular de p27^{Kip1} estava aumentada no grupo SHR diabético, mas não foi modificada pelo tratamento anti-hipertensivo. Em conclusão a presença da HA em ratos diabéticos induziu o aparecimento de alterações renais precoces que puderam ser prevenidas com o tratamento anti-hipertensivo, independente da classe de droga utilizada.



ABSTRACT

In diabetic patients hypertension is the main secondary factor associated with the development and progression of renal disease. However, the mechanism of interaction between diabetes and hypertension to exacerbate diabetic renal disease is poorly understood. The aim of this study was to evaluate the effect of presence of hypertension had on nephrin expression, glomerular hypertrophy, renal cell replication and accumulation of glomerular TGF β and fibronectin in a model of genetic hypertension and experimental diabetes mellitus. Four-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive control Wistar Kyoto (WKY) were rendered diabetic by means of intravenously injection of streptozotocin. To further assess the contribution of hypertension to renal abnormalities diabetic SHR were randomized for no treatment, or for treatment with captopril, losartan or triple therapy (hydrochlorothiazide, reserpine and hydralazine) for 20 days. Increase in systolic blood pressure was equally prevented by captopril (113 ± 9 mmHg), losartan (115 ± 16) and triple therapy (108 ± 12 , $p < 0.005$). Glomerular expression of nephrin was reduced in SHR and further diminished in diabetic SHR in comparison with controls and the antihypertensive treatment prevents the reduction in glomerular expression of nephrin. Glomerular size was higher ($p < 0.005$) in diabetic SHR ($27,300 \pm 2130 \mu\text{m}^2$) compared with non-diabetic SHR ($23,800 \pm 307$). The antihypertensive therapy with captopril ($23,900 \pm 175$), losartan ($23,800 \pm 120$), and triple therapy ($23,400 \pm 210$) prevented the glomerular enlargement in diabetic SHR. Glomerular expression of TGF β and fibronectin was significantly increased in diabetic SHR as compared to the controls, and was prevented with captopril, losartan and triple therapy. The number of replicating glomerular cell significantly decreased in diabetic SHR and it was restored by all three antihypertensive regimes. The glomerular expression of p27^{Kip1} was significantly higher in diabetic SHR but it was not modified by antihypertensive treatment. In diabetic rats the presence of genetic hypertension induced early renal abnormalities that were prevented by strict control of blood pressure. These abnormalities may be involved in the mechanism of interaction between diabetes and hypertension to exacerbate renal disease.



1- INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) pode ser definido como um grupo de desordens do metabolismo dos carboidratos, no qual a glicose é subutilizada produzindo hiperglicemia, devido à absoluta deficiência de secreção e/ou redução da eficácia biológica da insulina (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus..., 2003). Pacientes portadores de DM tipo 1 (insulino-dependentes) e DM tipo 2 (não insulino-dependentes) são suscetíveis ao desenvolvimento de complicações a longo prazo, complicações microvasculares, dentre elas, a nefropatia diabética (Nathan, 1993).

A nefropatia diabética (ND) é uma síndrome clínica caracterizada por albuminúria persistente, aumento da pressão arterial, declínio progressivo da filtração glomerular e aumento de morbi-mortalidade cardiovascular (Wilson et al., 1951; Parving et al., 2004).

A ND representa atualmente a principal causa de insuficiência renal crônica terminal (IRCT) em diversos países do mundo ocidental. Nos Estados Unidos, a incidência de pacientes portadores de IRCT secundária a ND em 2002 foi de 44,5% (U.S. Renal Data System..., 2004). No nosso meio, a ND também é causa importante de insuficiência renal crônica. No município de Campinas, no período de abril de 1992 a abril de 1993, a ND foi a causa provável de insuficiência renal crônica em 18% dos pacientes que iniciavam tratamento dialítico (Lopes de Faria et al., 1995). Estes dados são semelhantes aos observados em outras regiões do Brasil (Registro Brasileiro de Diálise, 1997). Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, a incidência e prevalência de ND devem permanecer aumentando nas Américas (Barceló e Rajpathak, 2001).

Além de sua elevada prevalência, a ND está associada à alta mortalidade por causa cardiovascular. Indivíduos com proteinúria apresentam risco de morte prematura até 100 vezes superior à população não diabética (Borch-Johsen et al., 1985; Dorman et al., 1984), enquanto pacientes diabéticos, sem nefropatia, apresentam mortalidade apenas duas vezes superior àquela de indivíduos não diabéticos (Borch-Johsen et al., 1985).

Em pacientes portadores de DM a presença persistente de microalbuminúria (excreção urinária de albumina entre 20-200µg/min ou 30-300mg/24 horas) tem sido apontado como preditor de evolução para nefropatia diabética clínica (Parving et al., 1982;

Viberti et al., 1982; Mogensen, 1984). A prevalência de microalbuminúria em pacientes portadores de DM tipo 1 é cerca de 20% após 10 anos de doença e chega a 52% após 30 anos de duração do DM (Krolewski et al., 1995; Orchard et al., 1990; Warram et al., 1996). Em pacientes portadores de DM tipo 2, a prevalência de microalbuminúria é de cerca de 20%, entretanto se considerados apenas pacientes com DM tipo 2 e retinopatia diabética, esta prevalência pode chegar à 45% (Delcourt et al., 1996). A prevalência de macroalbuminúria (excreção urinária de albumina superior à 200µg/min ou 300mg/24 horas) é de cerca de 35% em ambos os tipos de diabetes. Entretanto, existe variação entre pacientes portadores de DM. No tipo 1 a prevalência é de cerca de 30% (Borch-Johnsen et al., 1985), já nos pacientes com DM tipo 2 sua prevalência varia de 6-50% (Cowie et al., 1989; Nelson et al., 1989). A maior prevalência da ND tem sido reportada em índios americanos (Pima), essas variações podem ser explicadas, principalmente, por diferenças genéticas (Nelson et al., 1989).

A ND raramente aparece antes dos 10 anos de duração do diabetes em indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 (Krolewski et al., 1985). Nestes pacientes, o pico de incidência da nefropatia ocorre durante a segunda década de doença, seguido de um declínio progressivo na incidência de ND a partir desta década (Krolewski et al., 1985; Andersen et al., 1983). Essa redução no risco do aparecimento da ND em pacientes com longa duração do diabetes, sugere, que apenas a exposição prolongada à hiperglicemia não é suficiente para o aparecimento da ND. Estudos prospectivos comparando o efeito da terapia convencional versus o controle intensivo com insulina demonstram que o melhor controle da hiperglicemia é capaz de reduzir o risco de complicações microvasculares do DM, entre elas a ND (The Diabetes ..., 1993), entretanto, o desenvolvimento de ND não pode ser explicado exclusivamente pelo pobre controle glicêmico (Deckert e Poulsen, 1981). No estudo multicêntrico e prospectivo “Diabetes Control and Complications Trial”, envolvendo um grande número de pacientes com DM tipo 1, que comparou o efeito do tratamento intensivo com insulina versus terapia convencional, demonstrou-se que o controle glicêmico intensivo com insulina foi capaz de reduzir em cerca de 50% a chance de desenvolver macro ou microalbuminúria (The Diabetes..., 1993). No “UK Prospective Diabetes Study” (UKPDS), estudo prospectivo e multicêntrico envolvendo mais de 3000 pacientes com DM tipo 2, que comparou controle intensivo de glicemia com sulfoniluréia

ou insulinoterapia versus controle convencional com dieta, demonstrou que o controle intensivo com insulina ou sulfoniluréia reduziu a probabilidade de progressão de albuminúria em 39% (Intensive blood-glucose control..., 1998). Desta forma, o controle da glicemia previne alguns pacientes do desenvolvimento da nefropatia e outros não. Portanto, o controle glicêmico por si só não explica porque apenas alguns pacientes desenvolvem nefropatia.

Predisposição herdada para nefropatia é fortemente sugerida por estudos que demonstram que essa complicação ocorre com maior frequência em determinadas famílias (Seaquist et al., 1989). Evidência de nefropatia foi observada em 83% dos irmãos diabéticos de pacientes com nefropatia diabética contra 17% naqueles livres de nefropatia (Seaquist et al., 1989). Evidência de agregação familiar foi descrita em uma população dinamarquesa com DM tipo 1 (Borch-Johsen et al., 1992) e em índios Pima com diabetes mellitus tipo 2 (Pettitt et al., 1990). Viberti e colaboradores (1987) demonstraram que pais não diabéticos de indivíduos com ND tinham níveis de pressão arterial mais elevada em relação aos pais de diabéticos sem ND (Viberti et al., 1987), sugerindo, que a predisposição familiar à hipertensão arterial essencial pode aumentar o risco de lesão renal em pacientes com DM tipo 1.

A hipertensão arterial nos pacientes com ND foi inicialmente considerada como secundária ao quadro de insuficiência renal. Estudos posteriores demonstraram que a hipertensão arterial não é meramente consequência da insuficiência renal, pois pacientes com DM tipo 1 e 2 apresentavam aumento da pressão arterial com ritmo de filtração glomerular normal e apenas discreto aumento na excreção urinária de albumina (Mogensen et al., 1988; Parving et al., 1981). Hipertensão arterial sistêmica, em pacientes com DM tipo 1, desenvolve-se principalmente em concomitância ao surgimento da ND. Em contrapartida, aqueles que não desenvolvem a nefropatia permanecem normotensos a despeito da longa duração do diabetes e avanço da idade (Borch-Johnsen et al., 1985; Krolewski et al., 1988).

Krolewski e colaboradores (1988) compararam a frequência de hipertensão arterial em pais de indivíduos portadores de DM tipo 1 com ou sem ND. Possuir um dos pais com hipertensão arterial aumentou em 3 vezes o risco de desenvolver ND.

Além disso, o maior risco estava presente de forma mais evidente nos pacientes com pobre controle glicêmico nas primeiras décadas de DM (Krolewski et al., 1988). Barzilay e colaboradores (1992) em um estudo de caso-controle em indivíduos portadores de DM tipo 1, encontraram correlação entre controle glicêmico e desenvolvimento de ND, e, a presença de proteinúria se correlacionava com uma maior frequência de hipertensão arterial nos pais dos pacientes com nefropatia (Barzilay et al., 1992). Uma questão que surge a partir de tais achados é como a hiperglicemia interage com a hipertensão arterial na indução da nefropatia diabética. Em modelos animais onde existe predisposição à hipertensão arterial, foi possível detectar alterações hemodinâmicas glomerulares, e maior risco para ND, que podem ser detectadas antes que a hipertensão arterial se torne evidente (Bianchi et al., 1983). Esta disfunção glomerular pré-hipertensão arterial pode estar envolvida como fator adicional para uma pior evolução da glomeruloesclerose diabética (Thomsen et al., 1984). Vários estudos têm mostrado que filhos de pais hipertensos apresentam anormalidade na hemodinâmica renal (Blackshear et al., 1987; Uneda et al., 1984). Além disso, o pobre controle glicêmico pode ter impacto na hemodinâmica renal com aumento na fração de filtração (Hostetter et al., 1981), o qual é similar àquele observado em indivíduos com predisposição à hipertensão arterial. A presença destes dois fatores juntos pode produzir um aumento crítico na pressão intraglomerular e favorecer o desenvolvimento da ND durante os primeiros 20 anos de DM.

Correlação entre predisposição à hipertensão arterial essencial e doença renal diabética foi demonstrada através de estudos de transporte celular de cátions. Canessa e colaboradores (1980) demonstraram que pacientes portadores de hipertensão arterial essencial apresentavam aumento na atividade do contra-transporte sódio-lítio em hemácias quando comparados a indivíduos normotensos (Canessa et al., 1980). Diversos estudos confirmaram uma associação entre o aumento do contra-transporte sódio-lítio e hipertensão arterial essencial (Adragna et al., 1982; Carr et al., 1989). Posteriormente, foi demonstrado que filhos normotensos de pais hipertensos também apresentavam elevação do contra-transporte sódio-lítio em hemácias quando comparados aos filhos de pais normotensos (Viberti et al., 1987). Outros estudos também demonstraram que o contra-transporte sódio-lítio seria não apenas um marcador de hipertensão arterial, mas um fator relacionado à predisposição à hipertensão arterial e suas complicações cardiovasculares

(Morgan et al., 1986; Jones et al., 1990). Barzilay e colaboradores (1992) demonstraram que o risco de hipertensão arterial e proteinúria aumentavam em 5 a 10 vezes com o aumento no contra-transporte sódio-lítio, enquanto o risco de microalbuminúria aumentava em 2 a 3 vezes (Barzilay et al., 1992). Neste mesmo estudo, o risco de nefropatia avançada se correlacionou mais intimamente com o aumento no contra-transporte sódio-lítio e hipertensão arterial em pais de indivíduos com DM tipo 1 que a pressão arterial elevada no início da vida adulta, sugerindo que fatores predisponentes à hipertensão arterial são mais importantes que exclusivamente a pressão arterial (Barzilay et al., 1992). Em pacientes com DM tipo 1 e 2, vários estudos têm demonstrado aumento do contra-transporte sódio-lítio na presença de micro ou macroalbuminúria (Barzilay et al., 1992; Jones et al., 1990). Lopes de Faria e colaboradores (1992) demonstraram em pacientes com DM tipo 1 apresentando macro ou microalbuminúria um aumento no contra-transporte sódio-lítio, além de forte associação entre hiperglicemia e aumento no contra-transporte sódio-lítio na determinação de proteinúria (Lopes de Faria et al., 1992). Em estudo já citado, Krolewsky e colaboradores (1988) estudando 3 grupos de pacientes diabéticos: sem complicações; apenas com retinopatia e pacientes com nefropatia todos com duração de diabetes mellitus entre 15-20 anos, observaram que o grupo com nefropatia tinha maiores níveis de glicemia e hemoglobina glicada, assim como aumento no contra-transporte sódio-lítio (Krolewski et al., 1988). Estudo prospectivo com pacientes diabéticos tipo 1 demonstrou que aqueles que evoluíam de normo para microalbuminúria apresentavam aumento no contra-transporte sódio-lítio (Monciotti et al., 1997). A demonstração de aumento do contra-transporte sódio-lítio em filhos de pais com hipertensão arterial essencial (Woods et al., 1982), a forte associação entre valores de contra-transporte sódio-lítio de pacientes com ND e em seus pais representam evidência da importância do fator genético na determinação da atividade desse transporte de cátions (Walker et al., 1990). O papel do contra-transporte sódio-lítio na fisiologia celular não é bem estabelecido, entretanto, acredita-se, que este represente um modo de operação do contra-transporte sódio-hidrogênio (Ives, 1989). A este último tem sido atribuído funções como controle do pH intracelular, reabsorção proximal de sódio, hiperplasia e hipertrofia celulares (Mahnesmith e Aronson, 1985). Correlação entre contra-transporte sódio-lítio e sódio-hidrogênio foi demonstrado em hemácias de pacientes com DM tipo 1 (Semplicini et al, 1989), e estudo prospectivo demonstrou que o

contra-transporte sódio-hidrogênio em hemácias estava associado ao desenvolvimento da nefropatia (Koren et al., 1998). Esses dados sugerem, portanto, que a hipertensão arterial possa participar da patogênese da nefropatia diabética, entretanto, não propõem os mecanismos pelos quais a predisposição à hipertensão arterial aumentariam os riscos de nefropatia diabética.

Estudos recentes têm procurado entender os diversos fatores genéticos envolvidos na predisposição à ND e suas complicações. Tem sido demonstrado que polimorfismo no gene que codifica a aldose redutase (ALR2), a primeira enzima limitante na via do poliol, se correlaciona com suscetibilidade à ND em DM tipo 1 (Heeson et al., 1997). Em outro estudo, o transportador de glicose (GLUT1), o mais importante facilitador do transporte de glicose dentro do glomérulo (Heilig et al., 1995), foi demonstrado estar intrinsecamente envolvido na susceptibilidade à ND, mas não à retinopatia em pacientes diabéticos tipo 1 (Hodgkinson et al., 2001). A partir de estudos de irmãos que são acometidos ou não pela nefropatia diabética, tem se pesquisado por genes que possam identificar suscetibilidade à nefropatia diabética. Neste modelo de estudo Moczuliki e colaboradores (1998) identificaram uma região no braço longo do cromossomo 3 na vizinhança do gene do receptor da angiotensina II, que predispõe pacientes caucasóides à ND (Moczuliki et al., 1998). Recentemente foi demonstrado que camundongos triplamente transgênico com expressão aumentada de iNOS (óxido nítrico sintase induzível), RAGE (receptor de produtos de glicosilação avançada) e Megsin, um gene que está envolvido na proliferação e expansão mesangial, apresentam aumento na albuminúria e hipertrofia glomerular com expansão mesangial (Inagi et al., 2006). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na associação entre predisposição genética e ND permanecem não totalmente esclarecidos.

Aumento do volume do rim e dos glomérulos foi inicialmente descrito em pacientes portadores de DM tipo 1 (Mogensen e Andersen, 1973; Christiansen et al., 1981), contudo alterações ultra-estruturais semelhantes ocorrem no DM tipo 1 e 2. As alterações estruturais mais proeminentes na doença renal do DM ocorrem no glomérulo. Hipertrofia glomerular é uma anormalidade precoce observada em humanos (Osterby e Gundersen, 1975) e modelos animais de doença renal diabética (Zador et al., 1993; Wolf e Ziyadeh,

1992), a qual fica ainda mais pronunciada na fase de proteinúria clínica (Osterby et al., 1987). O aumento do volume glomerular ocorre devido ao aumento na produção de membrana basal e expansão mesangial (Mauer, 1994), a qual se deve a uma combinação de acúmulo de proteínas de matriz extracelular e hipertrofia de células mesangiais (Steffes et al., 1992; Fioreto et al., 1994; Mason e Wahab, 2003). A expansão mesangial é uma das principais características anátomo-patológicas da nefropatia diabética (Adler, 1994) e está diretamente relacionada com a piora da função renal em ambos os tipos de DM (Osterby et al., 2001). O aumento da matriz mesangial leva ao estrangulamento do capilar glomerular, reduzindo a superfície viável para filtração ou ocluindo à luz do capilar glomerular. Aumento da produção de matriz extracelular, assim como redução no “turnover” de seus componentes, contribui para a expansão mesangial. Estudos em animais diabéticos sugerem que a síntese de matriz mesangial, particularmente de colágeno, está significativamente aumentada. A atividade da lisil hidroxilase, uma enzima envolvida na hidroxilação durante a síntese de colágeno, encontra-se significativamente aumentada em glomérulos de ratos diabéticos (Khalifa e Cohen, 1975). Tem sido demonstrado que a alta concentração de glicose causa uma redução na degradação mesangial (McLennan et al., 1994). Além disso, McLennan e colaboradores (2002) demonstraram que na ND experimental existe uma redução na atividade das metaloproteinases de matriz extracelular, enzimas envolvidas na degradação de matriz extracelular, particularmente as metaloproteinases 2 e 9 (McLennan et al., 2002). Dentre os fatores envolvidos no acúmulo de matriz extracelular, a hiperglicemia é, sem dúvida, a principal anormalidade metabólica. Células mesangiais expostas à alta glicose aumentam a expressão de RNA e a síntese protéica de colágeno e fibronectina (Ziyadeh et al., 1994). Em contrapartida, a normalização da glicemia tem se mostrado capaz de prevenir estas alterações celulares de crescimento, e o subsequente desenvolvimento de glomeruloesclerose, e em alguns casos, há possibilidade de reversão da esclerose glomerular (Fioretto et al., 1998). Alterações hemodinâmicas e hiperglicemia têm sido implicadas nas fases iniciais da hipertrofia glomerular, entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia glomerular não estão totalmente esclarecidos. Há evidências que suportam um possível papel de fatores de crescimento como o *transforming growth factor β 1* (TGF β 1) (Ziyadeh et al., 1994), *connective tissue growth factor* (CTGF) (Wahab et al., 2002), sinalizadores intracelulares

como as proteínas quinases ativadoras de mitógenos (MAPK) (Haneda et al, 1997), além de proteínas reguladoras do ciclo celular (Shankland, 1997). O estudo dos mediadores da hipertrofia glomerular frente ao tratamento anti-hipertensivo pode contribuir para melhor compreensão da fisiopatogenia da hipertrofia glomerular e renal, bem como avaliar a possibilidade de uma intervenção precoce sobre esta alteração.

Diversos estudos têm demonstrado um importante papel de proteínas reguladoras do ciclo celular na nefropatia diabética. O ciclo celular é dividido em 4 fases (G1, S, G2 e M). Células quiescentes (fase G0) entram no ciclo celular na fase G1, progredindo à fase S (síntese), onde ocorre a duplicação do DNA. As células prosseguem à fase G2 e em seguida entram na fase M (mitose), subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase, seguida pela citocinese (divisão celular). A transição de uma fase do ciclo celular para outra é um processo coordenado, seqüencial e sincronizado e que ocorre num tempo preciso e em ordem bem definida para assegurar que a célula fique pronta para a replicação do DNA (Grana e Reddy, 1995). As proteínas do ciclo celular têm um importante papel na proliferação, hipertrofia ou apoptose, eventos que estão relacionados às fases do ciclo celular. A proliferação celular requer uma progressão normal pelo ciclo celular; a hipertrofia ocorre quando uma célula entra no ciclo celular e interrompe sua progressão na fase G1, parada na transição G1/S, e a apoptose está associada à saída do ciclo celular que ocorre na fase G1, com subsequente morte celular (Shankland, 1997a). Cada fase do ciclo celular é controlada por proteínas específicas positivas, ciclinas e cinases dependentes de ciclina, e proteínas reguladoras negativas do ciclo celular conhecidas como inibidores de ciclina dependentes de cinases. A localização das proteínas reguladoras do ciclo celular é predominante no núcleo celular e sua principal função é regular a transição entre cada fase do ciclo celular. Um complexo chamado ciclina-CDK, formado por duas subunidades: uma regulatória, denominada ciclina e outra catalítica, denominada cinase dependente de ciclina (CDK) (Morgan, 1995), necessita estar ativado para que o ciclo celular se complete, levando a célula à proliferação. Inibidores destes complexos regulam negativamente a progressão pelo ciclo celular e são denominados inibidores de CDKs ou CKIs (inibidores de cinase dependente de ciclina) (Morgan, 1995). Existem duas famílias de inibidores de CDK que são classificados de acordo com sua homologia estrutural e baseados nos complexos ciclina CDK inibidos por elas. A família INK4 (p15, p16, p18 e p19) inibe

CDKs ativos na fase G1 do ciclo celular (Hannon e Beach, 1994), enquanto os membros da família Cip/kip, compreendendo o $p21^{cip1/waf1}$ ($p21^{cip1}$), $p27^{kip1}$ e $p57^{kip2}$, inibem a proliferação celular se ligando e inativando o complexo ciclina-CDKs, nas fases G1 e S do ciclo celular (Shankland e Wolf, 2000). Os inibidores de CDK, através do aumento ou redução de sua expressão, são determinantes críticos para o aparecimento e a proliferação celular renal. Apesar de existirem 2 famílias de inibidores de CDK, a maioria dos estudos tem demonstrado a participação da família Cip/Kip ($p21$, $p27$, $p57$) nas doenças renais, inclusive na ND (Shankland et al., 1996; Wolf et al., 1998). Não se sabe, porém, os mecanismos que levam as diferenças na expressão destas proteínas durante proliferação celular renal. O inibidor de CDK $p21^{cip1}$ está normalmente expresso em pequenas quantidades nas células glomerulares quiescentes (Shankland et al., 1996). Entretanto, os seus níveis aumentam durante a proliferação de células mesangiais quiescentes normais *in vitro*. O inibidor de CDK $p27^{kip1}$ é expresso em maior quantidade que o $p21^{cip1}$ em células mesangiais quiescentes *in vitro*. O início da proliferação mesangial *in vitro* induzido por fatores de crescimento mitogênico está associado à diminuição na expressão dos níveis de proteína de $p27^{kip1}$ (Shankland et al., 1997b). O pico da proliferação de células mesangiais na glomerulonefrite proliferativa experimental coincide com níveis quase indetectáveis de $p27^{kip1}$ (Shankland et al., 1996).

No diabetes mellitus experimental, tem sido demonstrado um aumento precoce e limitado na replicação de células mesangiais (Young et al., 1995) seguido por uma redução na replicação celular, interrupção do ciclo celular na fase G1, e concomitante hipertrofia (Wolf et al., 1997; Kuan et al., 1998; Al-Douahji et al., 1999; Hanken et al., 2000). Os inibidores do ciclo celular $p21^{cip1}$ e $p27^{kip1}$ tem sido implicados nesta interrupção do ciclo celular na fase G1, que leva à hipertrofia renal e glomerular observada no DM (Monkawa et al., 2002). Dados de nosso laboratório demonstram que animais SHR e diabéticos por um período de 10 dias apresentam redução na replicação celular, hipertrofia renal e aumento na expressão de $p27^{kip1}$ (Silveira et al., 2002). O efeito da hiperglicemia nos inibidores do ciclo celular, hipertrofia celular e aumento de matriz extracelular é mediado, sobretudo pela citocina anti-proliferativa e pró-fibrótica TGF $\beta 1$ (Monkawa et al., 2002; Wolf et al., 1992). Poucos estudos têm investigado os efeitos do tratamento anti-hipertensivo sobre as alterações de replicação celular e expressão destas ciclinas, por

exemplo, o tratamento de animais *BBdp* com enalapril, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina, restaurou a expressão aumentada de $p16^{\text{ink4}}$ e $p27^{\text{kip1}}$ nestes animais (Wolf et al., 1999).

O mecanismo pelo qual o aumento da glicose estimula o aumento de matriz extracelular no diabetes pode envolver diversos mecanismos: via poliol (Derylo et al., 1998), via ativação de proteína quinase C (PKC) (Ayo et al., 1991), via produtos de glicosilação não enzimática (Brownlee et al., 1998) e via *transforming growth factor beta 1* (TGF $\beta 1$) (Shankland e Scholey, 1994). Diversos estudos apontam o TGF $\beta 1$ como o principal mediador de acúmulo de matriz extracelular no diabetes (Shankland e Scholey, 1994; Sharma e Ziyadeh, 1995). O TGF $\beta 1$ é uma citocina pleiotrópica, com ações autócrina e parácrina, que faz parte da superfamília do *transforming growth factor β* , da qual fazem parte os peptídeos TGF $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, e tem sido apontada como a principal citocina pró-fibrótica na patogênese da glomeruloesclerose diabética (Massague e Chen, 2000; Bottinger e Bitzer, 2002). Este pode estar numa forma solúvel ou ligado a peptídeos presentes na matriz extracelular. Comumente o TGF $\beta 1$ se encontra sob a forma de homodímero, ligado a um peptídeo “latency-associated”. Quando associado ao peptídeo tem pobre afinidade de ligação ao seu receptor na membrana celular. Situações como ambiente rico em glicose aumentam a expressão de trombospodina-1 e/ou plasmina, peptídeos envolvidos na “ativação” do TGF $\beta 1$ por quebrar a ligação do TGF $\beta 1$ com o peptídeo “latency-associated” (Bottinger e Bitzer, 2002; Yevdokimova et al., 2001). Após “ativação”, o TGF $\beta 1$ se liga ao receptor de membrana celular tipo II do TGF β que é fosforilado e ativa o receptor tipo I. Este complexo TGF $\beta 1$ e receptores inicia uma cascata de sinalização intracelular via SMAD (proteínas de sinalização intracelular), SMADs 2, 3 são fosforiladas se ligam à SMAD 4, formam um complexo que alcança o núcleo da célula e então regulam a expressão de genes co-ativadores (MSG1, P/CAF) e co-repressores (SKI, SnoN, TGIF) modificando a transcrição gênica do próprio TGF $\beta 1$ e de outras proteínas, como a fibronectina (Bottinger e Bitzer, 2002). Este mecanismo tem sido considerado o principal mecanismo fisiopatogênico induzido pelo TGF $\beta 1$ no rim (Bottinger e Bitzer, 2002). Embora o TGF $\beta 1$ tenha emergido como mediador central no eixo de sinalização e produção de matriz extracelular, tem se tornado claro recentemente que o TGF $\beta 1$ participa como importante regulador de proliferação e diferenciação

celulares, apoptose, remodelação extracelular e resposta imune, dependendo do contexto fisiológico (Bottinger e Bitzer, 2002). Enquanto expansão de matriz mesangial e intersticial podem resultar de ativação direta da rede de sinalização do TGF β em células mesangiais e miofibroblastos, a cascata de sinalização do TGF β pode ainda iniciar efetores pró-apoptóticos em diversas células renais (Schiffer et al., 2001; Schuster et al., 2002) inclusive podócitos, resultando em depleção podocitária, a qual foi demonstrada preceder a glomeruloesclerose diabética (Coimbra et al., 2000), e transdiferenciação epitélio-mesenquimal, a qual tem sido implicada no acúmulo de miofibroblastos e atrofia tubular, fatores que contribuem para a fibrose renal (Zeisberg et al., 2003).

Expansão de matriz mesangial e espessamento de membrana basal glomerular na ND podem ser devido ao aumento no acúmulo de proteínas normalmente presentes nestas estruturas, à deposição de proteínas que normalmente não estão presentes ou ambos (Mason e Wahab, 2003). Aumento na síntese de colágeno, laminina e fibronectina têm sido demonstrados em modelos humanos e experimentais de ND (Mason e Wahab, 2003), além disso, o TGF β 1 tem sido apontado como o principal mediador do aumento destas proteínas de matriz extracelular na ND (Massague e Chen, 2000; Bottinger e Bitzer, 2002). Estudos *in vitro* fornecem evidência que ambiente rico em glicose aumenta a expressão de TGF β 1 (OH et al, 1998), posteriormente Baricos e colaboradores (1999) demonstraram que o TGF β é um potente inibidor de degradação de matriz extracelular, por reduzir a atividade de metaloproteinases de matriz extracelular (Baricos et al, 1999). Produção de TGF β 1, assim como seus receptores são encontrados em células renais expostas ao aumento de glicose mimetizando o DM (Bottinger e Bitzer, 2002; Kang et al., 2000; Yamamoto et al., 1996). Níveis de proteína e RNA mensageiro de TGF β 1 estão aumentados em ratos diabéticos, o mesmo sendo encontrado em glomérulos de pacientes com ND (Yamamoto et al., 1993). Pacientes portadores de DM tipo 2 tem níveis de excreção urinária de TGF β 1 aumentada (Sharma et al., 1997). Camundongos com DM induzido por estreptozotocina tem atenuação da hipertrofia glomerular e redução dos níveis de RNA mensageiro de TGF β 1 quando estes ratos são submetidos a tratamento com anticorpo anti-TGF β 1 (Sharma et al., 1996). Além disso, camundongos *db/db* tratados com anticorpo anti-TGF β apresentam redução na expressão glomerular de fibronectina (Ziyadeh et al., 2000). Ratos heterozigotos para o receptor tipo II do TGF β (TGF β IIR), apresentando expressão reduzida para o TGF β IIR,

e diabéticos por estreptozotocina apresentam atenuação na expressão de proteínas de matriz extracelular (Kim et al., 2004). Portanto, o TGF β 1 surge como o principal candidato como mediador do aumento renal de fibronectina.

A fibronectina é uma proteína envolvida em muitos processos celulares incluindo reparo tecidual, coagulação sanguínea, migração e adesão celulares. A fibronectina existe sob duas formas principais: dímero glicoproteico insolúvel, que serve como ligação na matriz extracelular, a qual é proveniente de fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, e como ponte dissulfeto presente no plasma (Baron et al., 1990; Potts e Campbell, 1994; Potts e Campbell, 1996). No glomérulo renal, a fibronectina, o maior componente glicoproteico da matriz extracelular, é mais abundante na matriz mesangial, especialmente na interface entre células mesangiais e endoteliais, porém, também está presente na membrana basal glomerular, sobretudo nas lâminas rara interna e externa (Courtoy et al., 1990). Evidências em humanos e modelos experimentais sugerem que o acúmulo renal de fibronectina pode ser marcador de ND (Dixon et al., 1980; Ziyadeh et al., 2000). Diversos estudos demonstram que a hiperglicemia aumenta a expressão renal de fibronectina tanto in vivo (Ziyadeh et al., 2000; Righetti et al., 2001) como in vitro (Oh et al., 1998; Ayo et al., 1990). Em camundongos com predisposição genética ao DM, a hiperglicemia é seguida de aumento na expressão renal de fibronectina (Ayo et al., 1990). Células mesangiais cultivadas em meio rico em glicose aumentam a produção de fibronectina mediada pelo TGF β 1 (Oh et al., 1998). Por outro lado, experimentos in vitro que mimetizam o aumento da pressão intra-glomerular in vivo, demonstram que células mesangiais humanas em cultura expostas ao estresse mecânico (estiramento) aumentam a produção de fibronectina (Gruden et al., 2000). Este pode inclusive ser um dos mecanismos envolvidos na esclerose glomerular secundária ao distúrbio hemodinâmico. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com predisposição ao acidente vascular cerebral (SHR “stroke prone”), foi demonstrado aumento de fibronectina renal, em relação aos seus controles os animais Wistar Kyoto (WKY), e o tratamento anti-hipertensivo por 12 semanas preveniu o aumento renal de fibronectina. Entretanto, neste estudo, esta alteração foi demonstrada nos animais com 25 semanas de idade (Hamagushi et al., 2000). Dados recentes de nosso laboratório sugerem que o aumento na expressão renal de fibronectina pode representar um fenômeno precoce no desenvolvimento da nefropatia diabética

associada à hipertensão arterial (Righetti et al., 2001). Neste estudo ratos SHR tornados diabéticos, com 4 semanas de vida, e estudados após um período de 20 dias de DM, apresentaram acúmulo de fibronectina renal. Estes dados sugerem que em fase precoce, ambos a hiperglicemia e a hipertensão arterial, são necessários para o acúmulo precoce de fibronectina nos glomérulos, uma vez que esta alteração não estava presente nos animais WKY, com ou sem DM e nos SHR controle (Righetti et al., 2001).

Vários fatores têm sido implicados na progressão da ND, tanto em pacientes com DM tipo 1 como no DM tipo 2. O aumento da pressão arterial é um fenômeno freqüente na ND (Hovind et al., 2001). Hipertensão arterial tem sido apontada como o principal fator secundário associado à progressão de doença renal no DM (Rossing et al., 1993; Parving et al., 1993). Uma relação estreita entre aumento de pressão arterial e redução no ritmo de filtração glomerular têm sido documentada em pacientes portadores de DM tipo 1 e 2 (Rossing et al., 1993; Breyer et al., 1996; Yokoima et al., 1997). Estudos clínicos demonstram que o controle da pressão arterial retarda a progressão da ND manifesta (Parving et al., 1993). De forma semelhante ao que ocorre em humanos, no diabetes experimental a presença de hipertensão arterial é um fator acelerador das lesões renais induzidas pela hiperglicemia (Cooper et al., 1988). Cooper e colaboradores (1988) demonstraram que a nefropatia é mais grave nos ratos SHR diabéticos quando comparados aos WKY (Cooper et al., 1988). Também em modelos animais tem sido observado que o controle da pressão arterial atenua a lesão renal diabética (Cooper et al., 1990; Cooper et al., 1992).

Estudos recentes em diferentes modelos animais demonstram interação entre a angiotensina II e o TGF β 1 (Wu et al., 1997). Por exemplo, células mesangiais expostas a angiotensina II apresentam um aumento na atividade do promotor do TGF β 1, estes efeitos, inclusive, são semelhantes àqueles produzidos pelo meio rico em glicose (Weigert et al., 2002). Ratos submetidos à nefrectomia subtotal o emprego de um inibidor da enzima de conversão da angiotensina I em angiotensina II (IECA), ramipril ou um antagonista de receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1), valsartan foram capazes de reduzir a expressão de RNAm para TGF β 1 e atenuar as alterações funcionais e anatômicas renais (Wu et al., 1997). Resultados semelhantes foram obtidos em ratos com DM induzido por

estreptozotocina (Rumble et al., 1998). Portanto, existe uma inter-relação entre o sistema renina-angiotensina e o TGF β 1 na patogênese da doença renal progressiva, incluindo a nefropatia diabética.

Diversos estudos têm sugerido que drogas que bloqueiam o sistema renina-angiotensina (SRA), como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e os bloqueadores do receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1), podem trazer efeito renoprotetor adicional àqueles oferecidos por outros agentes anti-hipertensivos no tratamento da hipertensão na ND (Lewis et al., 1993, 2001; Brenner et al., 2001). Entretanto, na maioria dos estudos a redução da pressão arterial observada nos grupos que receberam drogas que interferem com o SRA foi maior que a obtida nos grupos placebos, que receberam outras classes de drogas anti-hipertensivas (Lewis et al., 1993; Lewis et al., 2001). No UKPDS 38 (1998), um estudo comparando pacientes diabéticos tipo 2 tratados controle intensivo da pressão arterial versus o controle menos intenso da pressão arterial, o controle rigoroso da pressão arterial previniu em 37% o risco de doença microvascular (Tight blood pressure..., 1998). No grupo com controle intensivo os pacientes foram divididos para receber tratamento com captopril ou atenolol, uma comparação entre estes grupos não demonstrou benefício específico de uma classe de droga sobre outra (Efficacy of atenolol and captopril..., 1998). Recentemente uma meta-análise publicada por Casas e colaboradores (2005) demonstrou que o efeito renoprotetor do IECA está estreitamente relacionado à queda da pressão arterial, e conclui que “um efeito renoprotetor adicional à redução da pressão arterial permanece por ser esclarecido” (Casas et al., 2005). Estudos em ratos SHR com DM induzido por estreptozotocina não se observaram diferenças significativas entre um IECA, e outras drogas anti-hipertensivas na atenuação das lesões renais induzidas pelo DM, sendo os efeitos atribuídos apenas à redução da pressão arterial (Cooper et al., 1992). Portanto, na ND, um efeito protetor adicional de drogas que bloqueiam o SRA, independente da redução da pressão arterial permanece sob investigação.

A patogênese da albuminúria na ND não é totalmente esclarecida, porém o glomérulo parece ter um papel central. A propriedade de exclusão de macromoléculas foi inicialmente atribuída à membrana basal glomerular, entretanto, mais recentemente, tem sido demonstrado que o diafragma de fenda, estrutura formada entre os podócitos, tem um

papel central na regulação da permeselatividade glomerular. Experimentos de mais de 25 anos atrás em ratos diabéticos já descreviam alargamento do processo podocitário (Steffes et al., 1980), um achado posteriormente confirmado em pacientes portadores de DM tipo 1 e nefropatia diabética (Ellis et al., 1987). Estudos posteriores associaram um aumento na extensão do processo podocitário, em pacientes portadores de DM tipo 1, e microalbuminúria. Neste estudo a excreção urinária de albumina se correlacionava diretamente com a largura do podócito (Berg et al., 1998). Além disso, o número e a densidade de podócitos têm sido reportados estarem reduzidos em pacientes portadores de DM tipo 1 e tipo 2 (Steffes et al., 2001; Pastalunan et al., 1997; White et al., 2002; Dalla Vestra et al., 2003). Estudos procurando investigar alterações precoces na nefropatia diabética, têm demonstrado anormalidades nestes podócitos, mais precisamente na expressão de proteínas específicas do podócito. Os podócitos se ligam a outros podócitos através de interdigitações, e são separados por estreitos espaços (30-40nm), formando poros chamados diafragma de fenda. Estudos recentes têm sugerido que a nefrina, uma proteína transmembrana encontrada nos podócitos, possui uma larga porção extracelular, e um arranjo em forma de “zíper” através da associação de suas próprias moléculas, e é responsável pela formação da estrutura do diafragma de fenda. Esta estrutura anatômica está envolvida na manutenção da permeselatividade glomerular e, portanto, relacionada à albuminúria presente na ND (Kawachi et al., 2000; Wolf et al., 2005). A descrição inicial da redução na expressão glomerular de nefrina na ND provém de estudos em biópsia renal de pacientes diabéticos (Koop et al., 2003; Benigni et al., 2004). Diversos estudos têm demonstrado redução na expressão glomerular de nefrina em modelos animais de hipertensão, diabetes além da associação de hipertensão e diabetes (Forbes et al., 2002; Bonnet et al 2002; Blanco et al., 2005). Bonnet e colaboradores (2002) demonstraram redução da expressão glomerular de nefrina nos animais SHR quando comparados com seus controles WKY, neste estudo esta diferença já se encontrava presente a partir de 3 semanas de vida. Nos estudos com animais SHR tornados diabéticos a demonstração de redução da nefrina estava presente apenas após um longo período de diabetes, a partir de 16 semanas de DM (Bonnet et al., 2002). Dados de nosso laboratório demonstram que animais SHR diabéticos apresentam aumento na excreção urinária de albumina precocemente, mais precisamente animais com cerca de 7 semanas de vida, após um período de DM de 20 dias

(Righetti et al., 2001). Uma pergunta que surge a partir desses dados é quais os fatores envolvidos no aumento da EUA nestes animais SHR diabéticos, mais precisamente qual a participação da nefrina. Além disso, não há estudos sobre a expressão de nefrina em curto período de diabetes, tal como 20 dias, bem como o efeito da prevenção da hipertensão arterial sobre a expressão da nefrina.

Portanto, neste modelo animal, que combina hipertensão arterial genética e diabetes mellitus, o mediador no acúmulo renal de fibronectina, o papel das proteínas inibidoras do ciclo celular, a expressão renal de nefrina, bem como o efeito do tratamento anti-hipertensivo sobre estas anormalidades permanecem por serem esclarecidas.



2- OBJETIVOS

- 2.1- Investigar a contribuição da hipertensão arterial para a expressão glomerular de nefrina de ratos diabéticos geneticamente hipertensos.
- 2.2- Avaliar os efeitos da indução do diabetes mellitus na morfologia glomerular, replicação celular e proteínas reguladoras do ciclo celular em ratos jovens geneticamente hipertensos.
- 2.3- Testar os efeitos da prevenção do desenvolvimento da hipertensão arterial com drogas que interferem ou não com o sistema renina-angiotensina nos eventos acima mencionados.



3- MATERIAL E MÉTODOS

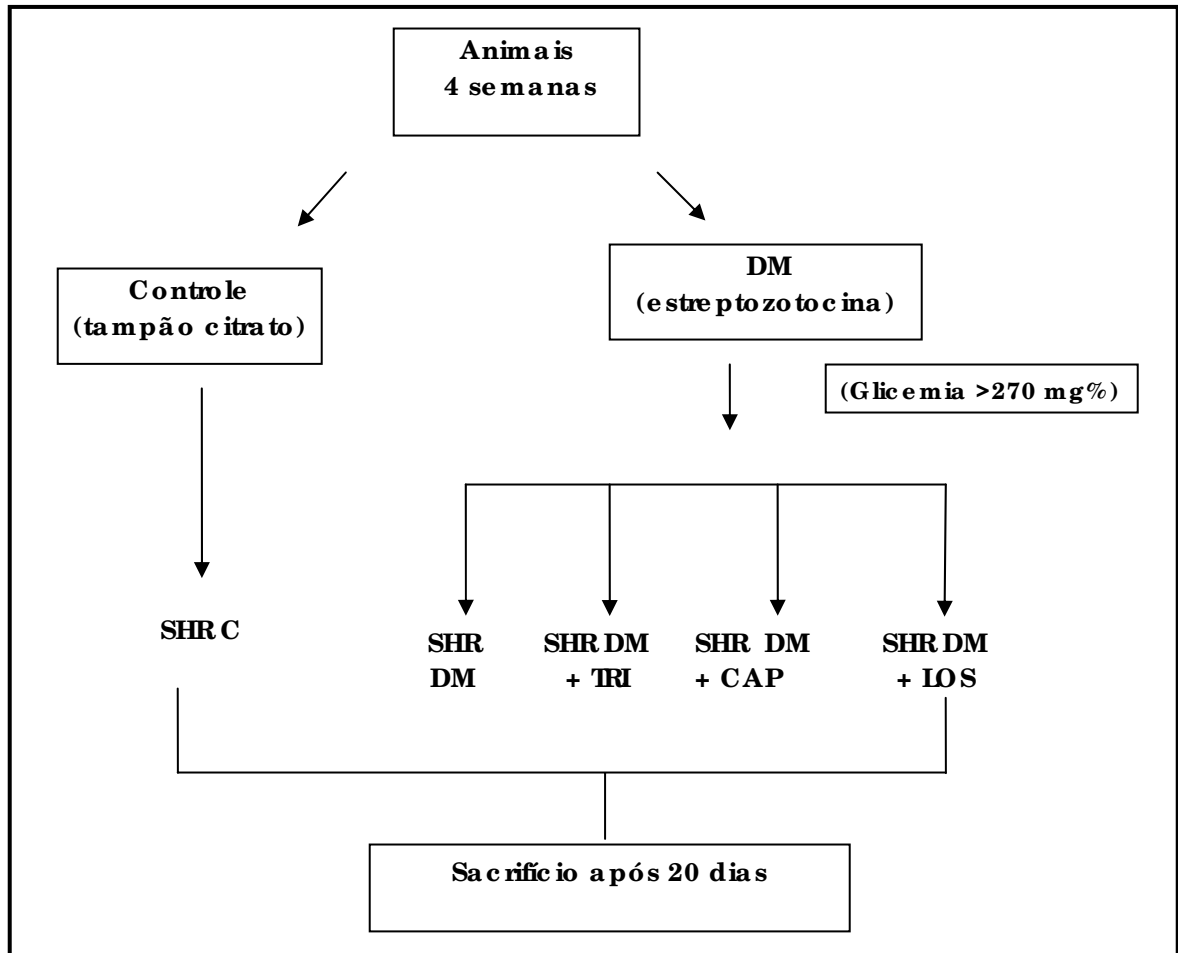
3.1- Animais

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), acrescidos no protocolo 2 de seus controles geneticamente normotensos, ratos Wistar Kyoto (WKY), machos, com 4 semanas de idade, derivados de animais fornecidos pela Taconic (Germantow NY, USA) e criados no biotério central da UNICAMP de acordo com as normas para o cuidado e uso de animais da Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo nº 365-1). Os ratos SHR se caracterizam por um período de normotensão durante as 4 primeiras semanas de vida, seguido do desenvolvimento de hipertensão em 100% dos animais até 12 semanas de idade (Okamoto et al., 1966).

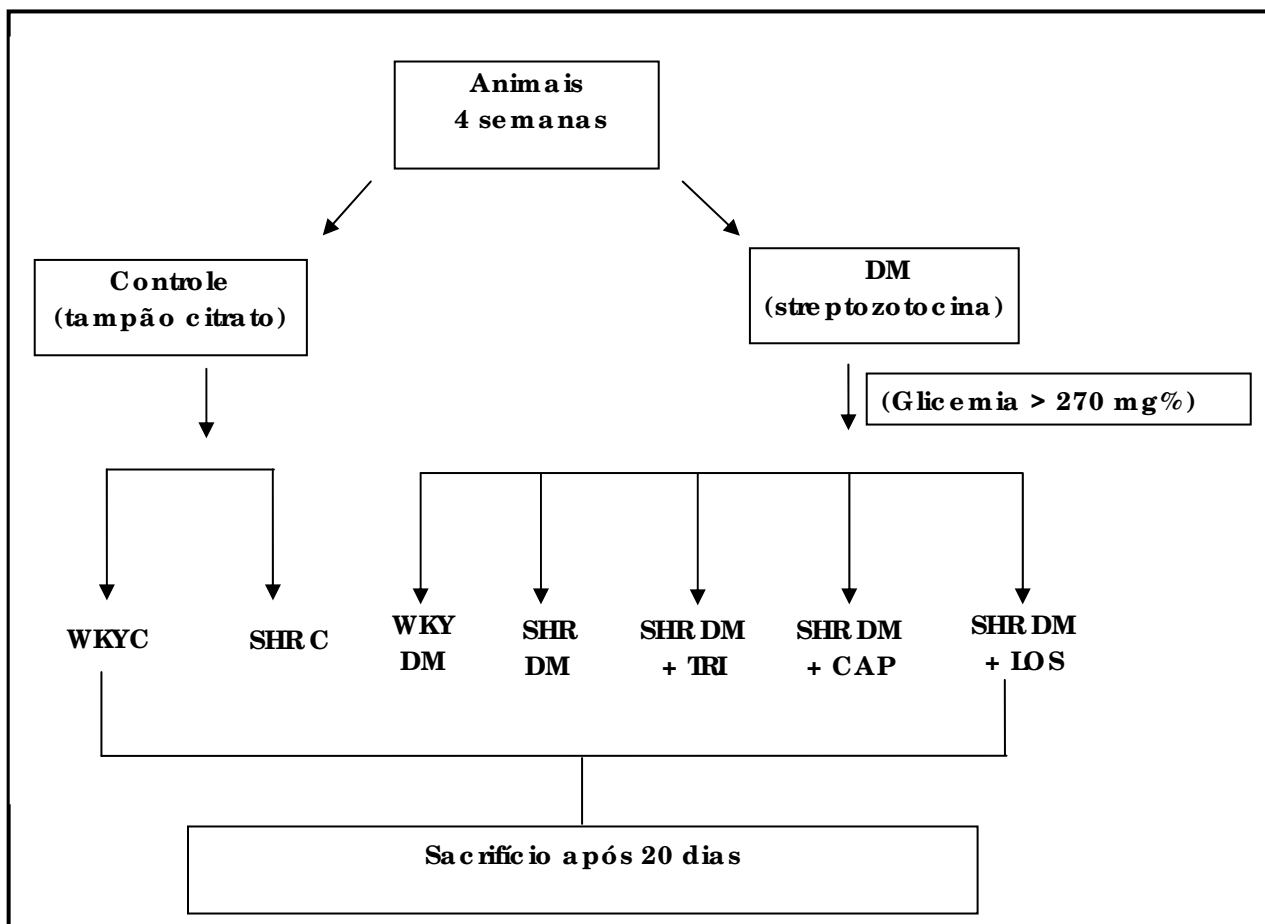
3.2- Indução do *Diabetes Mellitus*

A indução do diabetes mellitus foi realizada nos ratos após um período de jejum noturno (8-12 horas), através da injeção de streptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, USA) na dose de 60 mg/kg de peso corporal dissolvida em 0,5 ml de solução de tampão citrato pH 4,5, na veia caudal de animais anestesiados. Após a administração da estreptozotocina (STZ) os animais permaneciam em jejum por mais 2 horas. Os animais do grupo controle receberam injeção endovenosa apenas de tampão citrato.

3.3- Protocolo 1



3.4- Protocolo 2



3.5- Confirmação do diabetes mellitus e randomização para tratamento anti-hipertensivo

Quarenta e oito horas após a injeção da STZ, foi confirmada a presença do DM através da determinação da glicemia estando os animais em jejum por 4 horas. Foram considerados diabéticos os ratos com glicemia superior a 270 mg/dl. Nos grupos SHR submetidos a tratamento, 48 horas após indução do diabetes os ratos foram randomizados para receberem: esquema tríplice [hidralazina (Sigma) 150 mg/l, hidroclorotiazida (Sigma) 50 mg/l e reserpina (Sigma) 4 mg/l, SHR+TRI] ou inibidor da enzima conversora de

angiotensina [captopril (Bristol-Meyers Squibb Brasil S/A, São Paulo, Brasil) 300 mg/l, SHR+CAP] ou antagonista do receptor tipo 1 da angiotensina II [losartan (Merk Sharp & Dome Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) 200 mg/l, SHR+LOS], através da diluição destas drogas em água de torneira, onde os animais têm livre acesso através de bebedouros. As doses de anti-hipertensivos determinadas a partir do volume diário de água ingerido foi de: captopril 100 mg/kg, losartan 67 mg/kg, hidralazina 50 mg/kg, reserpina 1.3 mg/kg e hidroclorotiazida 17 mg/kg. Dados de nosso laboratório demonstram que estas drogas, e nessas doses, são capazes de normalizar a pressão arterial de ratos SHR (Pavan et al., 2003; Lehfeld et al., 2004). A glicemia foi também determinada na semana de sacrifício, para confirmação de que os animais permaneciam diabéticos. No protocolo 2, animais WKY controle e diabéticos foram incluídos conforme descrição anterior.

3.6- Glicemia

A glicemia foi realizada estando os animais em jejum por 4 horas, na semana de sacrifício, para confirmação que os mesmos permaneceram diabéticos, bem como avaliar o efeito da administração das diversas drogas anti-hipertensivas sobre a glicemia. Os ratos foram anestesiados, e o sangue obtido a partir da cauda dos ratos foi colocado em tubo heparinizado, posteriormente centrifugado, e o plasma utilizado na determinação da glicemia através método enzimático-colorimétrico (GOD-PAP, Merk, Darmstadt, Alemanha). Resumidamente 10 µl das amostras, do padrão (100 mg%) e dos controles com alta (380 mg%) e baixa (60 mg%) concentração de glicose, previamente determinados, foram adicionados a 1,25 ml do reagente de cor, em seguida homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C durante 15 minutos, efetuando-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm, de acordo com as instruções do fornecedor. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

3.7- Pressão Arterial e determinação do peso corpóreo

A pressão arterial sistólica foi obtida na cauda dos ratos, utilizando-se pletismógrafo (Narco Bio System, Huoston, TX, USA). Os animais foram aquecidos a 39°C, por um período de cerca de 10 minutos, antes da medida da pressão arterial. Durante a medida da pressão arterial os ratos estão dispostos num contentor sobre uma placa aquecida que mantém a temperatura corporal em 37°C. Foram realizadas pelo menos 5 medidas de pressão arterial consideradas satisfatórias e o resultado expresso como média aritmética destes valores. O peso e a pressão arterial foram determinados nos ratos com 4 semanas, portanto pré-indução do diabetes, e pré-sacrifício.

3.8- Coleta de urina e determinação de albuminúria

Na semana do sacrifício os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, com acesso à ração levemente hidratada e água de torneira por um período de 24 horas. A urina foi coletada em provetas, e após o término da coleta o volume urinário foi determinado. Cerca de 10 ml da amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e aliquotada a -20°C para posterior determinação da albuminúria.

A albuminúria foi determinada através do método de imunodifusão radial simples (Mancini e Carbonaro, 1965), como anteriormente descrito por nosso laboratório (Righetti et al., 2001; Pavan et al., 2003). Alíquotas de 10 µl de urina foram adicionadas a pequenos poços em um gel de agarose 1% e polietilenoglicol 3% contendo anticorpo policlonal anti-albumina de rato (Cappel, ICN, Aurora, Ohio) numa concentração conhecida (1:400). A leitura dos halos foi realizada 72 horas após a colocação da urina nas placas. A partir de uma curva padrão realizada no mesmo gel, com albumina de rato em concentração conhecida, a concentração de albumina foi determinada em µg por ml. O valor obtido foi multiplicado pelo volume urinário nas 24 horas, obtendo-se o valor da excreção urinária de albumina (EUA) em µg por 24 horas.

3.9- Isolamento de glomérulos

Para isolar os glomérulos os ratos foram anestesiados, procedeu-se a laparotomia, os rins foram extraídos e decapsulados, e o rim esquerdo foi pesado. Os rins foram cortados sagitalmente e a camada cortical separada da medular. O córtex foi seccionado em pedaços de aproximadamente 2 mm e mergulhado em solução preservadora de Hanks (Gibco, Grand Island, NY). O tecido renal coletado de 3-4 ratos foi submetido à passagem por peneiras de aço inox (W. Tyler, Mentor, OH) com poros de tamanho decrescente 250, 125 e 63µm respectivamente, e nesta última peneira ficam retidos os glomérulos, conforme anteriormente descrito (Krakower e Greenspoon, 1954; Silveira et al., 2002). A preparação final continha mais de 95% de glomérulos confirmado após exame em microscopia de fase. O material imerso em solução de Hanks (Gibco), foi centrifugado por duas vezes em 1500 rpm, à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o material sedimentado foi submetido à lise por ultra-som, por cerca de 10 segundos, na presença de uma solução tampão (SDS 2% e Tris-HCl 60 mmol pH 6,8) acrescida de inibidores de proteases (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA) contendo: antipaína, quemostatina, leupeptina, bestatina, pepstatina, fosforamidona, aprotinina, EDTA) (Wolf et al., 1999). O material foi novamente centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos a 15°C e o sobrenadante separado. Uma alíquota de 10 µl foi retirada para quantificação de proteína. Ao sobrenadante foi adicionado tampão Laemmli (glicerol 5%, azul de bromofenol 0,03% e 10 mmol de dithiothreitol) no mesmo volume (Laemmli, 1970). O material foi aquecido por 5 minutos em água fervendo, resfriado, aliquotado e armazenado a -80°C. A quantificação de proteína foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976), usando BSA como padrão.

3.10- Imunofluorescência

Para extração do tecido renal no estudo da fibronectina é necessário que o rim dos ratos seja perfundido para retirada da fibronectina presente no plasma (Righetti et al., 2001). Para o procedimento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico a 3%, na dose de 50 mg/kg intraperitonealmente, e posteriormente submetidos à laparotomia e

dissecção dos grandes vasos da cavidade abdominal. Realiza-se então a introdução de uma cânula na aorta abdominal abaixo da artéria renal, e uma ligadura da aorta acima da artéria renal esquerda e abaixo da renal direita, procedendo-se então à perfusão renal esquerda de forma retrógrada. A perfusão renal foi inicialmente realizada com solução fisiológica a 0,9% seguida da solução fixadora “methacarn” (metanol 70%, clorofórmio 30% e ácido acético glacial 10%). O sistema de perfusão foi acoplado a um manômetro de mercúrio, que permite a monitoração da pressão de perfusão durante a infusão das soluções, e é ajustado de acordo com a pressão arterial previamente aferida do animal. Ao término da perfusão o rim é seccionado sagitalmente e permanece imerso em “methacarn” por 24 horas, sendo posteriormente transferido para álcool a 70% e em seguida incluído em parafina. As lâminas silanizadas foram desparafinizadas com xilol, passando por concentrações decrescentes de álcool, foram lavadas em tampão fosfato (PBS) e imersas em leite a 5% para bloqueio de ligações inespecíficas por 1 hora, em seguida foram incubadas “overnight” com o anticorpo primário anti-fibronectina de rato 1/50 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA). Em seguida procedeu-se à lavagem em tampão fosfato e incubação com o anticorpo secundário 1/50 (Sigma) conjugado com *FITC* (isotiocianato de fluoresceína). Os cortes foram lavados em PBS pH 7,4 (de 4 a 6 vezes) com ajuda de pipeta Pasteur e as lâminas montadas com Permafluor (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA).

Para avaliação da expressão de nefrina, o rim direito foi retirado, e após remoção cuidadosa da gordura peri-renal e da cápsula, foi seccionado longitudinalmente e congelado com *TFM* (meio congelador de tecido) (Triangle Biomedical Sciences, Durham, N.C.) em gelo seco para formação de blocos. Estes foram cortados em criostato em espessura de 6µm. Os cortes foram fixados em acetona a 4°C por 3 minutos, deixando-os secar em temperatura ambiente (TA) por 30 minutos. Posteriormente, foram lavados com tampão PBS pH 7,4. Bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com 2% BSA em PBS por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-nefrina (mAb) 5-1-6 (doação do Prof. Hiroshi Kawachi, Institute of Nephrology, Nigata University School of Medicine) em diluição de 1:1000, na mesma solução de bloqueio, por 30 minutos em câmara úmida e escura, em TA. Os cortes foram novamente lavados em PBS pH 7,4 e posteriormente, incubados com anticorpo secundário anti-mouse

IgG conjugado com *FITC* (Amersham Biosciences, RU) em diluição de 1:50 por 2 horas em TA. Os cortes foram lavados em PBS pH 7,4 (de 4 a 6 vezes) com ajuda de pipeta Pasteur e as lâminas montadas com Permafluor (Thermo Shandon). Para o estudo da nefrina foram também utilizados animais WKY controle e diabéticos com metodologia semelhante aos animais SHR.

A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência (LEICA, DMLS), imediatamente após realização dos experimentos. A análise do material foi realizada de forma semi-quantitativa em 50 e 30 glomérulos de cada animal, para fibronectina e nefrina respectivamente, onde cada glomérulo recebia uma pontuação a partir de um “score” referente a intensidade de fluorescência (0= ausente, 1= fraco, 2= moderado, 3= forte e 4= muito forte) (Bao et al., 2003). Todos os experimentos foram quantificados por um examinador que não conhecia os grupos que estavam sendo avaliados.

3.11- Western blot

Para a realização do western blot foi utilizado um “pool” de proteínas extraído a partir de glomérulos isolados dos rins de 3-4 animais. A partir de estudos pilotos foi determinada a quantidade necessária de proteína e a concentração dos anticorpos a serem utilizados no estudo de cada proteína. As proteínas numa quantidade de 20-100µg (conforme estudo piloto) foram aplicadas a um gel de SDS-poliacrilamida, de concentração entre 8-15%, que contém duas fases, uma superior chamada de empilhamento, contendo água destilada, tampão de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trizma base 50 mM, pH 6,7), acrilamida 40%, TEMED (Gibco) e amônio per sulfato (PSA) 10%, e uma fase inferior, chamada fase de resolução constituída por água destilada, glicerol, tampão de resolução (EDTA 4mM, SDS 2%, Trizma base 750 mM, pH 8,9), acrilamida 40%, TEMED (Gibco) e PSA 10%. Após a aplicação sobre o gel as proteínas foram submetidas à eletroforese, com voltagem progressiva de 20-40 volts no gel de empilhamento e 40-120 volts no gel de resolução, utilizando-se o aparelho Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA). Marcadores de peso molecular (Amersham Biosciences) foram usados como “standard”. Ao final da eletroforese as

proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), por 2 horas, com corrente constante de 200 mA, em tampão de transferência (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 380 mM glicina, 0,1% SDS e 20% metanol). Esta membrana foi então submetida à incubação, com leite desnatado a 5% em TBST (10 mM Tris HCl; 15 mM NaCl e Tween-20) no protocolo da fibronectina e nefrina, albumina bovina sérica (BSA) 1% em TBST para P21^{Cip1}, P27^{Kip1} e gelatina 1% para TGF β IIR, por 12 horas a 4°C para bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-fibronectina de rato (Calbiochem, La Jolla, CA) na diluição de 1:3000; anticorpo anti-nefrina de rato (doação do Prof. Hiroshi Kawachi, Institute of Nephrology, Nigata University School of Medicine), anticorpo anti-p27^{Kip1} (Transduction Laboratories, Lexington, KY) na diluição de 1:1.000; anticorpo anti-p21^{Cip1} (Dako) na diluição 1:3000 e anticorpo anti-TGF β IIR (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) na diluição 1:4000 na mesma solução de bloqueio por uma hora em TA. Em seguida a membrana foi lavada e posteriormente incubada com anticorpo secundário conjugado à HRP, de acordo com a espécie do anticorpo primário, por uma hora em TA.

As bandas imunorreativas foram visualizadas por quimiluminescência (SuperSignal TM CL-HRP Substrate System, Pierce, Rockford, IL). A intensidades das bandas quantificadas por densitometria computadorizada (BIO-RAD Model GS 700 Imaging Densitometer). Coloração com Ponceau S foi realizada nas membranas para confirmação da uniformidade de concentração de proteínas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata.

3.12- Imunohistoquímica

A detecção de células em replicação foi realizada utilizando-se imunohistoquímica para antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA). As lâminas previamente silanizadas, foram desparafinizadas em xilol aquecido a 110°C, seguido de três lavagens em xilol TA e álcool em concentrações decrescentes, a seguir realizou-se o bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 3%. O anticorpo primário anti-PCNA foi aplicado “overnight” na concentração de 1:150 (Santa Cruz, CA, USA),

após lavagem com PBS o tecido foi incubado com anticorpo secundário biotinizado na concentração 1:200, após nova lavagem com solução tampão, aplicou-se o complexo avidina-biotina (ABC) (Vector) e em seguida adicionou-se o tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB Sigma). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina. A contagem de células positivas foi realizada em 50 glomérulos e em 20 campos de grande aumento na região túbulo-intersticial em cada rato. A média de cada rato foi expressa em número de células positivas por glomérulo e campo, respectivamente. Todos os experimentos foram quantificados por um examinador que não conhecia os grupos que estavam sendo avaliados.

3.13- Morfometria

As lâminas foram coradas pelo PAS e observadas usando um microscópio Leica DMLS (Leica, Bensheim, Germany). Os glomérulos foram analisados sob o aumento de 1000 X. Um total de 20 glomérulos corticais, com incidência sobre o pólo vascular, foi fotografado de forma aleatória em cada rato. Imagens dos glomérulos foram digitalizadas com câmera Canon Power Shot S60 (Canon Inc., Japan) conectados ao microscópio. Análise das imagens foi realizada com parâmetros fixos e a morfometria determinada através de delineamento manual do perímetro do tufo capilar glomerular usando o programa de domínio público ImageJ (National Institutes of Health available at <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Os valores foram expressos como média aritmética dos 20 glomérulos de cada rato.

3.14- Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, exceto para EUA a qual foi expressa como média geométrica e variância. A EUA foi analisada após transformação logarítmica. Os dados foram analisados por ANOVA através do programa Stat View (Power PC version 5.0, Statview, Berkeley, CA). Comparações entre grupos foram realizadas através do teste de Fisher, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05.



4- RESULTADOS

4.1- Peso Corpóreo

Após a indução do DM houve um menor ganho de peso nos animais diabéticos em relação aos animais controle. O tratamento anti-hipertensivo não modificou o incremento de peso nos diferentes grupos de animais SHR diabéticos (tabelas 1 e 2).

4.2- Pressão arterial

A presença do DM não alterou de forma significativa a pressão arterial. O tratamento anti-hipertensivo reduziu significativamente a pressão arterial, e não houve diferença entre os diversos grupos tratados (tabelas 1 e 2).

4.3- Glicemia

A glicemia foi significativamente mais elevada nos grupo de animais diabéticos e não foi modificada pelo tratamento anti-hipertensivo (tabelas 3 e 4).

Tabela 1- Parâmetros fisiológicos nos ratos estudados (Protocolo 1)

Grupo	Peso inicial (g)	Peso sacrifício (g)	PAS-1 (mmHg)	PAS-2 (mmHg)
SC n=24	75±9	168±18	118±10	155±12
SD n=30	76±11	108±28 [†]	119±14	147±14 ^{†‡}
TRI n=19	78±12	97±16	119±7	113±9
CAP n=25	76±7	104±24	119±9	115±16
LOS n=20	74±12	106±23	116±15	108±12

SC = SHR controle, SD= SHR diabético, TRI = SHR diabético tratado com esquema tríplice, CAP = SHR diabético tratado com captopril, LOS = SHR diabético tratado com losartan.

PAS-1 pressão arterial sistólica inicial

PAS-2 pressão arterial sistólica sacrifício

P<0.05 [†]SD vs. SC; [‡]vs. Grupos tratados

Tabela 2- Parâmetros fisiológicos nos ratos estudados (Protocolo 2)

Grupo	Peso inicial (g)	Peso sacrifício (g)	PAS-1 (mmHg)	PAS-2 (mmHg)
WC n=13	111±14	231±18	106±11	125±12
WD n=13	118±21	161±23*	109±9	126±14
SC n=13	49±1	123±6	117±11	152±13
SD n=18	50±3 ^Δ	107±17 ^{Δ†}	118±15 ^Δ	147±14 ^{‡Δ}
TRI n=13	47±3	103±14	115±16	108±10
CAP n=15	50±7	95±16	120±7	113±19
LOS n=14	52±5	103±14	116±8	112±10

WC= WKY controle, WD= WKY diabético, SC = SHR controle, SD= SHR diabético, TRI = SHR diabético tratado com esquema triplice, CAP = SHR diabético tratado com captopril, LOS = SHR diabético tratado com losartan.

PAS-1 pressão arterial sistólica inicial

PAS-2 pressão arterial sistólica sacrifício

P<0.05 [†]SD vs. SC; [‡]SD vs. Grupos tratados; *WC vs. WD; ^ΔSD vs. WC e WD

Tabela 3- Glicemia, diurese e albuminúria dos animais estudados (Protocolo 1)

Grupo	Glicemia (mg%)	Diurese (ml/24h)	Albuminúria (µg/24h)
SC			186
n=24	116±28	28±8,6	(57-717)
SD			400 ^{†‡}
n=30	513±57 [†]	35±8,0 [†]	(111-501)
TRI			171
n=19	523±87	36±5,8	(62-381)
CAP			210
n=25	506 ±101	38±4,3	(68-449)
LOS			190
n=20	521±118	39±5,0	(70-543)

SC = SHR controle, SD= SHR diabético, TRI = SHR diabético tratado com esquema tríplex, CAP = SHR diabético tratado com captopril, LOS = SHR diabético tratado com losartan.

P<0.05 [†]SD vs. SC; [‡]vs. Grupos tratados

Tabela 4- Glicemia, diurese e albuminúria dos animais estudados (Protocolo 2)

Grupo	Glicemia (mg%)	Diurese (ml/24h)	Albuminúria (µg/24h)
WC n=13	141±34	34±7,0	84 (62-141)
WD n=13	521±44*	53±10,0*	263* (78-1033)
SC n=13	119±32	28±8,6	158 (66-370)
SD n=18	403±72 [†]	35±8,0 ^{†Δ}	416 ^{†‡Δ} (341-479)
TRI n=13	428±50	36±5,8	205 (90-381)
CAP n=15	410±54	37±4,3	228 (85-330)
LOS n=14	423±93	39±5,0	182 (69-449)

WC = WKY controle, WD= WKY diabético, SC = SHR controle, SD= SHR diabético, TRI = SHR diabético tratado com esquema tríplice, CAP = SHR diabético tratado com captopril, LOS = SHR diabético tratado com losartan.

P<0.05 [†]SD vs. SC; [‡]SD vs. Grupos tratados; *WC vs. WD; ^ΔSD vs. WD

4.4- Volume urinário e excreção urinária de albumina

Os animais diabéticos apresentaram um aumento significativo do volume urinário (tabelas 3 e 4). A albuminúria aumentou de forma significativa no grupo de animais diabéticos em relação aos seus respectivos controles, e o tratamento anti-hipertensivo previniu o aumento na EUA, não havendo diferença entre os diversos tratamentos (tabelas 3 e 4).

4.5- Peso do rim

O peso do rim foi maior nos grupos de animais WKY em relação ao SHR, não havendo diferença entre os animais diabéticos e controle da mesma linhagem. Como existe diferença significativa no ganho de peso corpóreo entre os grupos de animais com diabetes e aqueles sem diabetes, tem sido sugerido que o peso do rim seja corrigido pelo peso do animal (Al Douahji et al., 1999; Awazu et al., 2003). Desta forma, quando o peso do rim é corrigido pelo peso do rato, os animais SHR diabéticos apresentam tamanho renal aumentado, entretanto a prevenção da hipertensão arterial não modificou o peso do rim em relação aos animais SHR diabéticos (tabelas 5 e 6).

Tabela 5- Peso do rim e razão peso do rim/peso do animal (Protocolo 1)

Grupo	Peso rim (g)	Peso rim/Peso rato x 100
SC		
n=24	0,68±0,12	0,42±0,05
SD		
n=30	0,66±0,12	0,63±0,09 [†]
TRI		
n=19	0,60±0,15	0,62±0,08
CAP		
n=25	0,72±0,12	0,69±0,09
LOS		
n=20	0,70±0,13	0,69±0,01

SC = SHR controle, SD= SHR diabético, TRI = SHR diabético tratado com esquema tríplice, CAP = SHR diabético tratado com captopril, LOS = SHR diabético tratado com losartan.

P<0.05 [†]SD vs. SC.

Tabela 6- Peso do rim e razão peso do rim/peso do animal (Protocolo 2)

Grupo	Peso rim (g)	Peso rim/Peso rato x 100
WC		
n=13	0,98±0,12	0,42±0,04
WD		
n=13	0,89±0,12	0,53±0,06*
SC		
n=13	0,71±0,12	0,43±0,04
SD		
n=18	0,65±0,12	0,62±0,06 ^{†Δ}
TRI		
n=13	0,70±0,14	0,69±0,13
CAP		
n=15	0,72±0,13	0,59±0,10
LOS		
n=14	0,63±0,15	0,63±0,09

WC = WKY controle, WD= WKY diabético, SC = SHR controle, SD= SHR diabético, TRI = SHR diabético tratado com esquema tríplici, CAP = SHR diabético tratado com captopril, LOS = SHR diabético tratado com losartan.

P<0.05 [†]SD vs. SC; [‡]SD vs. Grupos tratados;*WC vs. WD; ^ΔSD vs. WD

4.6- Nefrina

A expressão glomerular de nefrina foi avaliada por imunofluorescência e Western Blot, e encontra-se reduzida de forma significativa nos animais SHR diabéticos. A prevenção da hipertensão arterial foi capaz de impedir à redução na expressão glomerular de nefrina nos animais SHR diabéticos tratados com os diversos esquemas anti-hipertensivos (figuras 1 e 2). Desta forma o tratamento anti-hipertensivo foi capaz de bloquear a redução da nefrina que se correlaciona de forma inversa com o aumento na albuminúria.

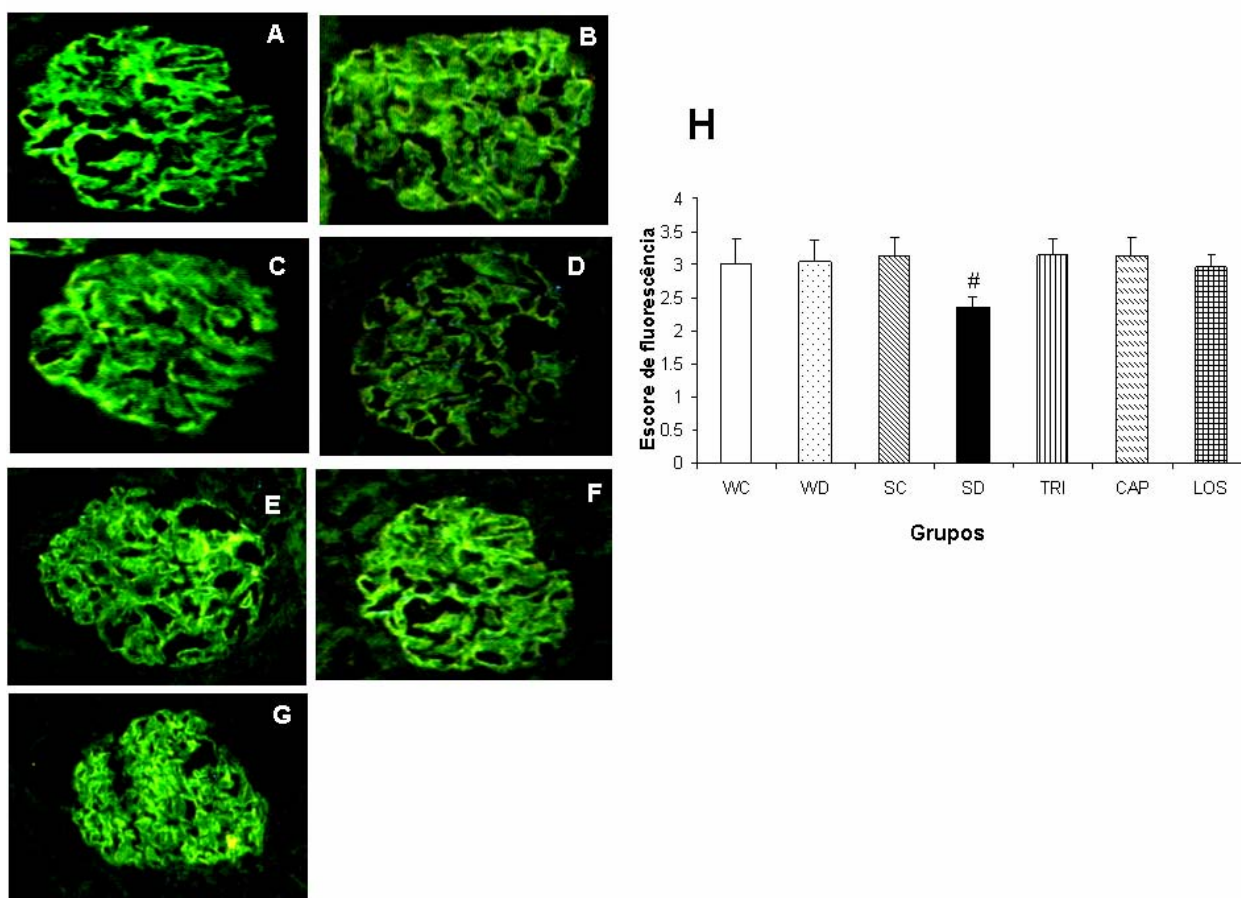


Figura 1- Imunofluorescência para nefrina. Nefrina foi detectada nos glomérulos de ratos WKY controle (WC) (n=4) (A), WKY diabéticos (WD) (n=4) (B), SHR controle (SC) (n=4) (C), SHR diabéticos (SD) (n=4) (D), SHR diabéticos tratados com terapia tríplice (TRI) (n=5) (E), captopril (CAP) (n=5) (F) ou losartan (LOS) (n=5) (G). Painel (H) mostra intensidade de fluorescência (determinado como descrito nos métodos) para nefrina em ratos controle SHR (SC), SHR diabéticos (SD), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI), captopril (CAP) ou losartan (LOS). [#]p<0.005 comparado com os demais grupos.

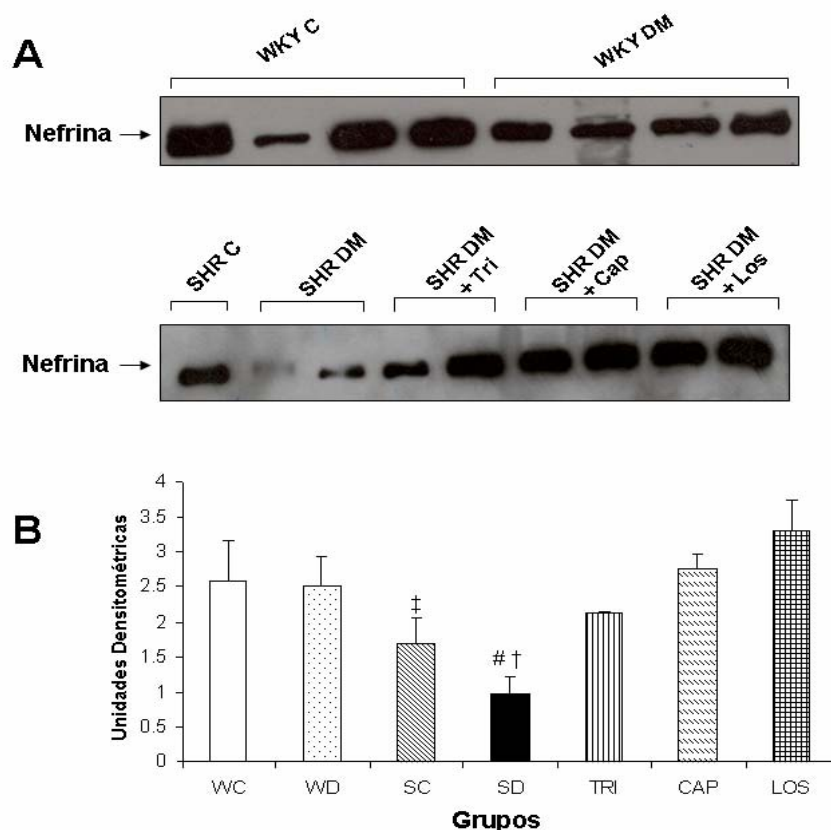


Figura 2- Expressão glomerular de nefrina nos ratos SHR. A. Western blot para nefrina em glomérulos isolados. O experimento mostra 30 µg de lisado glomerular de ratos WKY controle (WC) (n=4), WKY diabéticos (WD) (n=4), SHR controle (SC) (n=4), SHR diabéticos (SD) (n=4), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3), captopril (CAP) (n=4) ou losartan (LOS) (n=4). Cada banda representa um “pool” de 3-4 ratos. B. Análise densitométrica da expressão glomerular de nefrina. As colunas representam média ± desvio padrão. $p < 0.005$ [#]SD comparado com os grupos tratados, [†]SD comparado com SC, [‡]SC comparado com os grupos WKY.

4.5- Análise Morfométrica

A superfície glomerular foi significativamente maior no grupo SHR diabético. A hipertrofia glomerular observada no grupo SHR diabético foi corrigida com a prevenção da hipertensão arterial. A prevenção da hipertrofia glomerular foi independente da classe da droga anti-hipertensiva utilizada (figura 3). Com intuito de determinar quais os mecanismos envolvidos na hipertrofia glomerular nos animais SHR diabéticos, estudamos a expressão das proteínas envolvidas no acúmulo de matriz extracelular, fibronectina e TGF β 1, além das proteínas envolvidas na replicação celular e consequentemente na hipertrofia glomerular p21^{Cip1} e p27^{kip1}.

4.6- Sistema TGF β e Fibronectina

Como anteriormente demonstrado (Righetti et al., 2001) houve aumento significativo na expressão glomerular de fibronectina nos animais SHR diabéticos (figuras 4 e 5). Com o intuito de determinar o mediador do aumento de fibronectina estudamos o sistema TGF β , através do receptor TGF β IIR, o principal ligante da citocina pró-fibrótica TGF β 1 (Bottinger e Bitzer, 2002). A expressão do TGF β IIR foi significativamente maior no grupo de animais SHR diabético, e foi corrigida com o tratamento anti-hipertensivo em todos os grupos. Não houve benefício específico de drogas que interferem no SRA sobre o esquema tríplice (figura 6). De forma semelhante o tratamento anti-hipertensivo reduziu de forma significativa o acúmulo precoce de fibronectina (figuras 4 e 5).

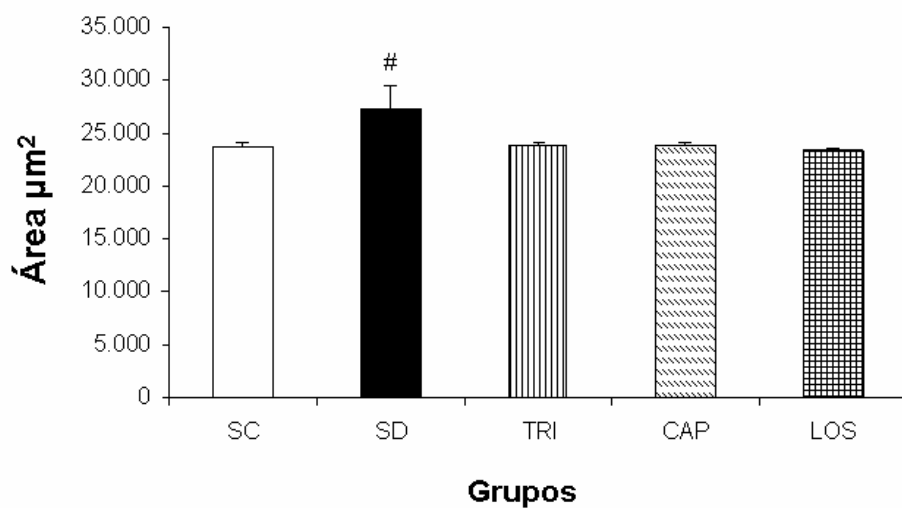


Figura 3- Superfície glomerular renal. A superfície glomerular foi determinada em μm^2 de 20 glomérulos corticais de ratos SHR controle (SC) (n=3), SHR diabéticos (SD) (n=3), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3), captopril (CAP) (n=3) ou losartan (LOS) (n=3). As colunas representam média $\pm$ desvio padrão. [#]p<0,005 comparado com os demais grupos.

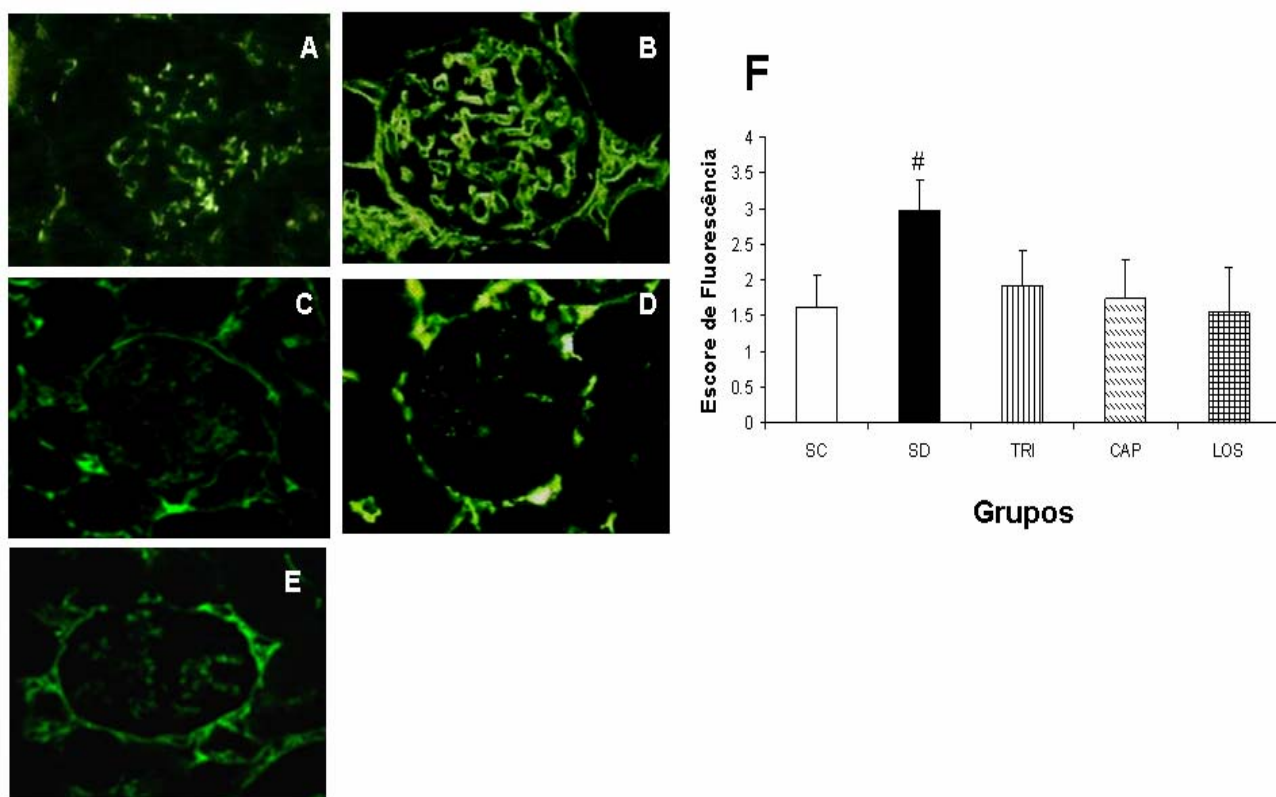


Figura 4- Imunofluorescência para fibronectina. Fibronectina foi detectada nos glomérulos de ratos SHR controle (SC) (n=4) (A), SHR diabéticos (SD) (n=4) (B), SHR diabéticos tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3) (C), captopril (CAP) (n=4) (D) ou losartan (LOS) (n=4) (E). Painel (F) mostra intensidade de fluorescência (determinado como descrito nos métodos) para fibronectina em ratos controle SHR (SC), SHR diabéticos (SD), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI), captopril (CAP) ou losartan (LOS). [#]p<0,005 comparado com os demais grupos.

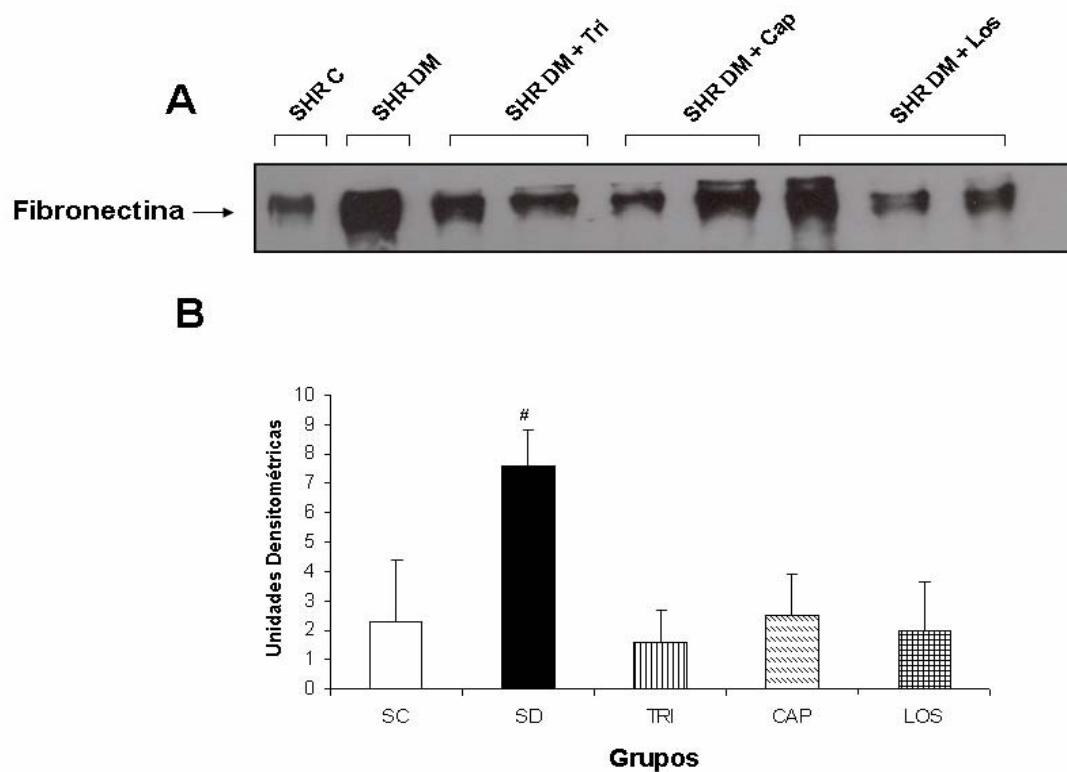


Figura 5- Expressão de fibronectina no rim de ratos SHR. A. Western Blot para fibronectina nos glomérulos lisados. O experimento mostra 20 μ g de lisado glomerular de ratos SHR controle (SC) (n=4), SHR diabéticos (SD) (n=4), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3), captopril (CAP) (n=4) ou losartan (LOS) (n=4). Cada banda representa um “pool” de 3-4 ratos. B. Análise densitométrica dos níveis de fibronectina glomerular. As colunas representam média $\pm$ desvio padrão. [#]p<0,005 comparado com os demais grupos.

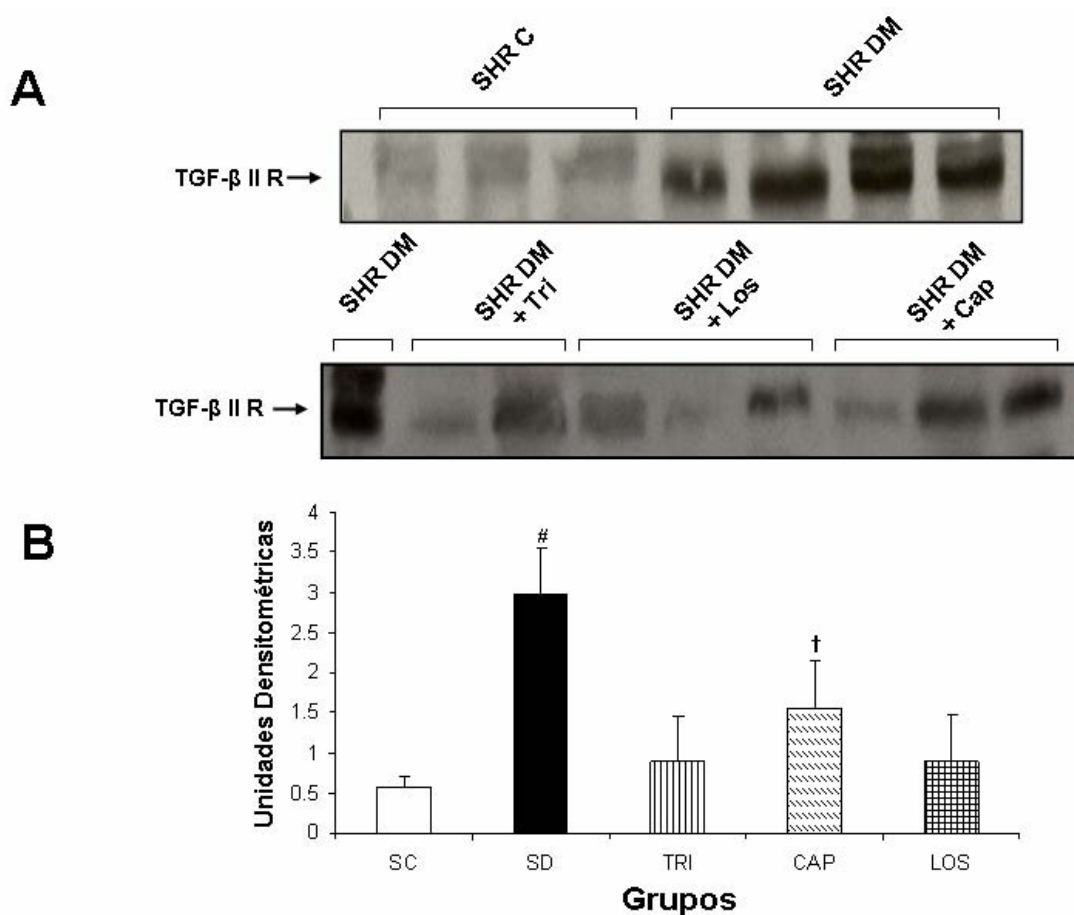


Figura 6- Expressão de TGF β IIR no rim de ratos SHR. A. Western Blot para TGF β IIR nos glomérulos lisados. O experimento mostra 80 μ g de lisado glomerular de ratos SHR controle (SC) (n=4), SHR diabéticos (SD) (n=4), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3), captopril (CAP) (n=4) ou losartan (LOS) (n=4). Cada banda representa um “pool” de 3-4 ratos. B. Análise densitométrica dos níveis de TGF β IIR glomerular. As colunas representam média $\pm$ desvio padrão. [#]p<0.005 SD comparado com os demais grupos; [†]p=0,01 CAP comparado ao SC.

4.7- Replicação Celular, P21^{Cip1} e P27^{kip1}

A indução do diabetes reduziu significativamente a replicação celular avaliada pelo PCNA no grupo de animais SHR diabéticos, tanto no glomérulo como na região túbulo-intersticial. A replicação celular glomerular foi restaurada nos animais SHR diabéticos tratados com os diversos anti-hipertensivos (figura 7), entretanto na região túbulo-intersticial o tratamento anti-hipertensivo não foi capaz de restaurar a replicação celular a valores semelhantes ao grupo SHR controle.

Para investigar o potencial papel das proteínas reguladoras do ciclo celular na redução da replicação glomerular, estudamos a expressão das ciclinas p21^{Cip1} e p27^{kip1}. Apenas a expressão da ciclina p27^{kip1} encontrava-se elevada no grupo SHR diabético, porém o controle da pressão arterial não foi capaz de corrigir este aumento na expressão do p27^{kip1} (figura 8). A expressão do p21^{Cip1} encontrava-se reduzida nos animais diabéticos e não foi modificada pelo tratamento anti-hipertensivo (figura 9).

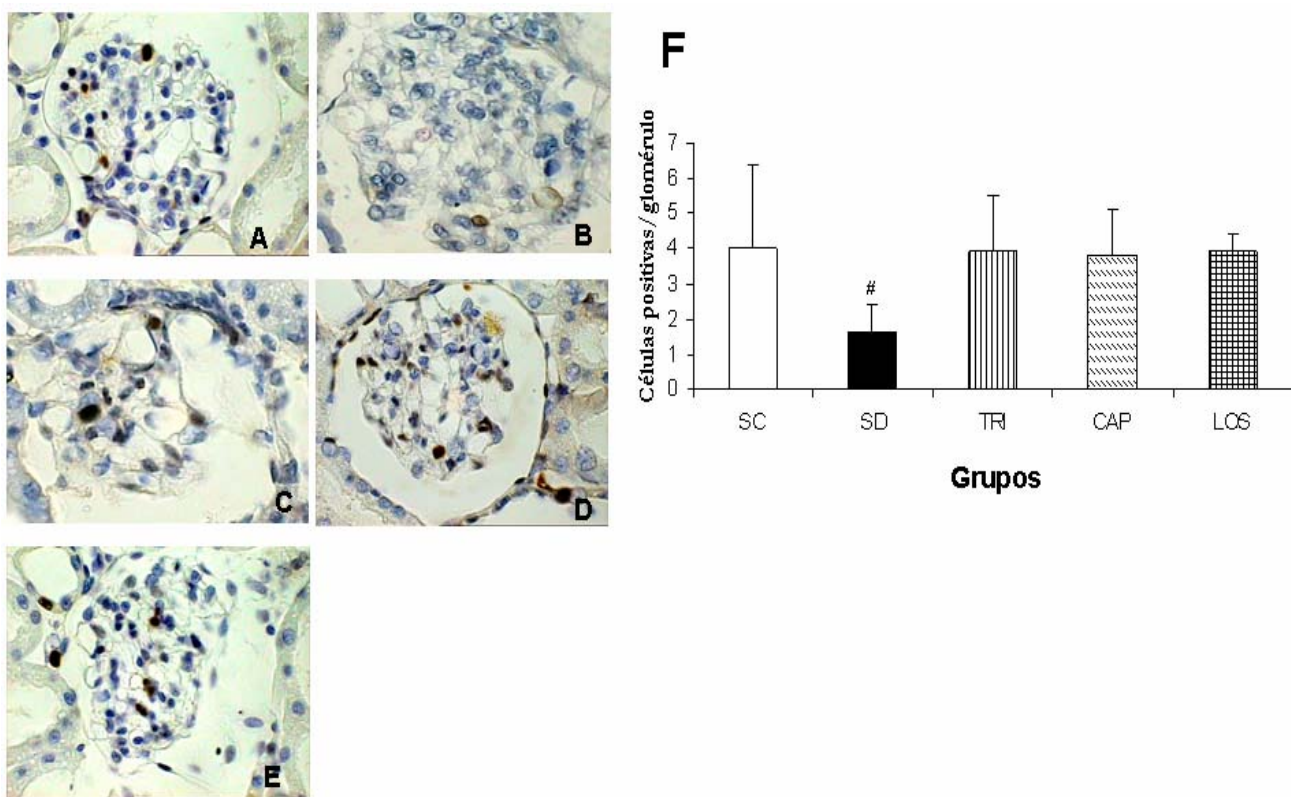


Figura 7- Imunohistoquímica para identificação de células positivas para PC10 em cortes renais. Células renais replicantes reagindo com o anticorpo PC10 (PCNA) foram detectadas em SHR controle (SC) (n=6) (A), SHR diabético (SD) (n=5) (B), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3) (C), captopril (CAP) (n=4) (D) ou losartan (LOS) (n=4) (E). F. Número de células em replicação por glomérulo. Células positivas foram contadas em 50 glomérulos de cada rato. As colunas representam a média±desvio padrão. [#]p<0,05 comparado com o grupo SC.

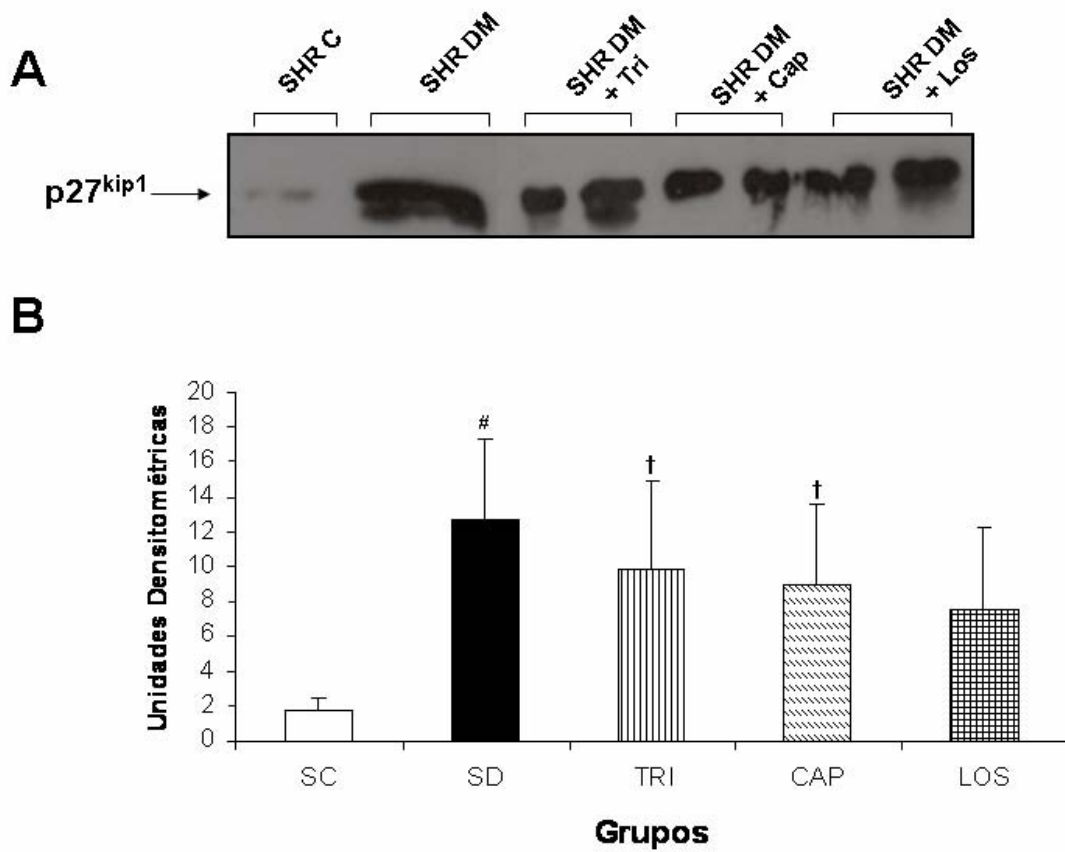


Figura 8- Expressão de $p27^{kip1}$ no rim de ratos SHR. A. Western Blot para $p27^{kip1}$ nos glomérulos lisados. O experimento mostra 30 μ g de lisado glomerular de ratos SHR controle (SC) (n=4), SHR diabéticos (SD) (n=4), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3), captopril (CAP) (n=5) ou losartan (LOS) (n=3). Cada banda representa um “pool” de 3-4 ratos. B. Análise densitométrica dos níveis de $p27^{kip1}$ glomerular. As colunas representam média $\pm$ desvio padrão. #p=0,008 comparado com o grupo SC, †p<0,05 comparado com o grupo SC.

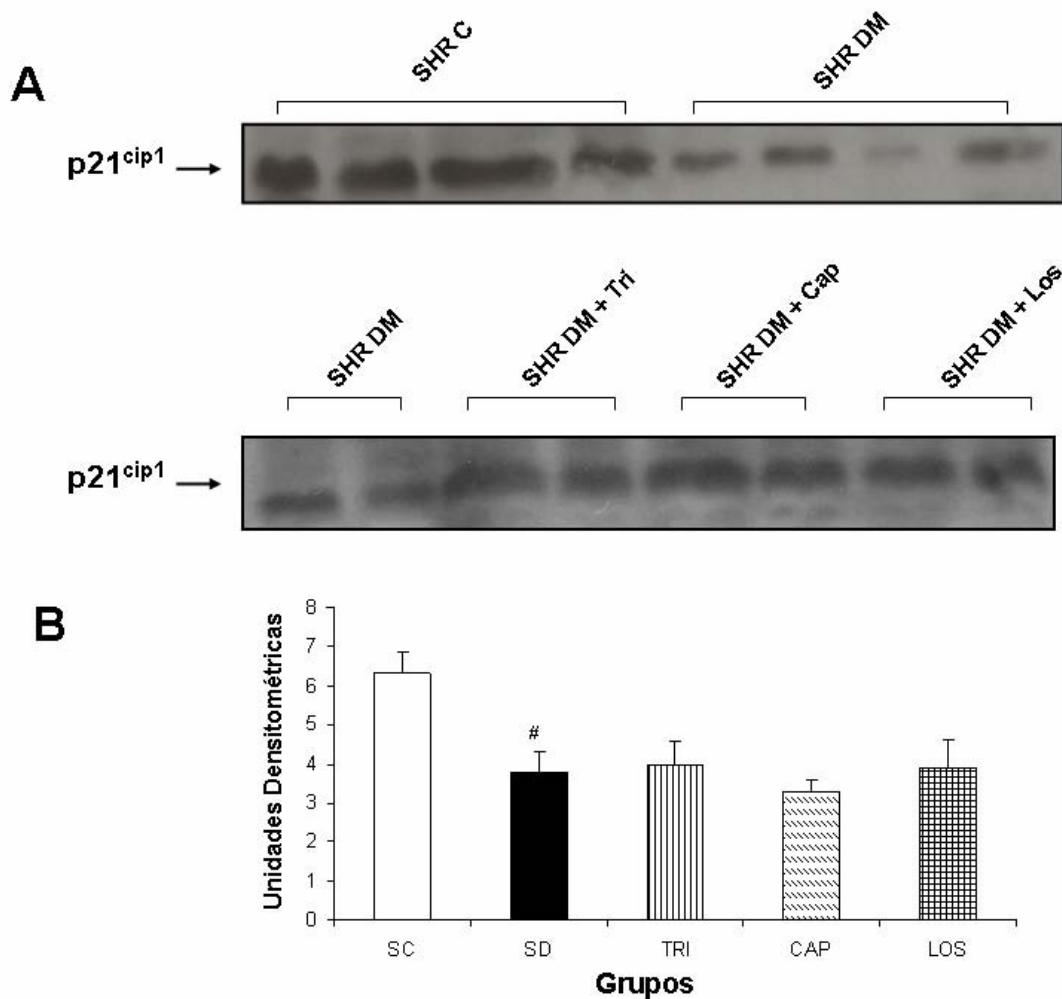


Figura 9- Expressão de p21^{cip1} no rim de ratos SHR. A. Western Blot para p21^{cip1} nos glomérulos lisados. O experimento mostra 60 µg de lisado glomerular de ratos SHR controle (SC) (n=4), SHR diabéticos (SD) (n=4), e SHR tratados com terapia tríplice (TRI) (n=3), captopril (CAP) (n=4) ou losartan (LOS) (n=4). Cada banda representa um “pool” de 3-4 ratos. B. Análise densitométrica dos níveis de p21^{cip1} glomerular. As colunas representam média ± desvio padrão. [#]p<0,005 comparado com o grupo SC.



5- DISCUSSÃO

Em pacientes com DM e em modelos de ND experimental a presença de hipertensão arterial é um importante acelerador de ND (Cooper et al., 1988; Parving et al., 1993; Pavan et al., 2003; Lehfeld et al., 2004). O modelo experimental utilizado no presente estudo, ratos espontaneamente hipertensos com DM induzido por estreptozotocina, combina duas características fundamentais da doença renal secundária ao DM, o ambiente hiperglicêmico e a hipertensão arterial. Tem sido demonstrado que este modelo apresenta muitas características semelhantes à lesão renal diabética encontrada em humanos (Steffes et al., 1994), incluindo albuminúria progressiva com subsequente desenvolvimento de proteinúria, espessamento de membrana basal e expansão de matriz mesangial (Cooper et al., 1988). Nosso estudo demonstra a importância da hipertensão arterial genética em alterações fisiopatológicas precoces da ND. Além disso, demonstramos o benefício da prevenção do desenvolvimento de hipertensão arterial neste modelo experimental de ND. No nosso modelo a prevenção das lesões renais foram independentes da droga anti-hipertensiva interferir ou não no SRA.

Hipertrofia glomerular é uma característica anátomo-patológica marcante da ND (Osterby e Gundersen, 1975; Osterby et al., 1987). Esta é resultado do espessamento da membrana basal, associado à hipertrofia de células mesangiais e expansão do mesângio glomerular. A interrupção de progressão do ciclo celular, com consequente aumento na síntese protéica sem replicação celular leva a hipertrofia de células mesangiais e aumento de matriz extracelular (Hirose et al., 1982; Wolf et al., 2001). Dados de nosso laboratório, sugerem, que o aumento na expressão renal de fibronectina pode representar um fenômeno precoce no desenvolvimento da nefropatia diabética associada à hipertensão arterial (Righetti et al., 2001). Combinados com defeitos hemodinâmicos, hipertensão arterial e/ou hipertensão glomerular, podem desencadear esclerose glomerular, modificar a filtração glomerular e levar a proteinúria, resultando em insuficiência renal (Rossing et al., 1993; Hirose et al., 1982; Wolf et al., 2001). Nosso estudo demonstrou que a prevenção da hipertensão arterial pode impedir a hipertrofia glomerular, restaurar a redução na replicação celular e impedir o acúmulo precoce de fibronectina glomerulares. Portanto, uma intervenção precoce na pressão arterial pode prevenir o início da glomerulosclerose diabética, e mais, este efeito foi independente da classe de droga anti-hipertensiva utilizada, haja vista não haver nenhum efeito benéfico adicional com drogas que interferem no SRA.

A hipertrofia renal tem sido descrita precocemente na ND experimental, onde ratos *BB* diabéticos apresentam hipertrofia renal 3 dias após o diagnóstico do diabetes (Sharma e Ziyadeh, 1994). Além disso, o tratamento anti-hipertensivo tem se mostrado capaz de prevenir a hipertrofia renal em modelos de ND (Cooper et al., 1990; Wolf et al., 1999). Aumento de massa renal é resultante de aumento de volume glomerular e principalmente de aumento da massa tubular renal (Seyer-Hansen et al., 1980). Interessante notar que no presente estudo o aumento do peso do rim nos animais diabéticos foi acompanhado por redução de replicação na região túbulo-intersticial, entretanto no nosso estudo o efeito de prevenção de hipertrofia esteve presente apenas na região glomerular. Provavelmente, este achado explica a ausência de correção do peso do rim com a prevenção da hipertensão arterial.

Albuminúria é uma característica marcante da ND (Estacio e Schrier, 2001). A presença de albuminúria tem sido apontada como um fator de risco independente para a cardiopatia isquêmica e aumento de mortalidade por doença cardiovascular em pacientes portadores de DM tipo 1 e 2 (Messent et al., 1992; Mattock et al., 1998). Além disso, estudos experimentais em modelos animais, sugerem que a proteinúria *por si* pode contribuir para a lesão glomerular (Remuzzi e Bertani, 1990). Pacientes portadores de DM tipo 1 e proteinúria apresentam pior prognóstico renal, inclusive nas fases mais precoces da ND (Rossing et al., 1993). No nosso modelo animal, a presença de hipertensão arterial e diabetes mellitus aceleraram o aumento na albuminúria. Este último foi prevenido pela instituição precoce do tratamento anti-hipertensivo.

Uma relação entre redução de expressão de nefrina e aumento na albuminúria foi descrita em modelos animais e humanos de nefropatia diabética (Doublier et al., 2003; Langan et al., 2002). O mecanismo pelo qual a hiperglicemia leva a redução da nefrina não é completamente esclarecido. Intervenções farmacológicas em modelos animais suportam a hipótese de que um aumento na atividade da angiotensina II pode estar envolvida na lesão podocitária no diabetes experimental. De interesse, administração de bloqueadores do receptor da angiotensina II tipo 1 ou inibidores da enzima conversora da angiotensina atenuaram o alargamento do processo podocitário e restauraram a expressão de nefrina em ratos diabéticos por estreptozotocina (Mifsud et al., 2001; Bonnet et al.,

2001; Langhan et al., 2002). Vale ressaltar que recente estudo *in vitro* demonstrou aumento na produção de angiotensina II em podócitos após estresse mecânico, o qual mimetiza o efeito da hipertensão arterial. Neste estudo a formação de angiotensina II conseqüente ao estresse mecânico foi independente da enzima conversora da angiotensina (Durvasala et al., 2004). No nosso estudo, a prevenção da hipertensão arterial foi capaz de impedir a redução da nefrina independente da droga interferir ou não sobre o SRA. Nos estudos anteriores onde o efeito de restabelecimento da nefrina foi atribuído a interferência sobre a angiotensina II os animais tratados com IECA ou AT1 tinham pressão inferior ao grupo correspondente em estudo. De interesse, no estudo realizado por Bonnet e colaboradores (2001) a pressão arterial no grupo tratado com irbesartan foi 36 mmHg menor que no grupo controle (Bonnet et al., 2001). Desta forma, esta é a primeira demonstração de que fatores hemodinâmicos (hipertensão arterial) têm importância crucial na regulação da expressão da nefrina, de forma a se sobrepor aos efeitos da angiotensina II que não hemodinâmicos. Outro aspecto interessante é que a redução na albuminúria com o tratamento anti-hipertensivo ocorreu independente da manutenção da hiperglicemia. Diversos estudos em pacientes com ND demonstram que o controle pressórico é mais efetivo que o controle da glicemia no tratamento da ND (Intensive blood-glucose control..., 1998), e ainda não é possível excluir a possibilidade que ambas as anormalidades a hipertensão arterial e a hiperglicemia apresentem uma via de sinalização única.

O TGF β 1 tem sido implicado como o mediador comum final das principais lesões da ND (Ziyadeh et al., 1994), inclusive como o principal mediador implicado na produção de proteínas de matriz extracelular, dentre elas a fibronectina (Oh et al., 1998). Os fatores mediando aumento na expressão de TGF β 1 na ND provavelmente envolvem hiperglicemia e/ou deficiência de insulina (Sharma e Ziyadeh, 1994), fatores hemodinâmicos intraglomerulares (Cortes et al., 1994), sistema renina-angiotensina (Kagami et al., 1994), “insulin-like growth factor” e ativação de PKC (proteína cinase C) (Koya e King, 1998). Células mesangiais submetidas a estresse por “estiramento” apresentam aumento na secreção e ativação de TGF β 1, este mecanismo pode participar na glomeruloesclerose que se segue a hipertensão no capilar glomerular (Riser et al., 1993). No nosso trabalho a prevenção do desenvolvimento da hipertensão resultou na normalização da expressão do TGF β IIR bem como previniu o acúmulo de

fibronectina. Aumento na expressão de TGF β 1 no córtex renal tem sido descrito de forma precoce, 24 horas após o surgimento do diabetes, e este aumento precede o aumento na expressão de fibronectina (Shankland e Scholey, 1994, Oh et al., 1998). Camundongos *db/db* (um modelo de diabetes mellitus tipo II) tratados intraperitonealmente com anticorpo anti-TGF β 1 tem redução na concentração sérica de TGF β 1, na expansão de matriz mesangial e principalmente não apresentam piora na filtração glomerular (Ziyadeh et al., 2000). Interessante ressaltar que estes animais, apesar da manutenção da proteinúria, apresentaram melhora na função renal. Este último achado foi confirmado por outros autores (Wolf et al., 2005), onde o bloqueio do TGF β 1 protege a ND independente da proteinúria, demonstrando que possivelmente outros mediadores estão envolvidos na determinação da proteinúria na ND. Recentemente tem sido sugerido que o “vascular endotelial growth factor” pode ser a citocina envolvida na regulação da permeseletividade glomerular (Wolf et al., 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que anormalidades na replicação celular podem contribuir para o desenvolvimento da doença renal no diabetes mellitus (Shankland e Wolf, 2000). Em particular, elevação na expressão de inibidores de CDK $p21^{cip1}$ e $p27^{kip1}$ parece ser crítica para hipertrofia glomerular e desenvolvimento de albuminúria. Tanto a hipertrofia glomerular como a de células mesangiais, em camundongos diabéticos por estreptozotocina, foram acompanhados por aumento nos níveis de $p21^{cip1}$ (Kuan et al., 1998). Estudo subsequente demonstrou que camundongos “knockout” para $p21^{cip1}$ e diabéticos por estreptozotocina não apresentavam hipertrofia glomerular mesmo com aumento na expressão de TGF β (Al Douahji et al., 1999). Em outro estudo realizado em cultura de células musculares lisas, foi demonstrado que o uso de um “antisense” para $p21^{cip1}$ resultou numa inibição de proteínas de matriz extracelular, inclusive fibronectina (Weiss et al., 2002). Células mesangiais humanas em cultura estimuladas com *insulin growth factor-1* apresentam aumento na expressão de $p21^{cip1}$ e hipertrofia, e à adição de “antisense” para $p21^{cip1}$ foi capaz de atenuar a hipertrofia de células mesangiais (Fan e Weiss, 2004). Recentemente, foi demonstrado que o TGF β 1 e produtos de glicosilação avançada, através do seu receptor (RAGE), convergem em uma única via de sinalização, através de uma proteína de transcrição o STAT5,

levando a interrupção do ciclo celular através do p21^{cip1}. Entretanto, o estímulo com RAGE levando ao aumento na produção de matriz extracelular era dependente do TGF β 1 quando avaliado pela expressão do seu receptor TGF β IIR (Brizzi et al., 2004).

A participação da ciclina p27^{kip1} na hipertrofia renal foi inicialmente descrita por Wolf e colaboradores em células tubulares estimuladas com angiotensina (Wolf et al., 1996), posteriormente estes mesmos autores demonstraram que a hipertrofia de células mesangiais de camundongo incubadas em meio rico em glicose requeria aumento na expressão de p27^{kip1} (Wolf et al., 1997). Camundongos *db/db* apresentam aumento na expressão de p27^{kip1} em relação aos seus controles *db/+*, e este efeito era reproduzido quando as células provenientes de ambas as linhagens de camundongos eram expostas a meio rico em glicose (Wolf et al., 1998). Awazu e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos diabéticos e “knockout” para p27^{kip1} apresentavam atenuação na expansão mesangial e hipertrofia glomerular e prevenção do surgimento de albuminúria (Awazu et al., 2003). Recentemente foi demonstrado em camundongos que a deleção parcial do gene do p27^{kip1} é parcialmente protetor, e a deleção completa foi capaz de atenuar as alterações funcionais e estruturais na ND experimental, esta proteção foi independente da presença de hiperglicemia (Wolf et al., 2005 b). O mecanismo protetor não está totalmente esclarecido, porém parece envolver mecanismos além de prevenção de hipertrofia renal causada por interrupção do ciclo celular, bem como alterações sobre migração celular e transição epitélio-mesenquimal, a qual tem sido recentemente reportada como tendo papel fundamental no desenvolvimento de fibrose (Steffes et al., 1992; Wolf et al., 2005b).

Uma participação da angiotensina II na hipertrofia celular induzida por alta glicose e mediada por p27^{kip1} tem sido demonstrada. Em trabalho anteriormente citado, Wolf e Stahl demonstraram que expressão de p27^{kip1} estava aumentada no túbulo proximal de células estimuladas com angiotensina II e que a adição de um “antisense” de p27^{kip1} impedia a hipertrofia mediada por angiotensina II (Wolf et al., 1998). Posteriormente, Wolf e colaboradores (1999), num modelo de ratos *BBdp*, demonstraram que após o início do diabetes os animais apresentavam aumento da expressão de p16^{INK4}, p27^{kip1} e p21^{cip1}, e o tratamento com IECA (enalapril) por 3 semanas, foi capaz de normalizar apenas a expressão das ciclinas p16^{INK4} e p27^{kip1} (Wolf et al., 1999). Recentemente foi demonstrado

que podócitos cultivados em meio rico em glicose apresentam aumento na expressão de p27^{kip1} e hipertrofia celular, e o tratamento com um bloqueador do receptor tipo 1 da angiotensina II restaurou os níveis de p27^{kip1} e preveniu a hipertrofia celular (Xu et al., 2005). Entretanto, neste último estudo os animais não apresentavam hipertensão arterial. Nossos resultados confirmam os resultados anteriores. Além disso, na presença de hipertensão arterial, o efeito de bloqueio de progressão no ciclo celular com conseqüente hipertrofia glomerular pode ser prevenido com o controle rigoroso e precoce da pressão arterial, independente do tratamento anti-hipertensivo interferir ou não com a angiotensina II. Esta é a primeira demonstração in vivo de que a prevenção da hipertensão arterial é capaz de restaurar a replicação celular renal.

Dados iniciais de uma participação do TGF β na regulação do ciclo celular foi inicialmente descrito por Wolf e colaboradores em 1992. Neste estudo a adição de glicose foi acompanhada por aumento de proliferação de células mesangiais e revertida com a adição de TGF β (Wolf et al., 1992). Posteriormente, Poliak e colaboradores (1994) demonstraram em células epiteliais de fúro que o TGF β 1 interrompia o ciclo celular na fase G1 e que esta interrupção era acompanhada por aumento na expressão de p27^{cip1} (Poliak et al., 1994). Estudo em células mesangiais de humanos demonstrou que a adição de CTGF, uma citocina multifuncional, levou a interrupção do ciclo celular na fase G1, acompanhado de aumento na expressão de p15^{INK4}, p27^{kip1} e p21^{cip1} e ainda o CTGF era o mediador dos efeitos anti-proliferativos do TGF β 1 (Wahab et al., 2002). Além disso, Monkawa e colaboradores (2002) em cultura de células mesangiais, demonstraram que o efeito hipertrófico do TGF β 1 é reduzido na ausência das ciclinas p27^{kip1} e p21^{cip1} (Monkawa et al., 2002). Portanto, no nosso estudo a prevenção no aumento da expressão do receptor do TGF β 1 pode ser o responsável pelas correções da replicação celular encontradas.

Em resumo, os animais SHR diabéticos por 20 dias apresentam anormalidades precoces como: aumento na albuminúria e redução de nefrina; hipertrofia glomerular, redução de replicação celular e aumento na expressão de fibronectina e TGF β 1, bem como da ciclina inibitória p27^{kip1}. A prevenção da hipertensão arterial foi capaz de

impedir as alterações precoces na nefropatia diabética experimental. Estas informações podem contribuir para a prevenção da nefropatia em indivíduos diabéticos com predisposição à hipertensão arterial.



6- CONCLUSÃO

Em ratos SHR jovens a indução do diabetes mellitus resultou em acúmulo precoce de TGF β 1, fibronectina e hipertrofia glomerular, além de redução da replicação celular com aumento na expressão de p27^{kip1}. A expressão glomerular de nefrina que estava reduzida nos animais SHR diminuiu de forma mais acentuada na presença do diabetes mellitus.

A prevenção da hipertensão arterial foi capaz de restaurar as anormalidades precoces presentes nos rins dos ratos SHR diabéticos, independente da classe da droga anti-hipertensiva utilizada. Essa observação reforça o papel da hipertensão arterial nestas alterações.

É possível que as alterações observadas nos rins dos ratos SHR diabéticos possam estar envolvidas no mecanismo pelo qual a hipertensão arterial e o diabetes mellitus interagem para exacerbar a nefropatia.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler S. Structure function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:1165-72.

Adragna NC, Canessa M, Solomon H, Slater E, Tostenson DC. Red cell lithium-sodium countertransport and sodium-potassium co-transport in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1982; 4:795-804.

Al-Douahji M, Brugarolas J, Brown PAJ, Stehman-Breen CO, Alpers CE, Shankland SJ. The cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} is required for glomerular hypertrophy in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1999; 56:1691-9.

Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in type I (insulin-dependent) diabetes: an epidemiologic study. *Diabetologia* 1983; 25:496-501.

Awazu M, Omori S, Ishikura K, Hida M, Fujita H. The lack of cyclin kinase inhibitor P27^{kip1} ameliorates progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:699-708.

Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Glass WF 2nd, Kreisberg JJ. High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 1990; 136:1339-48.

Ayo SH, Radnik RA, Glass WF 2nd, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, et al. High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am J Physiol* 1991; 261:571-7.

Bao L, Zhou J, Holers VM, Quigg RJ. Excessive matrix accumulation in the kidneys of MRL/lpr lupus mice is dependent on complement activation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2516-25.

Barceló A, Rajpathak S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. *Pan Am Publ Health* 2001; 10:300-8.

Baricos WH, Cortez SL, Deboisblanc M, Xin S. Transforming growth factor- β is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:790-5.

Baron M, Norman D, Willis A, Campbell ID. Structure of the fibronectin type I module. *Nature* 1990; 345:642-6.

Barzilay J, Warram JH, Bak M, Laffel LMB, Canessa M, Krolewsky AS. Predisposition to hypertension: risk factor for nephropathy and hypertension in IDDM. *Kidney Int* 1992; 41:723-30.

Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, Abbate M, Ruggenenti P, Kalluri R, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004; 65:2193–200.

Berg UB, Torbjornsdotter TB, Jaremko G, Thalme B. Kidney morphological changes in relation to long-term renal function and metabolic control in adolescents with IDDM. *Diabetologia* 1998; 41:1047-56.

Bianchi G, Cusi D, Guidi E. Renal hemodynamics in human subjects and in animals with genetic hypertension during the pre-hypertensive stage. *Am J Nephrol* 1983; 3:73-9.

Blackshear JL, Garnic D, Williams GH, Harrington DP, Hollenberg NK. Exaggerated renal vasodilatador response to calcium entry blockade in first degree relative of essential hypertensive subjects. *Hypertension* 1987; 9:384-9.

Blanco S, Bonet J, Lopez D, Casas I, Romero R. ACE inhibitors improve nephrin expression in Zucker rats with glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl* 2005; 93:S10-4.

Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalizes the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 2001; 44:874-7.

Bonnet F, Tikellis C, Kawachi H, Burns WC, Wookey PJ, Cao Z, et al. Nephlin expression in the post-natal developing kidney in normotensive and hypertensive rats. Clin Exp Hypertens 2002; 24:371-8.

Borch-Johnsen K, Nissen RN, Nerup J. Blood pressure after 40 years of insulin-dependent diabetes. Diabetic Nephrop 1985; 4:11-2.

Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T, et al. Is diabetic nephropathy an inherited complication? Kidney Int 1992; 41:719-22.

Bottinger EP, Bitzer M. TGF β signaling in renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13:2600-10.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-54.

Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med 2001; 345:861-9.

Breyer JA, Bain RP, Evans JK, Nahman NS Jr, Lewis EJ, Cooper M, et al. Predictors of the progression of renal insufficiency in patients with insulin-dependent diabetes and overt diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. Kidney Int 1996; 50:1651-8.

Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A, Calvi C, Gambino R, Cassader M, et al. RAGE- and TGF β receptor-mediated signals converge on Stat5 and p21 to control cell cycle progression of mesangial cells: a possible role in the development and progression of diabetic nephropathy. Faseb J 2004; 18:1249-51.

Brownlee M, Cerami A, Vlassra H. Advanced glycosylation end products and tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 1998; 318: 1315-21.

Canessa M, Adragna N, Solomon HS, Connolly TM, Tosteson DC. Increased sodium-lithium counter-transport in red cells of patients with essential hypertension. N Engl J Med 1980; 302:772-6.

Carr SJ, Thomas TH, Wilkinson R. Erythrocyte sodium-lithium countertransport in primary and renal hypertension: relation to family history. *Eur J Clin Invest* 1989; 19:101-6.

Casas JP, Chua W, Loukogeorgakis S, Vallance P, Smeeth L, Hingorani AD, et al. Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2005; 366:2026-33.

Christiansen JS, Gammelgaard J, Frandsen M, Parving HH. Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* 1981; 20:451-6.

Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 2000; 57:167-82.

Cooper ME, Allen TJ, Macmillan P, Clarke B, O'brien RC, Jerums G, et al. Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat - functional and structural characteristics. *J Hypertens* 1988; 6:1009-16.

Cooper ME, Allen TJ, O'brien RC, Papazoglou D, Clarke BE, Jerums G, et al. Nephropathy in a model combining genetic hypertension with experimental diabetes. Enalapril versus hydralazine and metoprolol therapy. *Diabetes* 1990; 39:1575-9.

Cooper ME, Rumble JR, Allen TJ, O'Brien RC, Jerumus G, Doyle AE. Antihypertensive therapy in a model combining spontaneous hypertension with diabetes. *Kidney Int* 1992; 41:898-903.

Cortes P, Riser BL, Zhao X, Narins RG. Glomerular volume expansion and mesangial cell mechanical strain: mediators of glomerular pressure injury. *Kidney Int Suppl* 1994; 45:S11-6.

Courtney PJ, Kanwar YS, Hynes RO, Farquhar MG. Fibronectin localization on rat glomerulus *J Cell Biol* 1980; 87:691-6.

Cowie CC, Port FK, Wolfe RA, Savage PJ, Moll PP, Hawthorne VM. Disparities in incidence of diabetic end-stage renal disease according to race and type of diabetes. *N Engl J Med* 1989; 321:1074-9.

Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52:1031-5.

Deckert T, Poulsen J. Diabetic nephropathy: fault or destiny? *Diabetologia* 1981; 21:178-83.

Delcourt C, Villatte-Cathelineau B, Vauzelle-Kervroedan F, Papoz L. Clinical correlates of advanced retinopathy in type II diabetic patients: implications for screening. *J Clin Epidemiol* 1996; 49:679-85.

Derylo B, Babazono T, Glogowski E, Krapor-Drezgic J, Homan T, Whitside C. High glucose-induced mesangial cell altered contractility: role of the polyol pathway. *Diabetologia* 1998; 41: 507-15.

Dixon AJ, Burns J, Dunnill MS, McGee JO. Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *J Clin Pathol* 1980; 33:1021-8.

Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard JJ, Wagner DK, et al. The Pitisburg insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. *Diabetes* 1984; 33:271-6.

Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, et al. Nephritin expression is reduced in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2003; 52:1023-30.

Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 2004; 65:30-9.

Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UKPDS 39. UK prospective diabetes study group. *BMJ* 1998; 317:713-20.

Ellis EM, Steffes MW, Chavers B, Mauer SM. Observations of glomerular epithelial cell structure in patients with type I diabetes mellitus. *Kidney Int* 1987; 32:736-41.

Estacio RO, Schrier RW. Diabetic nephropathy: pathogenesis, diagnosis, and prevention of progression. *Adv Intern Med* 2001; 46:359-408.

Fan Y, Weiss RH. Exogenous attenuation of p21^{WAF1/CIP1} decreases mesangial cell hypertrophy as a result of hyperglycemia and IGF-1. *J Am Soc Nephrol* 2004 15: 575-84.

Fioretto P, Steffes MW, Mauer M. Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria. *Diabetes* 1994; 43:1358-64.

Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 1998; 39:69-75.

Forbes JM, Bonnet F, Russo LM, Burns WC, Cao Z, Candido R, et al. Modulation of nephrin in the diabetic kidney: association with systemic hypertension and increasing albuminuria. *J Hypertens* 2002; 20:985-92.

Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995; 20:211-9.

Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, et al. Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 2000; 49:655-61.

Hamaguchi A, Kim S, Ohta K, Yagi K, Yukimura T, Miura K, Fukuda T, Iwao H. Transforming Growth Factor- β 1 Expression and Phenotypic Modulation in the Kidney of hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26:199-207.

Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 1997; 46:847-53.

Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl RAK, Wolf G. Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27^{Kip1}: role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1387-97.

Hannon GJ, Beach D. p15^{ink4b} is a potential effector of TGF β induced cell-cycle arrest. *Nature* 1994; 371:257-61.

Heesom AE, Hibberd ML, Millward BA, Demaine AG. Polymorphism in the 5' -end of the aldose reductase gene is strongly associated with the development of diabetic nephropathy in type I diabetes. *Diabetes* 1997; 46:287-91.

Heilig C, Zaloga C, Lee M, Zhao X, Riser B, Brosius F, et al. Immunogold localization of high affinity glucose transporter isoform in normal rat kidney. *Lab Invest* 1995; 73:674-84.

Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes mellitus in the rat. *Kidney Int* 1982; 21:689-95.

Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the glucose transporter (GLUT 1) gene are associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59:985-9.

Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1981; 19:410-5.

Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Smidt UM, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59:702-9.

Inagi R, Yamamoto Y, Nangaku M, Usuda N, Okamoto H, Kurokawa K, et al. A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by megalin overexpression in RAGE/iNOS transgenic mice. *Diabetes* 2006; 55:356-66.

Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 1998; 352:837-53.

Ives HE. Ion transport defects and hypertension. Where is the link? Hypertension 1989; 14: 590-7.

Jones SL, Trevisan R, Tariq T, Semplicini A, Mattock M, Walker JD, et al. Sodium-lithium countertransport in microalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. Hypertension 1990; 15:570-5.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. J Clin Invest 1994; 93:2431-7.

Kang MJ, Ingram A, Ly H, Thai K, Scholey JW. Effects of diabetes and hypertension on glomerular transforming growth factor-beta receptor expression. Kidney Int 2000; 58:1677-85.

Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, et al. Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states. Kidney Int 2000; 57:1949-61.

Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, Rumble JR, Langham R, Panagiotopoulos S, et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. Nephrol Dial Transpl 2002; 17:1327-32.

Khalifa A, Cohen MP. Glomerular procollagen lysyl hidroxilase activity in streptozotocin diabetes. Biochem Biophys Acta 1975; 386:332-39.

Kim HW, Kim BC, Song CY, Kim JH, Hong HK, Lee HS. Heterozygous mice for TGF-beta IIR gene are resistant to the progression of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Kidney Int. 2004; 66:1859-65.

Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2063-71.

Koren W, Koldanov R, Pronin VS, Postnov IY, Peleg E, Rosenthal T, et al. Enhanced erythrocyte Na^+/H^+ exchange predicts diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1998; 41:201-5.

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47:859-66.

Krakower CA, Greenspoon SA. Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *Archives of Pathology* 1954; 58:401-32.

Krolewsky AS, Warram JH, Christlieb AR, Busik EJ, Kahn CR. The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Am J Med* 1985; 78:785-94.

Krolewsky AS, Canessa M, Warram JH, Laffel LMB, Christlieb AR, Knowler WC, et al. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 21:140-5.

Krolewski AS, Laffel LM, Krolewski M, Quinn M, Warram JH. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 332:1251-5.

Kuan CJ, Al-Douahji M, Shankland SJ. The cyclin kinase inhibitor $\text{p21}^{\text{WAF1,Cip1}}$ is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:986-93.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.

Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthofer H, Zaoui P, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002; 45: 1572-6.

Lehfeld LS, Silveira LA, Ghini B, Lopes de Faria JB. Early blood pressure normalization independent of the class of the antihypertensive agent prevents augmented renal fibronectin and albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27:114-20.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD, for the Collaborative Study Group. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1993; 329:1456-62.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbersartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345:851-60.

Lopes de Faria JB, Bittencourt ZZLC, Ribeiro Alves MAVF: Prevalência da nefropatia diabética em pacientes adultos com insuficiência renal crônica terminal. *Rev Ass Med Bras* 1995; 41: 335-53.

Lopes de Faria JB, Friedman R, Tariq T, Viberti GC: Sodium-lithium countertransport activity in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 1992; 41:877-82.

Mahnesmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 1985; 56:773-88.

Mancini GAO, Carbonaro JF. Immunohistochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-54.

Massague J, Chen G. Controlling TGF- β signaling. *Genes and Development* 2000; 14:627-44.

Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1358-73.

Mattock MB, Barnes DJ, Viberti G, Keen H, Burt D, Hughes JM, et al. Microalbuminuria and coronary heart disease in NIDDM: an incidence study. *Diabetes* 1998; 47:1786-92.

Mauer MS. Structural-functional correlations of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45:612-22.

McLennan SV, Fisher EJ, Yue DK, Turtle JR. High glucose concentration causes a decrease in mesangium degradation: A factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 1994; 43:1041-5.

McLennan SV, Kelly DJ, Cox AJ, Cao Z, Lyons JG, Yue DK, et al. Decreased matrix degradation in the diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 2002; 45:268-75.

Messent JW, Elliott TG, Hill RD, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus: a twenty-three year follow-up study. *Kidney Int* 1992; 41:836-9.

Mifsud SA, Allen TJ, Bertram JF, Hulthen UL, Kelly DJ, Cooper ME, et al. Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia* 2001; 44:878-82.

Moczulski DK, Rogus JJ, Antonellis A, Warram JH, Krolewsky AS. Major susceptibility locus for nephropathy in type 1 diabetes mellitus on chromosome 3q: Results of novel discordant sib pair analysis. *Diabetes* 1998; 47:1164-9.

Mogensen, Andersen MJ. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 1973; 22:706-12.

Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310:356-60.

Mogensen CE, Schmitz A, Christensen CK. Comparative renal pathophysiology relevant to IDDM and NIDDM patients. *Diabetes Metab Rev* 1988; 4:453-83.

Monciotti CG, Semplicini A, Morocutti A, Maioli M, Cipollina MR, Barzon I, et al. Elevated sodium-lithium countertransport activity in erythrocytes is predictive of the development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetologia* 1997; 40:654-61.

Monkawa T, Hiromura K, Wolf G, Shankland SJ. The effect of transforming growth factor is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21 and p27. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1172-8.

Morgan DB, Stewart AD, Davidson C. Relations between erythrocyte lithium efflux, blood pressure and family histories of hypertension and cardiovascular disease: studies in a factory workforce and hypertension clinic. *J hypertens* 1986; 4:609-15.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131-4.

Nathan DM. Long-Term Complications Of Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328:1676-85.

Nelson RG, Kunzelman CL, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Knowler WC. Albuminuria in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Pima Indians. *Diabetologia* 1989; 32:870-6.

Oh JH, Ha H, Mi RY, Lee HB. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int* 1998; 54:1872-8.

Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J* 1966; 30:703-16.

Orchard TJ, Dorman JS, Maser RE, Becker DJ, Drash AL, Ellis D, et al. Prevalence of complications in IDDM by sex and duration. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study II. *Diabetes* 1990; 39:1116-24.

Osterby R, Gundersen HJ. Glomerular size and structure in diabetes mellitus I. Early abnormalities. *Diabetologia* 1975; 11:225-9.

Osterby R, Gundersen HJ, Nyberg G, Aurell M. Advanced diabetic glomerulopathy. Quantitative structural characterization of nonoccluded glomeruli. *Diabetes* 1987; 36:612-9.

Osterby R, Tapia J, Nyberg G, Tencer J, Willner J, Rippe B, et al. Renal structures in type 2 diabetic patients. *APMIS* 2001; 109:751-61.

Osterby R, Hartmann A, Nyengaard JR, Bangstad HJ. Development of renal structural lesions in type 1 diabetic patients with microalbuminuria Observations by light microscopy in 8-year follow-up biopsies. *Virchows Arch* 2002; 440:94-101.

Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99:342-8.

Parving HH, Smidt UM, Frisberg B, Bonnevie-Nielsen V, Andersen AR. A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin-dependent diabetes with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1981; 20:457-61.

Parving HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Christiansen JS, Andersen AR. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. *Acta Endocrinol* 1982; 100:550-5.

Parving HH, Smidt UM, Hommel E, Mathiesen ER, Rossing P, Nielsen F, et al. Effective antihypertensive treatment postpones renal insufficiency in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1993; 22:188-95.

Parving H, Mauer M, Ritz E. Diabetic Nephropathy, In Brenner and Rector's *The Kidney* 7th ed, edited by Brenner BM, Philadelphia, W.B. Saunders; 2004. p. 1777-818.

Pavan MV, Ghini B, Castro M, Lopes de Faria JB. Prevention of hypertension attenuates albuminuria and renal expression of fibronectin in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Am J Nephrol* 2003; 23:422-8.

Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non insulin-depedent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33:438-43.

Poliak K, Kato J, Solomon MJ, et al. p27^{kip1}, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22.

Potts JR, Campbell ID. Fibronectin Structure and Assembly. *Curr Cell Bio* 1994; 6: 648-55.

Potts JR, Campbell ID. Structure and Function of Fibronectin Modules. *Matrix Bio* 1996; 15:313-20.

Registro Brasileiro de Diálise, 1997. www.unifesp.br acesso em 09/07/2006.

Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 1990; 38:384-94.

Righetti AE, Boer-Lima P, Lopes de Faria JB. The presence of genetic hypertension stimulates early renal accumulation of fibronectin in experimental diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:2088-91.

Riser BL, Grondin JM, Cortes P, Patterson D, Narins RG. Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulates the secretion and activation of transforming growth factor beta 1 but not TGF β -2/TGF β -3. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:663.

Rossing P, Hommel E, Smidt UM, Parving H-H. Impact of arterial blood pressure and albuminuria on the progression of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes* 1993; 42:715-9.

Rumble JR, Gilbert RE, Cox A, Wu L, Cooper ME. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces the expression of transforming growth factor- β 1 and type IV collagen in diabetic vasculopathy. *J Hypertens* 1998; 16:1603-09.

Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad 7. *J Clin Invest* 2001; 108:807-16.

Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307:1-14.

Sequist E, Goets F, Rich S, Barbosa J. Familial Clustering of diabetic kidney disease: evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989; 320:1161-4.

Semplicini A, Mozzato MG, Sama B, Nosadini R, Fioretto P, Trevisan R, et al. Na^+/H^+ and Li^+/Na^+ exchange in red blood cells of normotensive and hypertensive patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Am J hypertens* 1989; 2:174-7.

Seyer-Hansen K, Hansen J, Gunderson HJG. Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study. *Diabetologia* 1980; 18:501-5.

Shankland SJ, Scholey JW. Expression of transforming growth factor- β 1 during diabetic renal hypertrophy *Kidney Int* 1994; 46:430-42.

Shankland SJ, Hugo C, Coats SR, Nangaku M, Pichler RH, Gordon KL, et al. Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50:1230-9.

Shankland SJ. Cell-cycle control and renal disease. *Kidney Int* 1997a; 52:294-308.

Shankland SJ, Pippin J, Flanagan M, Coats SR, Nangaku M, Gordon KL, et al. Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int* 1997b 51:1088-99.

Shankland SJ, Wolf G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278:F515-9.

Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with up regulation of TGF- β 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *AM J Physiol* 1994; 267:1094-101.

Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor- β as the key mediator. *Diabetes* 1995; 44:1139-46.

Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522-30.

Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnic BRC et al. Increased renal production of transforming growth factor- β 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 854-9.

Silveira LA, Bacchi CE, Pinto GA, Lopes de Faria JB. The genetics of hypertension modifies the renal cell replication response induced by experimental diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1529-34.

Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DE, Mauer SM. Epithelial cell foot process width in intact and uninephrectomized diabetic and nondiabetic rats. *Lab Invest* 1980; 43:225-30.

Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DE, Mauer SM. Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type I diabetes. *Diabetes* 1992; 41:679-84.

Steffes MW, Schmidt D, McCreary R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001; 59: 2104–13.

The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2003; 26:3160-7.

Thomsen OF, Andersen AR, Christiansen JS, Deckert T. Renal changes in type I (insulin-dependent) diabetic patients with and without clinical nephropathy: a light microscopic, morphometric study of autopsy material. *Diabetologia* 1984; 26:361-5.

Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 1998; 317:703-13.

Uneda S, Fujishima S, Fujiki Y, Tochikubo O, Oda H, Asahina S, et al. Renal haemodynamics and the rennin-angiotensin system in adolescents genetically predisposed to essential hypertension. *J Hypertens* 1984; 2:S437-S439.

U.S. Renal Data System: Annual Data Report USRDS. Atlas of end-stage renal disease in the United States, National Institute of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD. 2004; p74.

Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982; 1:1430-2.

Viberti GC, Keen H, Wiseman MJ. Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin dependent diabetics. *BMJ* 1987; 295:515-7.

Wahab NA, Weston BS, Roberts T, Mason RM. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2437-55.

Walker JD, Tariq T, Viberti GC. Sodium-lithium countertransport in red cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy and their parents. *BMJ* 1990; 301:635-8.

Warram JH, Gearin G, Laffel L, Krolewski AS. Effect of duration of type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:930-7.

Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Haring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces TGF- β 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. *Diabetologia* 2005; 45:890-8.

Weiss RH, Randour CJ. Attenuation of matrix protein secretion by anti-sense oligodeoxynucleotides to the cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. *Atherosclerosis* 2002; 161:105-12.

White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, Piras G, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 2002; 51:3083-9.

Wilson JL, Root HF, Marble A. Diabetic Nephropathy , a clinical syndrome. *N Engl J Med* 1951; 245: 513-7.

Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanism of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999; 56:393-405.

Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int* 1992; 42: 647-56.

Wolf G, Stahl RAK. Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLK-PC cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1}. *Kidney Int* 1996; 50:2112-9.

Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Thaiss F, Zahner G, Stahl RAK. High glucose stimulates expression of p27^{Kip1} in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol* 1997; 273: F348-F56.

Wolf G, Schroeder R, Thaiss F, Ziyadeh FN, Helmchem U, Stahl RA. Glomerular expression of p27kip1 in diabetic db/db mouse: Role of hyperglycemia. *Kidney Int* 1998; 53:869-79.

Wolf G, Wenzel U, Ziyadeh FN, Stahl RAK. Angiotensin converting-enzyme inhibitor treatment reduces glomerular p16^{INK4} and p27^{Kip1} expression in diabetic BBdp rats. *Diabetologia* 1999; 42:1425-32.

Wolf G, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, Shankland SJ. High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27^{kip1}, an inhibitor of a cyclin-dependent kinase. *Am J Pathol* 2001; 158:1091-100.

Wolf G, Schanze A, Stahl RA, Shankland SJ, Amann K. P27^{kip1} knockout mice are protected from diabetic nephropathy: Evidence for p27^{kip1} haplotype insufficiency. *Kidney Int* 2005a; 67:944-52.

Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the Periphery of the Glomerular Capillary Wall Toward the Center of Disease: Podocyte Injury Comes of Age in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2005b; 54:1626–34.

Woods JW, Falk RJ, Pittman AW, Klemmer PJ, Watson BS, Namboodiri K. Increased red cell sodium-lithium countertransport in normotensive sons of hypertensive patients. *N Engl J Med* 1982; 306: 593-5.

Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor- β 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1997; 51:1553-67.

Xu ZG, Yoo TH, Ryu DR, Cheon Park H, Ha SK, Han DS, et al. Angiotensin II receptor blocker inhibits p27Kip1 expression in glucose-stimulated podocytes and in diabetic glomeruli. *Kidney Int* 2005; 67:944-52.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:1814-8.

Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, et al. Expression of transforming growth factor- β isoforms in human glomerular disease. *Kidney Int* 1996; 49:461-9.

Yevdokimova N, Wahab NA, Mason RM. Thrombospondin-1 is the key activator of TGF- β 1 in human mesangial cells exposed to high glucose: *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:703-12.

Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995; 47:935-44.

Yokoyama H, Tomonaga O, Hirayama M, Ishii A, Takeda M, Babazono T, et al. Predictors of the progression of diabetic nephropathy and the beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in NIDDM patients. *Diabetologia* 1997; 40:405-11.

Zador IZ, Deshmukh GD, Kunkel R, Johnson K, Radin NS, Shayman JA. A role for glycosphingolipid accumulation in the renal hypertrophy of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 91:797-803.

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9:964-8.

Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor β . *J Clin Invest* 1994; 93:536-42.

Ziyadeh FN, Hoffman BH, Han DC, Iglesias-de la Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- β antibody in db/db diabetic mice. *PNAS* 2000; 97:8015-20.



8- APÊNDICES

10.1- Trabalho publicado:

Amazonas RB, Lopes de Faria JB. Effects of tight blood pressure control on glomerular hypertrophy in a model of genetic hypertension and experimental diabetes mellitus. Life Sciences 2006 (DOI: [10.1016/j.lfs.2006.07.008](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.07.008)).

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Life Sciences xx (2006) xxx–xxx

Life Sciences

www.elsevier.com/locate/lifescie

Effects of tight blood pressure control on glomerular hypertrophy in a model of genetic hypertension and experimental diabetes mellitus

Roberto Bleuel Amazonas, José B. Lopes de Faria *

Laboratory of Renal Pathophysiology, Nephrology Unit, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Received 30 March 2006; accepted 6 July 2006

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of prevention of hypertension on glomerular hypertrophy, renal cell replication and accumulation of glomerular fibronectin in a model of genetic hypertension and experimental diabetes. Four-week-old streptozotocin induced spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomized for no treatment, or for treatment with captopril, losartan or triple therapy (hydrochlorothiazide, reserpine and hydralazine) for 20 days. Increase in systolic blood pressure was equally prevented by captopril (118 ± 15 mmHg), losartan (111 ± 9) and triple therapy (112 ± 14 , $p < 0.0001$). Glomerular size was higher ($p < 0.005$) in diabetic SHR ($27,300 \pm 2130 \mu\text{m}^2$) compared with non-diabetic SHR ($23,800 \pm 307$). The antihypertensive therapy with captopril ($23,900 \pm 175$), losartan ($23,800 \pm 120$), and triple therapy ($23,400 \pm 210$) prevented the glomerular enlargement in diabetic SHR. Glomerular expression of fibronectin was increased in diabetic SHR (7.61 ± 1.22 densitometric unit) as compared to the controls (2.27 ± 2.15 , $p < 0.0001$), and was decreased ($p < 0.0001$ vs diabetic SHR) with captopril (2.49 ± 1.42), losartan (1.57 ± 1.1) and triple therapy (2.04 ± 1.42). The number of replicating glomerular cell significantly decreased in diabetic SHR and it was restored by all three antihypertensive regimes. The glomerular expression of p27^{Kip1} was increased in diabetic SHR but it was not modified by antihypertensive treatment. Strict blood pressure control, in diabetic SHR independently of the class of antihypertensive agent, restores glomerular hypertrophy and renal cellular replication, and prevents the increment in glomerular fibronectin.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Angiotensin antagonist; Angiotensin-converting enzyme inhibitor; Cell hypertrophy; Cell replication; Diabetes mellitus; Diabetic nephropathy; Fibronectin; Hypertension

Introduction

Glomerular enlargement is an early abnormality observed both in humans (Osterby and Gundersen, 1975) and in animal models of diabetic renal disease (Wolf and Ziyadeh, 1999). The mechanisms underlying the development of diabetic glomerular hypertrophy have not been fully established, but involve the accumulation of extracellular matrix proteins and the hypertrophy of growth-arrested glomerular cells (Mason and Wahab, 2003; Shankland and Wolf, 2000). In mesangial cells these abnormalities seem to be mediated by an elevation in the expression of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitors such as

p27^{Kip1} and p21^{Cip1} (Al-Douhji et al., 1999; Wolf et al., 1997; Wolf et al., 1998). It has been shown that the administration of an ACE inhibitor to diabetic Bdp rats reduces renal hypertrophy and p27^{Kip1} expression (Wolf et al., 1999). The effects of hyperglycemia on cell-cycle inhibitors, cell hypertrophy and extracellular matrix deposition are mainly mediated by transforming growth factor β (TGF- β), an antiproliferative and hypertrophic cytokine (Sharma and Ziyadeh, 1994; Polyak et al., 1994; Monkawa et al., 2002).

The use of spontaneously hypertensive rats (SHR), widely utilized as an animal model of human essential hypertension (Okamoto et al., 1966), rendered diabetic with streptozotocin has significantly contributed to the understanding of the mechanism of interaction between genetic hypertension and diabetes in the development and progression of renal disease (Cooper et al., 1988b). Several years ago, it was shown that the severity of renal lesions in diabetic SHR is much more pronounced than in their

* Corresponding author. Division of Nephrology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 37887499; fax: +55 19 37887366.

E-mail address: jblfaria@fcm.unicamp.br (J.B. Lopes de Faria).

diabetic genetically normotensive controls, Wistar Kyoto (WKY) rats (Cooper et al., 1988a). Recently, we have demonstrated that the induction of diabetes in young, still normotensive, SHR rats promotes renal hypertrophy and reduces renal cell replication associated with an increase in a Cdk inhibitor p27^{Kip1} (Silveira et al., 2002). In addition, diabetic SHR rats display an early accumulation of renal fibronectin, an extracellular matrix protein involved in the development of renal glomerulosclerosis (Righetti et al., 2001). In the diabetic SHR, long-term blood pressure control with drugs, irrespective of interference in the renin–angiotensin-system (RAS), is able to reduce the elevated albuminuria and over-expression of fibronectin in the kidney (Pavan et al., 2003; Lehfeld et al., 2004). The effect of prevention of hypertension on the alterations in renal cell replication in diabetic SHR is unknown. In this study, our aim was to assess whether the prevention of development of hypertension in diabetic SHR with or without drugs affecting RAS, is able to impede glomerular hypertrophy, and to correct early abnormalities in renal cell replication and accumulation of renal fibronectin.

Material and methods

Study design

The protocol for this study complied with the guidelines established by The Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation. SHR derived from rats supplied by Taconic (Germantown, NY) and bred in our animal facility were used in this study. Experimental diabetes was induced in four-week-old, pre-hypertensive male SHR by injecting streptozotocin (STZ; 60 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO) dissolved in sodium citrate buffer (pH 4.5) via a tail vein after an overnight fast. Control rats (SC) received only vehicle (citrate buffer). The diabetic rats were randomly assigned to receive no treatment (SD), or captopril (Bristol-Meyers Squibb Brazil S/A, São Paulo, Brazil) at a dose of 300 mg/l (Cap), losartan (Merck Sharp and Dohme Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brazil) at 200 mg/l (Los), or triple therapy consisting of hydralazine (Sigma) at 150 mg/l, reserpine (Sigma) at 4 mg/l, and hydrochlorothiazide (Sigma) at 50 mg/l (Tri), all administered in the drinking water. The doses of antihypertensive drugs used were chosen based on previous studies that have shown that they were able to normalize the blood pressure to a level similar to that of genetically normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats of the same age (Pavan et al., 2003; Lehfeld et al., 2004). Based on the volume of water ingested over 24 h, the daily doses of antihypertensive drugs were: captopril 100 mg/kg, losartan 67 mg/kg, hydralazine 50 mg/kg, reserpine 1.3 mg/kg and hydrochlorothiazide 17 mg/kg. All of the rats were housed in groups of four and were fed normal rat chow containing 20% protein.

Parameters determined

Blood glucose levels were measured using an enzymatic colorimetric GOD-PAP assay (Merck, Darmstadt, Germany)

72 h after the injection of STZ or citrate buffer and on the day before killing the rats. Values >15 mmol/l were considered diabetic for these experiments. Systolic blood pressure was obtained by tail-cuff plethysmography in unanesthetized rats using an MK III physiograph (Narco Bio-System, Houston, TX). The albumin excretion rate was determined by single radial immunodiffusion in urine collected from rats placed in individual metabolic cages for 24 h, as previously described (Righetti et al., 2001; Pavan et al., 2003; Lehfeld et al., 2004). The expression of glomerular fibronectin, p27^{Kip1}, p21^{Cip1} and of receptor II for transforming growth factor β (TGF- β II) were determined in rat isolated glomeruli and fibronectin was also determined by immunofluorescence 20 days after the induction of diabetes.

Isolation of glomeruli

Glomeruli were isolated by a differential sieving technique (Krakower and Greenspoon, 1954) as previously described by our laboratory (Silveira et al., 2002). Briefly, rats were anesthetized, and the kidneys were immediately removed, weighed, and placed in ice-cold Hank's balanced salt solution (Gibco, Grand Island, NY). The cortices were isolated and finely minced. The pooled material of three to four rats was passed through stainless steel screens (W. Tyler, Mentor, OH) of 60 (pore size 250 μ m) and 150 (pore size 106 μ m) mesh, and the glomeruli were collected on a 200-mesh screen (pore size 63 μ m). The final preparations contained >95% glomeruli as assessed by phase-contrast microscopy. Isolated glomeruli were lysed directly on ice in 300 μ l of a buffer containing 2% SDS and 60 mmol Tris-HCl (pH 6.8) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (complete: contains antipain-HCl, chymostatin, leupeptin, bestatin, pepstatin, phosphoramidon, aprotinin, and EDTA; Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) (Silveira et al., 2002). After centrifugation, the supernatants were transferred to new tubes and the protein concentrations were measured by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

Immunofluorescence

The right kidney was perfused in vivo initially with saline followed by a fixative solution of Methacarn and embedded in paraffin for fibronectin study (Righetti et al., 2001). Five micrometer sections were deparaffinized, washed in PBS (pH 7.4) and placed in 5% nonfat milk in PBS. Tissue sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-rat fibronectin antibody (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA) and with FITC-conjugated anti-rabbit antibody. Immunoreactivity was assessed using a Zeiss fluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The intensity of staining in each glomerulus was scored as: 0— no fluorescence, 1— trace fluorescence, 2— light fluorescence, 3— moderate fluorescence, 4— intense fluorescence (Bao et al., 2003). Fifty glomeruli per section were counted by an observer who was unaware of the study group from which the section was derived.

Table 1

Systolic blood pressure (SBP), body weight, kidney weight, kidney-to-body weight ratio (kidney/BW), glycemia, albuminuria and glomerular area in the groups of rats studied

Groups	SBP (mmHg)		Body weight (g)		Kidney	Kidney/BW	Glycemia	Albuminuria	Glomerular area
	Basal	20 days	Basal	20 days	weight (g)	x100	(mmol/l)	(μ g/24 h)	(μ m ²)
SC (N=24)	118 $\pm$ 10	155 $\pm$ 12	75 $\pm$ 9	168 $\pm$ 18	0.68 $\pm$ 0.12	0.42 $\pm$ 0.04	6.5 $\pm$ 1.5	186(57–717)	23,800 $\pm$ 307
SD (N=30)	119 $\pm$ 14	147 $\pm$ 14 ^b	76 $\pm$ 11	108 $\pm$ 28 ^a	0.66 $\pm$ 0.12	0.63 $\pm$ 0.06 ^a	28.5 $\pm$ 4.0 ^a	400(111–501) ^a	27,330 $\pm$ 2,130 ^{a,b}
TRI (N=19)	119 $\pm$ 7	113 $\pm$ 9	78 $\pm$ 12	97 $\pm$ 16	0.60 $\pm$ 0.15	0.62 $\pm$ 0.08	29.0 $\pm$ 4.8	171(62–381)	23,930 $\pm$ 175
CAP (N=25)	119 $\pm$ 9	115 $\pm$ 16	76 $\pm$ 7	104 $\pm$ 24	0.72 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.95	28.1 $\pm$ 6.6	210(68–449)	23,860 $\pm$ 120
LOS (N=20)	116 $\pm$ 15	108 $\pm$ 12	74 $\pm$ 12	106 $\pm$ 23	0.70 $\pm$ 0.13	0.69 $\pm$ 0.15	28.9 $\pm$ 5.6	190(70–543)	23,400 $\pm$ 210

Control SHR (SC), diabetic SHR (SD), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) or captopril (CAP) or losartan (LOS). ^a*p* < 0.05 for SD vs ^aSC and ^bthe treated groups. The results are the mean $\pm$ SD, except for albuminuria, which is expressed as the geometric mean (range).

Immunohistochemistry

To detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA), sections were deparaffinized and rehydrated (Silveira et al., 2002). Endogenous peroxidase was blocked by incubating the slides in 3% H₂O₂ for 5 min. The sections were then incubated at room temperature for 1 h with primary antibody PC10 (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:150. Biotinylated mouse anti-human (Dako) antibody for PC10 were applied for 1 h at room temperature. The slides were then incubated with avidin–biotin complex (ABC) reagent (Vector, Burlingame, CA) for 30 min followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma) as a substrate–chromogen solution. After counterstaining with hematoxylin and dehydration, the slides were mounted in Entellan (Merck). Negative controls for the reaction consisted of omitting the primary antibody. Positive cells were counted in 50 glomeruli per section; for the tubulointerstitial area, the positive cells in 20 high power fields were counted by an observer who was unaware of the

study group from which the section was derived. At least three kidney sections for each rat were included in the different experiments.

Morphology

Periodic acid-Schiff (PAS)-stained slides were observed using a Leica DMLS (Leica, Bensheim, Germany) microscope. All glomeruli were imaged using a x1000 magnification. A total of 20 glomeruli from the outer cortex at the vascular pole were digitized at random for each rat using a digital camera Canon Power Shot S60 (Canon Inc., Japan) connected to the microscope. Recording and analysis of the digital images were performed with fixed settings. Image analysis and morphometric measurement of glomerular area were done by manually tracing the perimeter of the capillary tuft cut in transverse section using public domain ImageJ software (National Institutes of Health available at <http://rsb.info.nih.gov/ij>) software package.

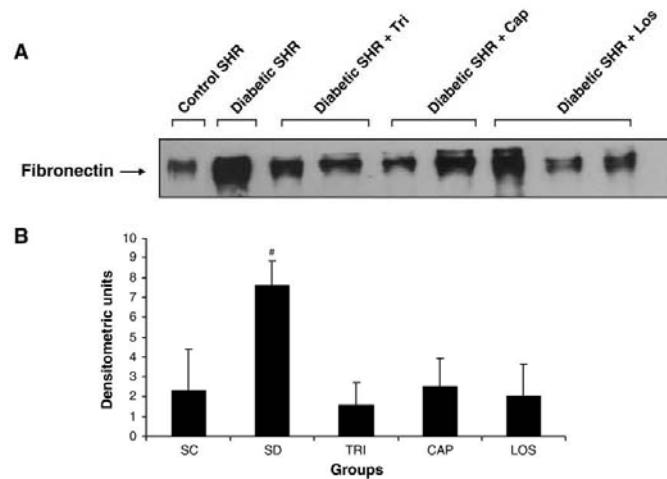


Fig. 1. Fibronectin protein levels in SHR kidneys. A. Western blot of fibronectin in glomerular lysates. In the experiment shown, 20 μ g of glomerular lysate from control SHR (SC) (*n*=4), diabetic SHR (SD) (*n*=4), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) (*n*=3), captopril (CAP) (*n*=4) or losartan (LOS) (*n*=4) was used. Each lane represents a pool of glomeruli from 3–4 rats. B. Densitometric analysis of renal fibronectin protein levels. The columns represent the mean $\pm$ SD. ^a*p* < 0.005 compared to all other groups.

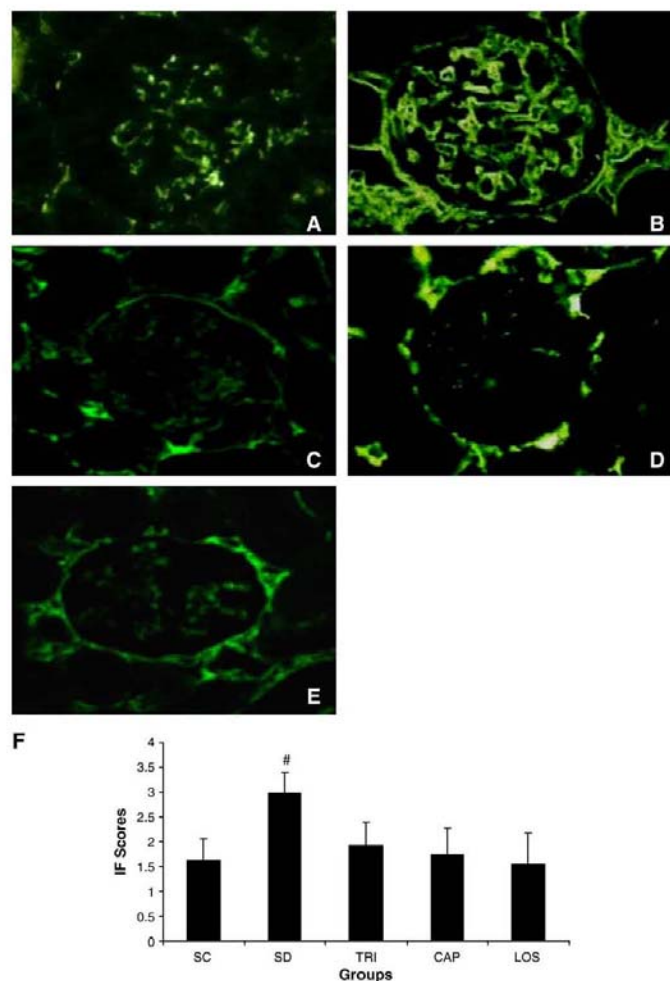


Fig. 2. Immunofluorescence of renal fibronectin in SHR. Immunoreactive fibronectin was detected in the glomeruli of control SHR (SC) ($n=4$) (A), diabetic SHR (SD) ($n=4$) (B), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) ($n=3$) (C), captopril (CAP) ($n=4$) (D) or losartan (LOS) ($n=4$) (E). Panel (F) shows the intensity of fluorescence (determined as described in Methods) for fibronectin in control SHR (SC), diabetic SHR (SD), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI), captopril (CAP) or losartan (LOS). $^{\#}p<0.005$ compared to all other groups.

Western blotting

To assess the expression of fibronectin, p27^{Kip1}, p21^{Cip1} and TGF- β IIR by Western blotting, 20–80 μ g of pooled proteins in 5% glycerol/0.03% bromophenol blue/10 mmol dithiothreitol was loaded onto 8% and 15% SDS polyacrylamide gels (the gel concentration used depended on the molecular mass of the protein investigated). Molecular mass markers (Rainbow; Amersham Biosciences) were used as standards. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) in transfer buffer (50 mmol Tris-HCl, pH 7.0, 380 mmol glycine, 0.1% SDS, and 20% methanol). Non-specific binding was blocked by incubating the membranes overnight at 4 °C in 5% nonfat milk for

fibronectin, 1% BSA (Sigma) for p27^{Kip1} and p21^{Cip1} or 1% gelatin for TGF- β IIR, all in PBS with 0.1% Tween 20. For the detection of specific proteins the following primary antibodies were used: a goat anti-rat fibronectin antibody (Calbiochem), a mouse monoclonal anti-p27^{Kip1} antibody (Transduction Laboratories, Lexington, KY), a mouse monoclonal anti-human p21^{Cip1} antibody that cross-reacts with the murine protein (Dako) (Silveira et al., 2002) and a goat polyclonal anti-TGF- β IIR (R&D systems, Minneapolis, MN). The antibodies were used at a dilution of 1:3000 for fibronectin and 1:1000 for p27^{Kip1}, p21^{Cip1} and TGF- β IIR, and were incubated with the membranes for 1 h at room temperature. The blots were subsequently washed in Tris-buffered saline with Tween and incubated with an anti-goat

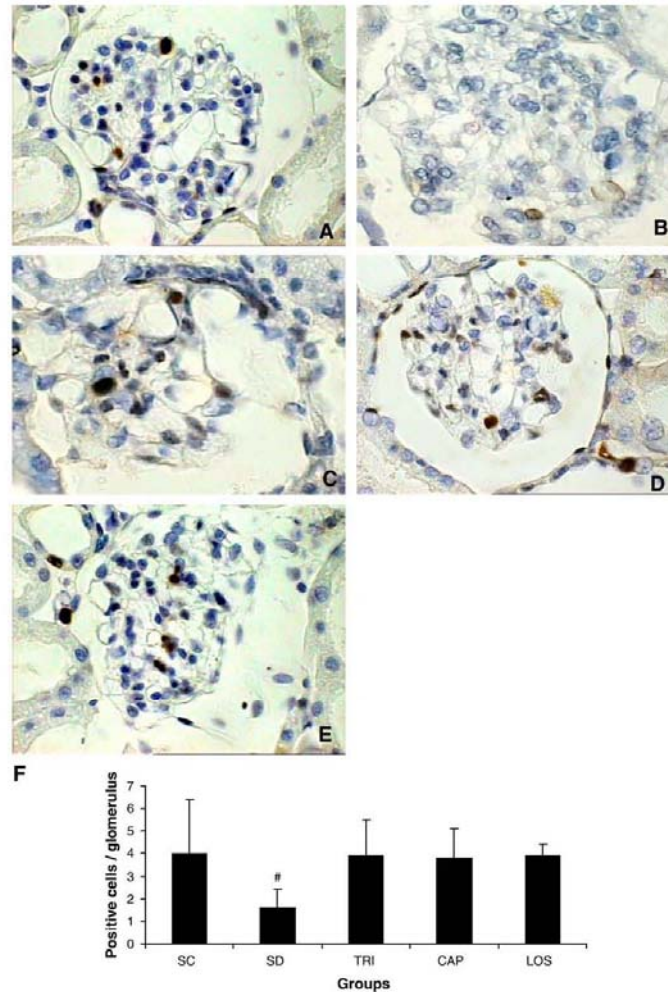


Fig. 3. Immunohistochemical identification of PC10-positive cells in renal sections. Replicating renal cells that reacted with PC10 antibody (PCNA) were detected in control SHR (SC) ($n=6$) (A), diabetic SHR (SD) ($n=5$) (B), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) ($n=3$) (C), captopril (CAP) ($n=4$) (D) or losartan (LOS) ($n=4$) (E). The number of proliferating cells per glomerular cross-section is shown in F. Positive cells were counted in 50 glomeruli in each group. The columns represent the mean $\pm$ SD. # $p < 0.05$ compared to the SC group.

horseradish peroxidase-conjugated (Santa Cruz) for fibronectin and TGF- β IIR or an anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated (New England Biolabs, Beverly, MA) for p27^{Kip1} and p21^{Cip1} as secondary antibodies. Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence method (Super Signal CL-HRP Substrate System; Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol. The positive control for p27^{Kip1} was a lysate of HeLa cells, an epithelial-like adenocarcinoma line (Transduction), and for p21^{Cip1}, the control was a full-length p21^{Cip1} of mouse origin (Santa Cruz). Exposed films were scanned with a laser densitometer (Bio-Rad) and analyzed quantitatively with Multi-Analyst Macintosh Software for Image

Analysis Systems (Bio-Rad). Equal loading of proteins was ascertained by Ponceau S staining.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SD except for the albumin excretion rate, which was expressed as the geometric mean and ranges and analyzed after logarithmic transformation. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least-significant difference test was used to assess differences among the groups. All comparisons were done using the Statview statistical Package software (Power PC version

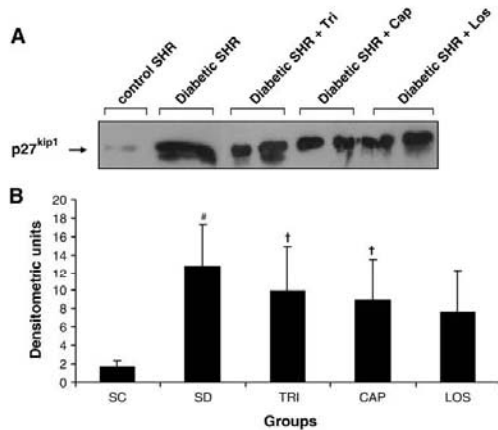


Fig. 4. p27^{kip1} protein levels in SHR kidneys. A. Western blot of p27^{kip1} in glomerular lysates. In the experiment shown, 30 μ g of glomerular lysate from control SHR (SC) ($n=4$), diabetic SHR (SD) ($n=4$), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) ($n=3$), captopril (CAP) ($n=5$) or losartan (LOS) ($n=3$) was used. Each lane represents a pool of glomeruli from 3–4 rats. B. Densitometric analysis of renal p27^{kip1} protein levels. The columns represent the mean $\pm$ SD. [#] $p=0.008$ compared to the SC group, [†] $p<0.05$ compared to the SC group.

5.0; Statview, Berkeley, CA). A value of $p<0.05$ indicated significance.

Results

Systolic blood pressure rose similarly in untreated SHR and this rise was completely and equally prevented in rats treated with triple therapy, captopril or losartan. Body weight gain was reduced and kidney-to-body weight ratio increased significantly in diabetic rats and were unaffected by treatment with antihypertensive drugs. The blood glucose level was higher in all diabetic groups and was not modified by the antihypertensive drugs. The albumin excretion rate was significantly higher in diabetic rats and all antihypertensive therapies significantly reduced this excretion to the levels seen in control rats (Table 1).

Tight blood pressure control forestalled the elevation in fibronectin expression induced by diabetes in SHR

Twenty days after the induction of diabetes mellitus, the expression of glomerular fibronectin was estimated semiquantitatively by immunofluorescence and in a more quantitative manner by Western blot followed by densitometric analyses. Both methods yielded similar results that were higher expression of glomerular fibronectin in diabetic SHR group. This abnormality was prevented to similar extents by the antihypertensive treatments, although there was some variation between individual rats (Figs. 1 and 2).

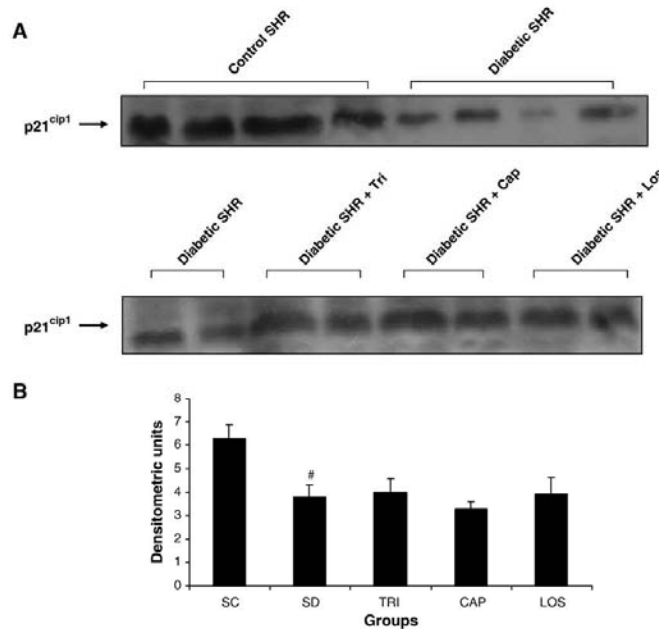


Fig. 5. p21^{cip1} protein levels in SHR kidneys. A. Western blot of p21^{cip1} in glomerular lysates. In the experiment shown, 60 μ g of glomerular lysate from control SHR (SC) ($n=3$), diabetic SHR (SD) ($n=5$), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) ($n=3$), captopril (CAP) ($n=3$) or losartan (LOS) ($n=3$) was used. Each lane represents a pool of glomeruli from 3–4 rats. B. Densitometric analysis of renal p21^{cip1} protein levels. The columns represent the mean $\pm$ SD. [#] $p<0.005$ compared to the SC group.

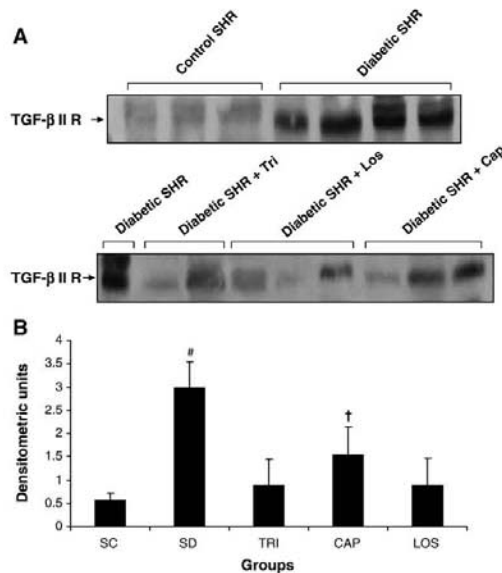


Fig. 6. Renal TGF- β IIR protein levels in SHR kidneys. A. Western blot of TGF- β IIR in glomerular lysates. In the experiment shown, 80 μ g of glomerular lysate from control SHR (SC) ($n=3$), diabetic SHR (SD) ($n=5$), and diabetic SHR treated with triple therapy (TRI) ($n=3$), captopril (CAP) ($n=3$) or losartan (LOS) ($n=3$) was used. Each lane represents a pool of glomeruli from 3–4 rats. B. Densitometric analysis of renal TGF- β IIR protein levels. The columns represent the mean $\pm$ SD. [#] $p < 0.008$ compared to all other groups, [†] $p = 0.01$ compared to SC group.

The reduction in renal cell replication induced by diabetes is prevented by tight blood pressure control

As previously described (Silveira et al., 2002), diabetes markedly reduced renal cell replication. However, antihypertensive therapy restored the number of replicating glomerular cells to a level similar to that of the control group (Fig. 3), whereas cell replication in the tubulointerstitial region was unaffected by such therapy (data not shown). To investigate the potential role of cell-cycle regulatory proteins in the decreased glomerular cell replication seen in diabetic rats, we examined the expression of two cyclin-dependent kinase inhibitors, p27^{Kip1} and p21^{Cip1}. In freshly isolated glomeruli, the expression of p27^{Kip1} as detected by Western blotting was significantly higher in diabetic rats and antihypertensive treatment partially restored the expression of p27^{Kip1} (Fig. 4). The expression of p21^{Cip1} decreased in diabetic rats and was unaffected by antihypertensive treatment (Fig. 5).

Glomerular hypertrophy is restored by antihypertensive treatment

Since a decrease in glomerular cell replication is associated with glomerular hypertrophy (Shankland and Wolf, 2000), the glomerular tuft area was calculated as a measure of glomerular size. Morphometric analysis showed that diabetes mellitus pro-

duced glomerular hypertrophy that was prevented by normalization of the blood pressure (Table 1).

Up-regulation of renal expression of the TGF- β II receptor is inhibited by antihypertensive treatment

To investigate whether the pro-fibrotic and antiproliferative TGF- β system was associated with the increased glomerular expression of fibronectin, the decreased renal cell replication and the glomerular hypertrophy, the expression of its type II receptor (TGF- β IIR) was evaluated. Western blotting showed that the expression of TGF- β IIR was significantly elevated in diabetic rats and that this expression was normalized by the antihypertensive treatment (Fig. 6). These findings suggested that TGF- β system may be involved in the elevated expression of glomerular fibronectin and in the reduced renal cell replication produced by diabetes.

Discussion

Antihypertensive agents may be effective for the primary prevention of diabetic nephropathy, i.e. in patients with normoalbuminuria. In United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), a reduction of systolic blood pressure from 154 to 144 mmHg in type 2 diabetic patients reduced the risk for the development of microalbuminuria by 29% (Anonymous, 1998). In the present study, we assessed the efficacy of prevention of development of hypertension on early renal abnormalities in streptozotocin induced diabetic rats destined to become hypertensive (SHR). We have demonstrated that strict maintenance of blood pressure in diabetic SHR to the levels observed at pre-hypertensive stage (4-week of age) leads to the prevention of albuminuria, glomerular hypertrophy and cell-cycle arrest, increased accumulation of fibronectin and TGF- β IIR expression that were observed in untreated diabetic SHR.

In diabetes mellitus mesangial expansion is a hallmark of nephropathy (Mason and Wahab, 2003). It has been shown that this abnormality is a result of decrease in renal cell proliferation with consequent accumulation of extracellular matrix proteins such as fibronectin and glomerular hypertrophy (Sharma et al., 1996; Ziyadeh et al., 2000). We also observed that the beneficial effect of prevention of hypertension was independent of the class of antihypertensive drugs. These findings underline the importance of tight blood pressure control as a primary prevention of diabetic nephropathy.

Previously, we showed that the prevention of hypertension blunted the elevation of albuminuria and the renal expression of fibronectin after a longer period of hyperglycemia (16-week) (Pavan et al., 2003). Novelty of the present study is the effect of tight blood pressure control on early renal abnormalities, particularly the modulation of renal cell replication that to our knowledge has not been shown before.

Glomerular enlargement occurs early after the onset of diabetes mellitus and precedes the development of glomerulosclerosis (Hirose et al., 1982). Antihypertensive therapy with or without blockade of RAS could prevent glomerular enlargement (Cooper et al., 1990). This effect is probably mediated by a

reduction of glomerular capillary pressure to normal, since mechanical stretch in mesangial and endothelial cells activates growth processes (Gruden et al., 1999). The growth stimulatory effects of increased intra-renal angiotensin II on glomerular cells may also mediate the glomerular enlargement, since the angiotensin II is enhanced in the diabetic milieu (Allen et al., 1997; Cooper et al., 2005). Based on this last observation, prevention of glomerular hypertrophy should be more efficient when drugs that block the RAS are used. In the present study, prevention of glomerular hypertrophy and arrest in glomerular cell growth were obtained with tight blood pressure control independently of the class of antihypertensive agents used. One possible explanation for this fact is that the blood pressure levels obtained in our treated rats are much lower (systolic blood pressure below 120 mmHg) than in other studies (Cooper et al., 1990; Cooper et al., 1992).

Although the biological significances of changes in TGF- β IIR expression in the kidney remains undefined, a number of studies suggested that TGF- β 1 plays a central role in the pathogenesis of diabetic nephropathy (Sharma and Ziyadeh, 1995). TGF- β 1 exerts biological effects by interacting with specific cell-surface receptors including a type I and a type II receptor (Massague, 1990). In the present study we focus on the type II receptor because it is the primary signaling receptor that binds the free ligand. The type I receptor does not directly bind the free ligand, and it is best described as transducer (Massague, 1992). Although up-regulation could be a consequence of decrease in the concentration of the TGF- β 1 ligand (Ziyadeh et al., 1998), this is unlikely since it has been shown that both glucose and mechanical strain increase TGF- β receptor expression in cultured mesangial cells and that increased expression is accompanied by increased ligand binding (Riser et al., 1999).

Renoprotective effect of prevention of development of hypertension was observed in spite of very high (>28 mmol/l) levels of blood glucose in treated diabetic SHR. This finding indicates that hypertension and high blood glucose may act through a common mediator to promote renal lesion in this animal model of diabetes and genetic hypertension. Identification of this common mediator was not an objective of the present study, however the TGF- β system may be a good candidate. To this end, it was demonstrated that in diabetic rats normalization of blood glucose level, or a non-glycemic intervention such as the use of ACEi, ARB or their combination could normalize the expression of TGF- β receptor (Cao et al., 2001; Kang et al., 2000). In our diabetic SHR, tight blood pressure control prevented the increase in glomerular fibronectin deposition probably by blocking the expression of TGF- β RII however other mechanism can not be excluded (Hill et al., 2001; Isono et al., 2000). Since enhanced TGF- β expression can reduce glomerular cell replication and induce glomerular hypertrophy (Monkawa et al., 2002; Wolf et al., 1992; Sharma et al., 1996), the prevention of elevation of TGF- β RII expression by antihypertensive therapy might have contributed to the correction of these abnormalities.

In summary we have demonstrated that in diabetic SHR, a model of genetic hypertension and diabetes, antihypertensive treatment independently of the class of antihypertensive agent is

able to correct two early abnormalities involved in mesangial expansion, decreased renal cell proliferation and increased accumulation of extracellular matrix. Tight and precocious blood pressure control may be an efficient maneuver to prevent the development of mesangial expansion in diabetic individuals with predisposition to hypertension.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo). Roberto Bleuel Amazonas was on receipt of a scholarship from FAPESP. We are grateful to Dr. Kléber Franchini for helping with the perfusion of the kidney. We thank Dr. Jacqueline M. Lopes de Faria for the helpful suggestions. We also thank Sérgio Magalhães for the technical assistance, and Stephen Hyslop and Subrata Biswas for editing the manuscript.

References

- Al-Douhji, M., Brugarolas, J., Brown, P.A.J., Stehman-Breen, C.O., Alpers, C.E., Shankland, S.J., 1999. The cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} is required for glomerular hypertrophy in experimental diabetic nephropathy. *Kidney International* 56 (5), 1691–1699.
- Allen, T.J., Cao, Z., Youssef, S., Hulthen, U.L., Cooper, M.E., 1997. Role of angiotensin II and bradykinin in experimental diabetic nephropathy. *Functional and Structural Studies Diabetes* 46 (10), 1612–1618.
- Anonymous, 1998. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *British Medical Journal* 317 (7160), 703–713.
- Bao, L., Zhou, J., Holers, V.M., Quigg, R.J., 2003. Excessive matrix accumulation in the kidneys of MRL/lpr lupus mice is dependent on complement activation. *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (10), 2516–2525.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2), 248–254.
- Cao, Z., Bonnet, F., Davis, B., Allen, T.J., Cooper, M.E., 2001. Additive hypotensive and anti-albuminuric effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor antagonism in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science (London)* 100 (6), 591–599.
- Cooper, M.E., Allen, T.J., Macmillan, P., Bach, L., Jerums, G., Doyle, A.E., 1988a. Genetic hypertension accelerates nephropathy in the streptozotocin diabetic rat. *American Journal of Hypertension* 1 (1), 5–10.
- Cooper, M.E., Allen, T.J., O'Brien, R.C., Macmillan, P.A., Clarke, B., Jerums, G., Doyle, A.E., 1988b. Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat-functional and structural characteristics. *Journal of Hypertension* 6 (12), 1009–1016.
- Cooper, M.E., Allen, T.J., O'Brien, R.C., Papazoglou, D., Clarke, B.E., Jerums, G., Doyle, A.E., 1990. Nephropathy in model combining genetic hypertension with experimental diabetes. Enalapril versus hydralazine and metoprolol therapy. *Diabetes* 39 (12), 1575–1579.
- Cooper, M.E., Rumble, J.R., Allen, T.J., O'Brien, R.C., Jerums, G., Doyle, A.E., 1992. Antihypertensive therapy in a model combining spontaneous hypertension with diabetes. *Kidney International* 41 (4), 898–903.
- Cooper, M.E., Jandeleit-Dahm, K., Thomas, M.C., 2005. Targets to retard the progression of diabetic nephropathy. *Kidney International* 68 (4), 1439–1445.
- Gruden, G., Thomas, S., Burt, D., Zhou, W., Chusney, G., Gnudi, L., Viberti, G., 1999. Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 10 (4), 730–737.
- Hill, C., Logan, A., Smith, C., Gronback, H., Flyvbjerg, A., 2001. Angiotensin converting enzyme inhibitor suppresses glomerular transforming growth

- factor beta receptor expression in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 44 (4), 495–500.
- Hirose, K., Osterby, R., Nozawa, M., Gundersen, H.J., 1982. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes mellitus in the rat. *Kidney International* 21 (5), 689–695.
- Isono, M., Mogyrosi, A., Han, D.C., Hoffman, B.B., Ziyadeh, F.N., 2000. Stimulation of TGF-beta type II receptor by high glucose in mouse mesangial cells and in diabetic kidney. *American Journal of Physiology. Renal, Fluid and Electrolyte Physiology* 278 (5), F830–F838.
- Kang, M.J., Ingram, A., Ly, H., Thai, K., Scholey, J.W., 2000. Effects of diabetes and hypertension on glomerular transforming growth factor-beta receptor expression. *Kidney International* 58 (4), 1677–1685.
- Krakower, C.A., Greenspoon, S.A., 1954. Factors leading to variation in concentration of nephrotoxic antigen(s) of glomerular basement membrane. *Archives of Pathology* 58 (5), 401–432.
- Lehfeld, L.S., Silveira, L.A., Ghini, B., Lopes de Faria, J.B., 2004. Early blood pressure normalization independent of the class of the antihypertensive agent prevents augmented renal fibronectin and albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Kidney and Blood Pressure Research* 27 (2), 114–120.
- Mason, R.M., Wahab, N.A., 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (5), 1358–1373.
- Massague, J., 1990. The transforming growth factor- β family. *Annual Review of Cell Biology* 6, 597–641.
- Massague, J., 1992. Receptors for the TGF β family. *Cell* 69 (7), 1067–1070.
- Monkawa, T., Hiromura, K., Gunter, W., Shankland, S., 2002. The hypertrophic effect of transforming growth factor- β is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21 and p27. *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (5), 1172–1178.
- Okamoto, K., Tabei, R., Fukushima, M., Nosaka, S., Yamori, Y., 1966. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 30 (6), 703–716.
- Osterby, R., Gundersen, H.J., 1975. Glomerular size and structure in diabetes mellitus I. Early abnormalities. *Diabetologia* 11 (3), 225–229.
- Pavan, M.V., Ghini, B., Castro, M., Lopes de Faria, J.B., 2003. Prevention of hypertension attenuates albuminuria and renal expression of fibronectin in diabetic spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Nephrology* 23 (6), 422–428.
- Polyak, K., Kato, J., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., Koff, A., 1994. p27^{Kip1}, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes and Development* 8 (1), 9–22.
- Righetti, A.E., Boer-Lima, P., Lopes de Faria, J.B., 2001. The presence of genetic hypertension stimulates early renal accumulation of fibronectin in experimental diabetes. *Diabetologia* 44 (11), 2088–2091.
- Riser, B.L., Ladson-Wofford, S., Sharba, A., Cortes, P., Drake, K., Guerin, C.J., Yee, J., Choi, M.E., Segarini, P.R., Narins, R.G., 1999. TGF β receptor expression and binding in rat mesangial cell: modulation by high glucose and cyclic mechanical strain. *Kidney International* 56 (2), 428–439.
- Shankland, S.J., Wolf, G., 2000. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *American Journal of Physiology* 278 (4), F515–F529.
- Sharma, K., Ziyadeh, F.N., 1994. Renal hypertrophy is associated with up regulation of TGF- β 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *American Journal of Physiology* 267 (6), 1094–1101.
- Sharma, K., Ziyadeh, F.N., 1995. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 44 (10), 1139–1146.
- Sharma, K., Jin, Y., Guo, J., Ziyadeh, F.N., 1996. Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45 (4), 522–530.
- Silveira, L.A., Bacchi, C.E., Pinto, G.A., Lopes de Faria, J.B., 2002. The genetics of hypertension modifies the renal cell replication response induced by experimental diabetes. *Diabetes* 51 (5), 1529–1534.
- Wolf, G., Ziyadeh, F.N., 1999. Molecular mechanism of diabetic renal hypertrophy. *Kidney International* 56 (2), 393–405.
- Wolf, G., Sharma, K., Chen, Y., Ericksen, M., Ziyadeh, F.N., 1992. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney International* 42 (3), 647–656.
- Wolf, G., Schroeder, R., Ziyadeh, F.N., Thaiss, F., Zahner, G., Stahl, R.A.K., 1997. High glucose stimulates expression of p27^{Kip1} in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *American Journal of Physiology* 273 (3), F348–F356.
- Wolf, G., Schroeder, R., Thaiss, F., Ziyadeh, F.N., Helmchen, U., Stahl, R.A.K., 1998. Glomerular expression of p27^{Kip1} in diabetic *db/db* mouse: role of hyperglycemia. *Kidney International* 53 (4), 869–879.
- Wolf, G., Wenzel, U., Ziyadeh, F.N., Stahl, R.A.K., 1999. Angiotensin converting-enzyme inhibitor treatment reduces glomerular p16^{INK4} and p27^{Kip1} expression in diabetic BBdp rats. *Diabetologia* 42 (12), 1425–1432.
- Ziyadeh, F.N., Han, D.C., Cohen, J.A., Guo, J., Cohen, M.P., 1998. Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor- β system. *Kidney International* 53 (3), 631–638.
- Ziyadeh, F.N., Hoffman, B.H., Han, D.C., Iglesias-De La Cruz, M.C., Hong, S.W., Isono, M., Chen, S., McGowan, T.A., Sharma, K., 2000. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- β antibody in *db/db* diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 97 (14), 8015–8020.