

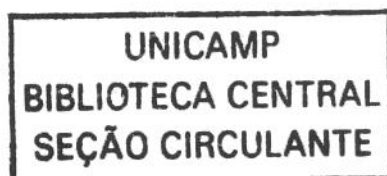
LILIA AIKAWA DA SILVEIRA

**A GENÉTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL MODIFICA A
RESPOSTA NA REPLICAÇÃO DE CÉLULAS RENAIIS
INDUZIDA POR DIABETES EXPERIMENTAL**

CAMPINAS

2001

200201359



LILIA AIKAWA DA SILVEIRA

***A GENÉTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL MODIFICA A
RESPOSTA NA REPLICAÇÃO DE CÉLULAS RENAIIS
INDUZIDA POR DIABETES EXPERIMENTAL***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, na área de Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ BUTORI LOPES DE FARIA

CAMPINAS

2001

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

Si39g

Silveira, Lilia Aikawa da

A genética da hipertensão modifica a resposta na replicação de células renais induzida por diabetes experimental / Lilia Aikawa da Silveira. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : José Butori Lopes de Faria

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. proliferação celular. 2. Hipertensão. I. José Butori Lopes de Faria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

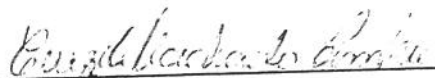
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

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

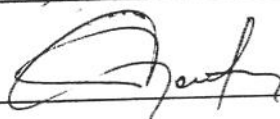


Membros:

1. Professora Doutora Terezila Machado Coimbra



2. Professor Doutor José Antonio Rocha Gontijo



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

Data: 29/06/01

DEDICATÓRIA

À minha querida filha Luiza, que soube compreender, com paciência, o tempo que não lhe dediquei.

Ao meu esposo Eduardo, que esteve ao meu lado durante todos os dias no decorrer deste trabalho.

Agradeço o Prof. José B. Lopes de Faria, pela paciente orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela constante revisão e críticas dos dados obtidos nos experimentos e pela correção cuidadosa durante a elaboração da dissertação.

Ao Prof. Benedito C. Vidal e ao Prof Carlos E. Bacchi, pelas sugestões e comentários quanto à metodologia empregada para assessorar a replicação celular.

Pela grande contribuição nos experimentos de imunohistoquímica, agradeço o Laboratório de Patologia Experimental, em especial aos professores Glauce Aparecida Pinto e José Vassalo.

Agradeço ao Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, em especial aos técnicos, pelo processamento dos tecidos utilizados na técnica de imunohistoquímica.

À Ana Eliza Righetti, agradeço pela colaboração na execução dos experimentos de imunohistoquímica e pela companhia diária.

Aos docentes da disciplina de Nefrologia, Dr. Eduardo Homs, Dra. Maria Almerinda V. F. Ribeiro Alves, Dr. Gentil Alves Filho, Dr. José Francisco Figueiredo e Dra Marilda Mazzali pelas sugestões, comentários e pelo convívio sempre muito agradável.

Aos alunos de pós-graduação e iniciação científica, pela colaboração constante nos experimentos com animais e pelo companheirismo.

Pelo carinho, preocupação e ajuda, agradeço meus queridos pais e irmãs.

À família Rocha pelo estímulo e exemplo de dedicação à ciência.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de forma singular para que este trabalho fosse concluído.

	PÁG.
RESUMO.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1. Desenho experimental.....	47
3.2. Animais experimentais.....	48
3.3. Indução do <i>diabetes mellitus</i>	48
3.4. Determinação de glicemia.....	48
3.5. Medida da pressão arterial sistólica.....	49
3.6. Replicação celular.....	49
3.7. Imunohistoquímica para BrdU.....	50
3.8. Quantificação de células BrdU positivas.....	51
3.9. Isolamento de glomérulos.....	51
3.10. Western Blot.....	52
3.10.1. Eletroforese.....	52
3.10.2. Transferência e Imunoreação.....	52
3.11. Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Pressão arterial sistólica, peso corpóreo, glicemia e peso dos rins.....	57
4.2. Replicação de células renais.....	58
4.3. Expressão glomerular de p27 ^{Kip1} em ratos com <i>diabetes mellitus</i> induzido por estreptozotocina.....	61

5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	69
7. SUMMARY.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9. ANEXOS.....	89

ABC	“avidin-biotin complex”
APS	“ammonium persulfate”
Bio-dATP	trifosfato deoxinucleotídeo marcado com biotina
BrdU	bromodeoxiuridina
BSA	“bovine serum albumine”
CDK	“cyclin-dependent kinase”
CKI	“cyclin kinase inhibitor”
CL-HRP	“chemiluminescent horseradish peroxidase”
CT Na ⁺ /H ⁺	contratransporte de sódio e hidrogênio
CT Na ⁺ /Li ⁺	contratransporte de sódio e lítio
DAB	“diaminobenzidine tetrahydrochloride”
DCCT	“Diabetes Control and Complications Trial”
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DMID	<i>diabetes mellitus</i> insulino-dependente
DMNID	<i>diabetes mellitus</i> não insulino-dependente
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
g	gramas, precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; n- nano (10 ⁻⁹), μ- micro (10 ⁻⁶), m- mili (10 ⁻³), k- quilo (10 ³)
G1	intervalo que precede a replicação do DNA
G2	intervalo que precede a mitose
HÁ	hipertensão arterial

HCl	ácido clorídrico
INK4	“inhibitors of CDK 4”
Kip	“kinase inhibitor protein”
l	litros, precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; μ - micro, m- mili
M	fase de mitose
M	molaridade, precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; n- nano, μ - micro, m- mili
MAPK	“mitogen activated protein kinase
MBG	membrana basal glomerular
MEC	matriz extracelular
N	normalidade
ND	nefropatia diabética
nm	nanômetros
p	probabilidade associada com a ocorrência sob a hipótese nula (H_0) de um valor tão extremo quanto o valor mais extremo observado
PBS	“phosphate buffered saline”
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
S	fase de síntese do DNA
SDS	“sodium dodecyl sulfate”
SHR	“Spontaneously Hypertensive Rats”
TA	temperatura ambiente
TBST	“tween tris buffered saline”
TdT	“terminal deoxynucleotidyl transferase”

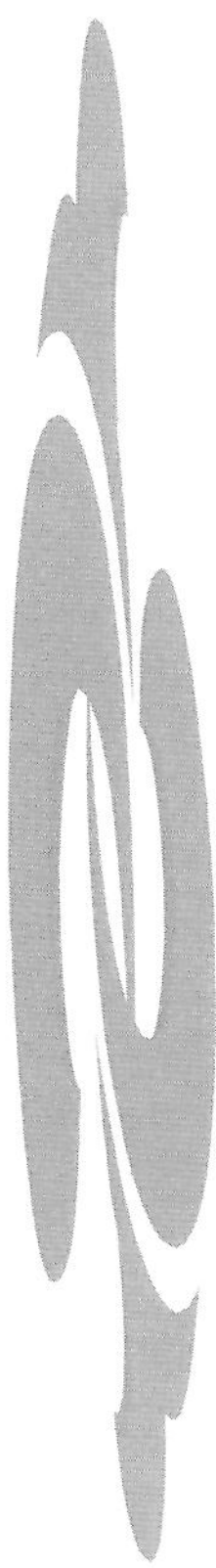
TEMED	tetrametil-etilenodiamina
TGF- β	“transforming growth factor-beta”
TUNEL	“terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling”
UKPDS	“United Kingdom Prospective Diabetes Study”
WKY	“Wistar Kyoto Rats”

	PÁG.
Tabela 1: Parâmetros dos grupos experimentais de ratos.....	57
Tabela 2: Número de células BrdU positivas (replicação) em glomérulos de ratos SHR e WKY, controles (cont) e 10 dias após a indução do <i>diabetes mellitus</i> (DM). Quantificação por experimento realizado.....	91
Tabela 3: Número de células BrdU positivas (replicação) em túbulo-interstício de ratos SHR e WKY, controles (cont) e 10 dias após a indução do <i>diabetes mellitus</i> (DM). Quantificação por experimento realizado.....	93

	PÁG.
Figura 1: Imunohistoquímica para identificação de células BrdU positivas em cortes histológicos de rim de rato SHR. O número de células em replicação nos glomérulos e túbulo-interstício foi significativamente reduzido nos ratos SHR diabéticos(A) comparados aos SHR controles (B). Ceco (controle positivo) (C). Contracoloração com hematoxilina, aumento de 400X.....	59
Figura 2: Western Blot para p27 ^{Kip1} de proteína extraída de glomérulos isolados de ratos WKY e SHR controles e 10 dias após a indução do <i>diabetes mellitus</i> (DM). Cada banda representa um “pool” de glomérulos isolados de 3-4 animais (15 e 30 µg de proteína foram utilizados, respectivamente).....	61

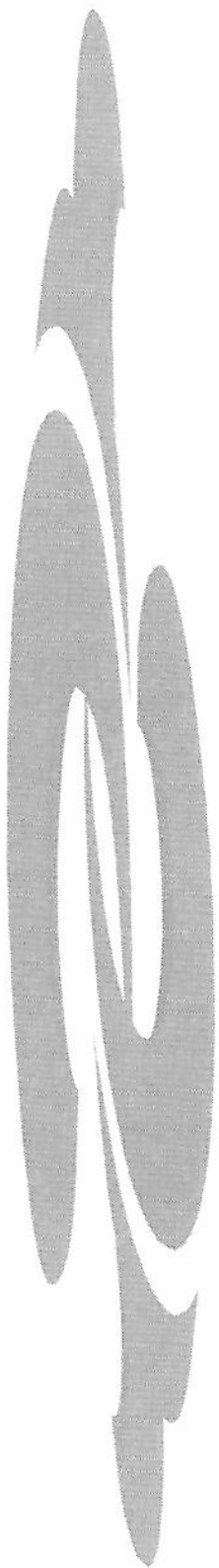
PÁG.

Gráfico 1: Número de células BrdU positivas (replicação) em glomérulos e túbulo-interstício de rim de ratos WKY e SHR controles e 10 dias após a indução do <i>diabetes mellitus</i> (DM).....	60
---	----



RESUMO

Com a finalidade de estudar se a genética da hipertensão modifica os eventos celulares renais observados no *diabetes mellitus* experimental, estudou-se a replicação celular renal e sua regulação por um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK), o p27^{Kip1}, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em fase pré-hipertensão e seus controles geneticamente normotensos, os ratos Wistar Kyoto (WKY), com *diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina. A injeção de estreptozotocina foi administrada nos animais com 4 semanas de idade e os estudos realizados após 10 dias de duração do diabetes. A replicação celular foi estimada pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina que liga-se ao DNA na fase de síntese, através da técnica de imunohistoquímica. Nos ratos SHR diabéticos, o número de células BrdU positivas glomerulares e túbulo-intersticiais foi significativamente menor que em ratos SHR controles; número de células positivas/50 glomérulos: $0,6 \pm 0,3$ vs $13,2 \pm 1,7$ ($p < 0,05$) e número de células túbulo-intersticiais positivas/50 campos de um retículo de $0,02 \text{ mm}^2$: $2,8 \pm 0,6$ vs $48,6 \pm 9,7$ ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença no número de células renais em replicação nos ratos WKY diabéticos e controles ($14,3 \pm 3,5$ vs $14,0 \pm 1,8$ e $66,4 \pm 11,5$ vs $63,9 \pm 10,6$ para glomérulos e túbulo-interstício, respectivamente). O peso do rim aumentou significativamente em ambas as linhagens de ratos diabéticos. Entretanto o peso do rim do rato SHR diabético foi significativamente maior que o rato WKY diabético ($0,55 \pm 0,02$ vs $0,51 \pm 0,01$, peso do rim/peso corpóreo, $p < 0,05$). Em glomérulos isolados, a expressão de p27^{Kip1}, detectada por Western Blot foi significativamente maior nos ratos SHR diabéticos que nos não-diabéticos ($1,52 \pm 0,14$ vs $1,00 \pm 0,10$, % do controle, $p = 0,0052$). Em conclusão, a resposta na replicação de células renais ao *diabetes mellitus* difere marcadamente entre os ratos SHR pré-hipertensos e seus controles, os ratos WKY. É possível que a diminuição na replicação de células glomerulares e a hipertrofia renal observada nos ratos SHR diabéticos pré-hipertensos sejam, pelo menos em parte, mediados pela maior expressão do inibidor de CDK, o p27^{Kip1}.



1. INTRODUÇÃO

Em pacientes com *diabetes mellitus* (DM), a susceptibilidade à doença renal diabética é variável (BORCH-JOHNSEN, ANDERSEN, DECKERT, 1985). Nefropatia diabética (ND) é um termo clínico utilizado para definir a presença de proteinúria, superior a 500 mg/24 hs, em portador de DM, na maioria das vezes de longa duração (superior a 10 anos) e freqüentemente acompanhada de retinopatia diabética e hipertensão arterial (LOPES DE FARIA, 1994; PARVING *et al.*, 1996). A prevalência de micro ou macroalbuminúria é de cerca de 35% em pacientes com DM insulino-dependentes (DMID ou tipo 1). Em pacientes com DM não insulino-dependentes (DMNID ou tipo 2) a prevalência varia de 6 a 50%, dependendo da origem étnica considerada (COWIE *et al.*, 1989; NELSON *et al.*, 1989). Em geral, a ND como causa de insuficiência renal crônica (IRC) é mais freqüente no DM tipo 2 por ser este tipo de diabetes mais prevalente. Indivíduos com DM tipo 1 raramente desenvolvem ND antes de 10 anos de duração, por outro lado aproximadamente 3% de portadores de DM tipo 2 recém-diagnosticados já apresentam proteinúria (GALL *et al.*, 1991). O risco desta complicação é maior na segunda década de duração da doença em indivíduos com DM tipo 1, decaindo posteriormente, de forma que o risco de desenvolvimento de ND nestes pacientes com 30 anos de duração da doença ou mais é baixo (BORCH-JOHNSEN, ANDERSEN, DECKERT, 1985; KROLEWSKI *et al.*, 1985). A razão pela qual somente uma fração dos portadores de DM tipo 1 desenvolve nefropatia diabética ainda não está totalmente elucidada (VIBERTI *et al.*, 1983), porém vários mecanismos têm sido sugeridos, entre eles a predisposição genética que, alguns autores, acreditam estar relacionada à hipertensão arterial essencial (KROLEWSKI *et al.*, 1988; MANGILI *et al.*, 1988; LOPES DE FARIA *et al.*, 1992) e fatores hemodinâmicos (MOGENSEN & CHRISTENSEN, 1984).

Um estudo multicêntrico e prospectivo, o “Diabetes Control and Complications Trial” (DCCT, 1993), envolvendo um grande número de pacientes com DM tipo 1, demonstrou a importância do controle glicêmico. Em relação à nefropatia diabética, o controle glicêmico isoladamente foi capaz de reduzir em cerca de 50% a chance de desenvolver micro ou macroalbuminúria, sugerindo que a hiperglicemia é um importante fator para o desenvolvimento da nefropatia, porém não é o único.

Outro estudo, também prospectivo, o “UK Prospective Diabetes Study” (UKPDS, 1998) mostrou que o controle glicêmico intenso reduziu o risco de complicações microvasculares em pacientes com DM tipo 2. A redução na probabilidade de progressão da albuminúria pelo tratamento intensivo foi de 39%. Menos de 1% dos pacientes deste estudo desenvolveram insuficiência renal, apesar deste tipo de diabetes, em muitas populações, ser a sua principal causa.

Várias linhas de evidências sugerem que a predisposição familiar à hipertensão arterial essencial pode aumentar o risco de lesão renal em pacientes com DM tipo 1 (VIBERTI, 1990). VIBERTI, KEEN, WISEMAN (1987) demonstraram que pais não-diabéticos de indivíduos com nefropatia tinham níveis elevados da pressão arterial quando comparados aos pais de diabéticos sem nefropatia. KROLEWSKI *et al.* (1988) confirmaram essas observações demonstrando que a história familiar de hipertensão é encontrada mais freqüentemente em pais de pacientes com DM tipo 1 e proteinúria do que naqueles com excreção urinária de proteína normal. A hipertensão em pacientes com DM tipo 1 desenvolve-se, portanto, principalmente em associação à albuminúria. Pacientes que não desenvolvem nefropatia permanecem normotensos apesar do longo tempo de duração do *diabetes mellitus* e idade avançada (PARVING *et al.*, 1981; OAKLEY *et al.*, 1974; BORCH-JOHNSEN, NISSEN, NERUP, 1985). Estas observações sugerem associação entre predisposição à hipertensão arterial e susceptibilidade à complicações renais em pacientes com DM tipo 1.

Há pouco mais de 20 anos, CANESSA e colaboradores relataram que pacientes com hipertensão arterial essencial apresentam aumento na atividade do contratransporte de sódio e lítio (CT Na⁺/Li⁺) em hemácias quando comparados a indivíduos normotensos (CANESSA *et al.*, 1980). Posteriormente, foi demonstrado que filhos normotensos de pais hipertensos também apresentam elevação do CT Na⁺/Li⁺ em hemácias quando comparados aos filhos de pais normotensos (VIBERTI, KEEN, WISEMAN, 1987). Estas observações levaram a sugestão de que o CT Na⁺/Li⁺ em hemácias seria um marcador de predisposição à hipertensão arterial essencial. Várias linhas de evidências sugerem que o CT Na⁺/Li⁺ representa um modo de operação do contratransporte de sódio e hidrogênio (CT Na⁺/H⁺) (MAHNENSMITH & ARONSON, 1985). Em particular, foi demonstrado forte correlação

entre a atividade do CT Na^+/Li^+ em hemácias e atividade do CT Na^+/H^+ em túbulos proximais humanos (NG *et al.*, 2000). Este último sistema de troca de cátions é encontrado em praticamente todas as células, tendo várias funções fisiológicas importantes, incluindo controle do pH intracelular, absorção proximal de sódio e hiperplasia e hipertrofia celulares (MAHNENSMITH & ARONSON, 1985). Em pacientes não-diabéticos, tem sido demonstrado que a velocidade máxima do contratransporte de sódio e lítio é geneticamente determinada (DADONE *et al.*, 1984; BOERWINKLE *et al.*, 1986). Em pacientes com *diabetes mellitus* tem sido demonstrado aumento na velocidade do contratransporte de sódio e lítio (CT Na^+/Li^+) em hemácias de pacientes com nefropatia quando comparado a pacientes sem a doença renal (KROLEWSKI *et al.*, 1988; MANGILI *et al.*, 1998; LOPES DE FARIA *et al.*, 1992). Estas observações levaram a sugestão de que a predisposição à hipertensão essencial possa ter importante papel no desenvolvimento da doença renal em pacientes com *diabetes mellitus*.

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na associação entre predisposição à hipertensão arterial e nefropatia diabética, entretanto, permanecem não totalmente elucidados (LOPES DE FARIA, ZOUKHRI, LORENZI, 1997).

Em relação à patogênese da nefropatia diabética, acredita-se que há um envolvimento importante de distúrbios do metabolismo celular glomerular, levando a um acúmulo de componentes da matrix extracelular (MEC), resultando em expansão mesangial e espessamento da membrana basal (MBG) (MAUER, 1994). Neste processo, a hiperglicemia é, sem dúvida, a principal anormalidade metabólica, porém outros mecanismos têm sido propostos, incluindo fatores hemodinâmicos (HOSTETTER, TROY, BRENNER, 1981; BRENNER, 1983), glicosilação de estruturas glomerulares (MAKITA *et al.*, 1991) e aumento de fatores de crescimento, como o TGF- β (YAMAMOTO *et al.*, 1993). Sugere-se ainda, que o aumento do TGF- β possa ser mediado pela angiotensina II (WOLF & ZIYADEH, 1997).

A expansão mesangial, uma das principais características anatomopatológicas na nefropatia diabética, está diretamente relacionada com a piora da função renal (ADLER, 1994). Aumento na produção de matriz extracelular, assim como uma diminuição no

“turnover” de seus componentes, contribuem para a expansão do mesângio (MOGYORÓSI & ZIYADEH, 1996). Além disso, o crescimento de células mesangiais é alterado na nefropatia diabética. Estudos em vários modelos de *diabetes mellitus* revelaram um padrão de crescimento celular peculiar: a replicação de células mesangiais é estimulada precocemente durante o curso da doença, cessando posteriormente e levando as células à hipertrofia (ADLER, 1994; MOGYORÓSI & ZIYADEH, 1996; YOUNG *et al.*, 1995). WOLF *et al.* (1992) demonstraram que, após 24 horas de exposição a um ambiente com aumento na concentração de glicose, a replicação de células mesangiais de camundongos em cultura é estimulada, mas este efeito é inibido após 72-96 horas. Na ND experimental, o mecanismo predominante do crescimento celular em fase inicial da doença é a hipertrofia glomerular (SEYER-HANSEN, 1983) fenômeno observado também em humanos (OSTERBY & GUNDERSEN, 1975). Em fase tardia no curso da doença, a hipertrofia se deve também ao acúmulo de proteínas da matriz extracelular (STEFFES *et al.*, 1992). Posteriormente, o diabetes está associado com aumento na replicação e hipertrofia de células tubulares (RASCH & NORGAARD, 1983). A normalização dos níveis sanguíneos de glicose previne estes eventos celulares de crescimento e o desenvolvimento da esclerose glomerular progressiva, e em alguns casos, pode até reverter a esclerose glomerular (FIORETTO *et al.*, 1998).

Os mecanismos associados com o desenvolvimento da hipertrofia glomerular diabética ainda não estão totalmente estabelecidos. Há evidências que suportam um possível papel de fatores de crescimento, como o TGF- β (ZIYADEH *et al.*, 2000; SHANKLAND & SCHOLEY, 1994; SHARMA *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1993; ZIYADEH & SHARMA, 1995; SHARMA & ZIYADEH, 1994), alguns sinalizadores intracelulares, como as proteínas quinases ativadoras de mitógenos (MAPK) (HANEDA *et al.*, 1997), citocinas como a angiotensina II (WOLF & ZIYADEH, 1997) e também fatores específicos de transcrição, como protooncogenes (INGRAM & SCHOLEY, 1997; WILMER & COSIO, 1998; SHANKLAND & SCHOLEY, 1995). Além disso, estudos têm mostrado um importante papel de proteínas reguladoras do ciclo celular na nefropatia diabética.

O ciclo celular está dividido em 4 fases (G1, S, G2 e M). Células quiescentes na fase G0 entram no ciclo celular na fase G1, seguido pela fase S (síntese), onde ocorre a replicação do DNA. As células progridem por G2 e entram na fase M (mitose), que é posteriormente 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, sequencial 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, para que esta ocorra uma vez a cada ciclo, complete-se antes de iniciar a mitose e que os cromossomos sejam replicados em duas células-filhas idênticas (GRANA & REDDY, 1995). Depois de passarem por um ponto definido como 'ponto de restrição' no final da fase G1, as células não mais respondem a sinais extracelulares e completam o ciclo celular sob controle de proteínas específicas reguladoras do ciclo celular. A média de tempo do ciclo celular é de 12 horas para a fase G1, 6 horas para S, 6 horas para G2 e 30 minutos para a mitose (MURRAY & HUNT, 1993).

As proteínas reguladoras do ciclo celular tem um importante papel na proliferação, hipertrofia ou apoptose na doença renal, eventos que ocorrem associados às fases do ciclo celular (SHANKLAND, 1997). A proliferação celular requer uma progressão normal pelo ciclo celular; a hipertrofia ocorre quando a célula entra no ciclo celular mas não progride além da fase tardia de G1, ocorrendo uma parada na transição G1/S; a apoptose está associada à saída do ciclo celular que ocorre tipicamente na fase G1. Entretanto, estes processos dividem caminhos comuns, podendo explicar porque certas populações celulares proliferam e entram em apoptose, enquanto a proliferação e a hipertrofia são eventos independentes.

A localização das proteínas reguladoras do ciclo celular é predominantemente no núcleo e sua principal função é controlar a transição entre cada fase do ciclo celular, regulando-o positiva ou negativamente. A progressão pelo ciclo é regulada pela atividade da quinase de um complexo, composto por duas subunidades: uma regulatória, denominada ciclina e outra catalítica, denominada quinase dependente de ciclina (CDK) (MORGAN, 1995; SHERR, 1994; SHERR, 1993). Estas estruturas são chamadas complexos ciclina-CDK, e necessitam estar ativadas para que o ciclo celular se complete, levando a célula à

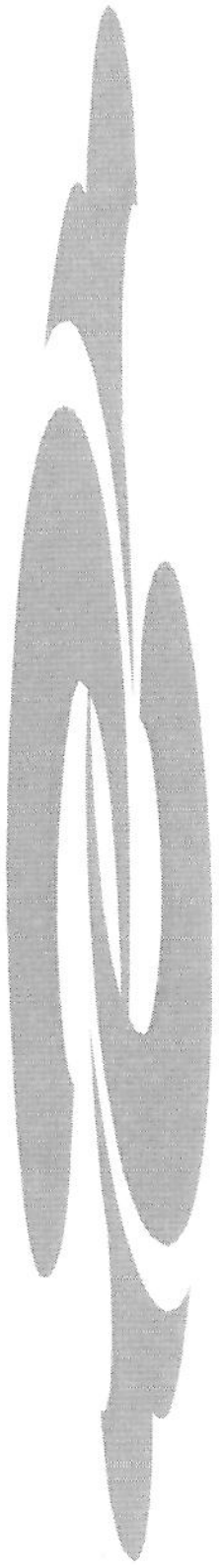
proliferação. Inibidores destes complexos regulam negativamente a progressão pelo ciclo celular e são denominados inibidores de CDKs ou CKIs (inibidores de quinase ciclina). Os mecanismos moleculares que levariam a inibição do complexo ciclina-CDK pelos inibidores de CDK ainda não são totalmente compreendidos, porém o mecanismo mais provável é a ligação destes inibidores ao complexo ciclina-CDK, interrompendo a atividade da quinase, levando à interrupção do ciclo celular e inibição da proliferação (SHERR & ROBERTS, 1995).

Existem duas famílias de inibidores de CDK, que são classificadas de acordo com sua homologia estrutural e baseadas nos complexos ciclina – CDK inibidos por elas. São nomeados de acordo com o seu peso molecular. A família INK4 (p15, p16, p18 e p19) inibe CDKs ativos na fase G1 do ciclo celular (HANNON & BEACH, 1994; SERRANO, HANNON, BEACH, 1993), ao passo que membros da família Cip/Kip, compreendendo o p21^{Cip1/Waf1} (p21), o p27^{Kip1} (p27) e o p57^{Kip2} (p57), contém um domínio conservado na região amino-terminal, domínio este suficiente para estabilizar sua ligação ao complexo ciclina-CDK e inibem CDKs nas fases G1 e S (HARPER *et al.*, 1993; HARPER *et al.*, 1995; POLYAK *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997).

Os inibidores de CDK são determinantes críticos para o aparecimento e a magnitude da proliferação celular renal. Apesar de existirem duas famílias de inibidores de CDK, a maioria dos estudos tem mostrado a importância da família Cip/Kip (p21, p27, p57). Não se sabe, porém, os mecanismos que levam a diferenças na expressão destas proteínas durante a proliferação celular renal. O inibidor de CDK p21 está normalmente presente em pequenas quantidades nas células glomerulares quiescentes (SHANKLAND *et al.*, 1996). Entretanto os seus níveis aumentam durante a proliferação de células mesangiais induzida por mitógenos. O inibidor de CDK p27 é expresso em maior quantidade que o p21 em células mesangiais quiescentes normais *in vitro*. O início da proliferação mesangial *in vitro* induzido por fatores de crescimento mitogênicos está associado à diminuição nos níveis de proteína de p27 (SHANKLAND *et al.*, 1997). O pico da proliferação de células mesangiais na glomerulonefrite proliferativa experimental coincide com níveis quase indetectáveis de p27 (SHANKLAND *et al.*, 1996).

No *diabetes mellitus* experimental tem sido reportado um aumento precoce e limitado na replicação de células mesangiais (YOUNG *et al.*, 1995), seguido por uma interrupção do ciclo celular na fase G1 e concomitante hipertrofia (WOLF *et al.*, 1997; KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; AL-DOUAHJI *et al.*, 1999; HANNKEN *et al.*, 2000). Sugere-se que os principais inibidores de CDKs que mediam a parada do ciclo celular na fase G1 são, o p27^{Kip1} e p21^{Cip1} (WOLF *et al.*, 1997; KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; WOLF *et al.*, 1998). Estas anormalidades na replicação e regulação celular tem sido implicadas na hipertrofia glomerular e renal observada em humanos e no diabetes experimental (KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; AL-DOUAHJI *et al.*, 1999; MOGENSEN, ANDERSEN, DENMARK, 1973).

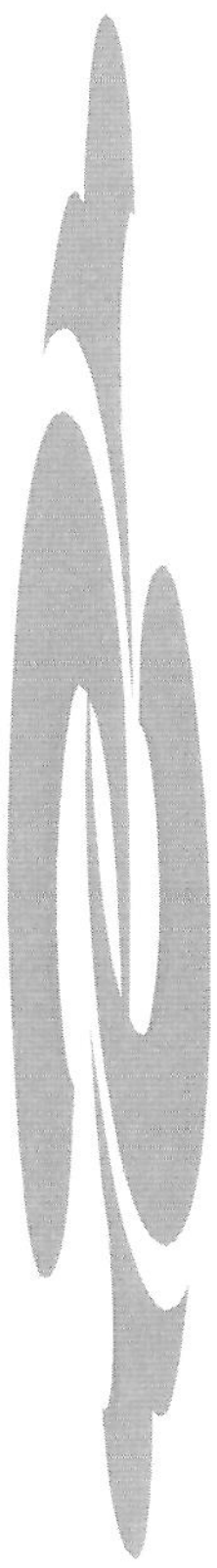
A identificação de anormalidades precoces no rim de indivíduos diabéticos, que provavelmente desenvolverão hipertensão arterial, mas ainda não apresentam este fenótipo, poderia trazer novos mecanismos relevantes para a compreensão da susceptibilidade à nefropatia diabética que acompanha a genética da hipertensão. Devido ao fato de que estes estudos não podem ser feitos em humanos, foram usados neste trabalho ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o modelo animal mais usado para estudos de hipertensão arterial essencial, que exibe um período de normotensão (4 primeiras semanas de vida), precedendo o desenvolvimento da hipertensão geneticamente determinada, a qual ocorre em 100% dos animais (OKAMOTO *et al.*, 1966).



2. OBJETIVOS

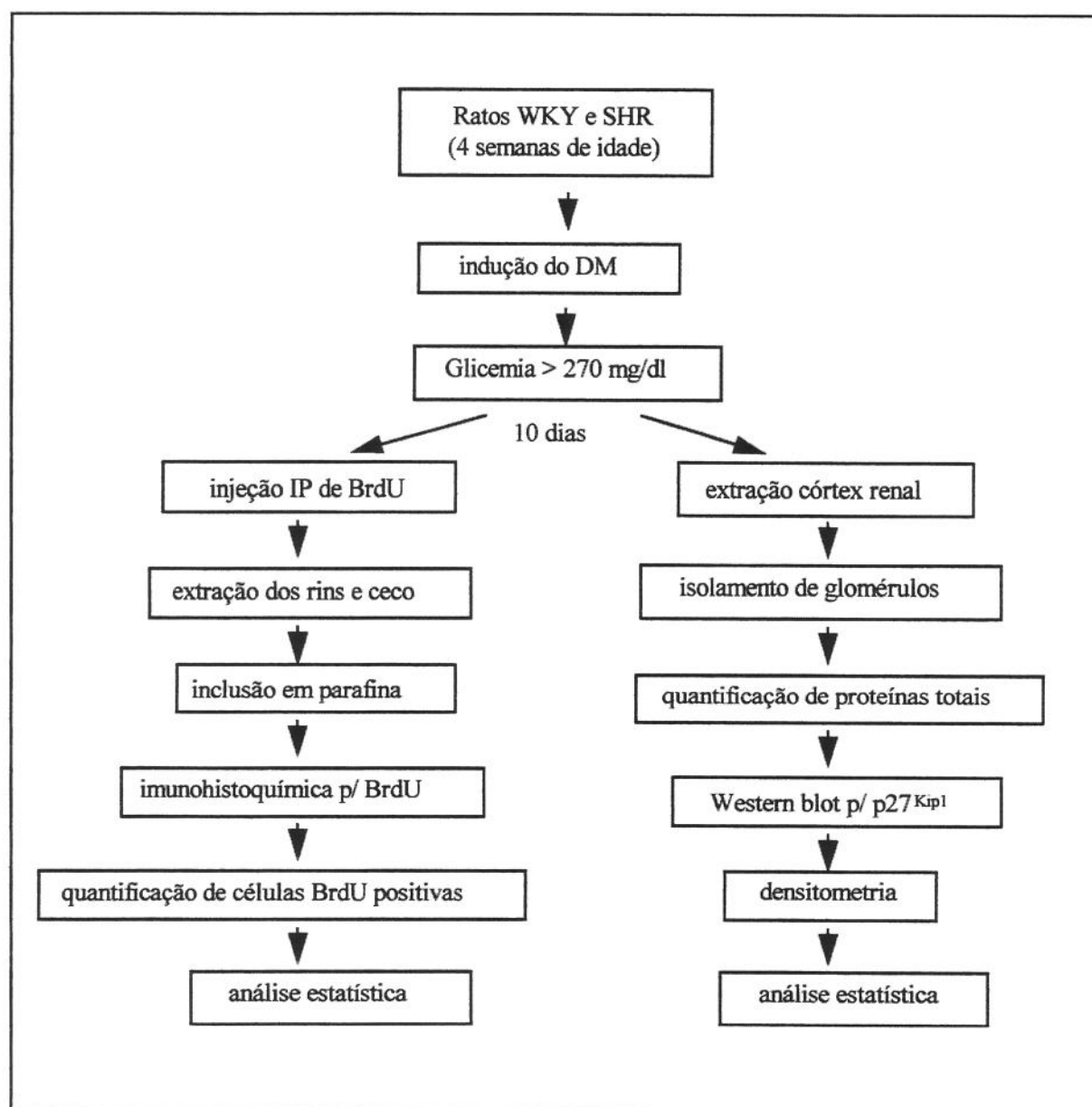
- Testar se a resposta na replicação de células renais de ratos SHR pré-hipertensão com *diabetes mellitus* (DM) induzido por estreptozotocina é diferente daquela observada nos seus controles geneticamente normotensos, Wistar Kyoto (WKY).

- Investigar se a expressão renal de um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK), o p27^{Kip1}, difere com a indução do DM nos ratos SHR e WKY.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL



3.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos SHR e WKY machos, com 4 semanas de idade, derivados de animais fornecidos pela Taconic (Germantown, NY, USA) e criados no biotério central da Unicamp de acordo com as normas para o cuidado e uso de animais de laboratório desta Universidade.

3.3. INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS*

O *diabetes mellitus* foi induzido após jejum durante o período noturno (8-12 horas) em ratos anestesiados SHR e WKY machos, com 4 semanas de idade, através de injeção intravenosa de estreptozotocina (Sigma, St Louis, EUA) na dose de 65 mg/Kg de peso corpóreo, diluída em tampão citrato pH 4,5 minutos antes da aplicação. Grupos controle receberam somente o veículo da droga. Os animais permaneceram por 2 horas adicionais em jejum após a indução.

3.4. DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA

Níveis sanguíneos de glicose foram mensurados 72 horas após a injeção de estreptozotocina ou tampão citrato e também no dia anterior ao sacrifício em todos os ratos. As amostras de sangue foram colhidas da cauda dos animais em tubo heparinizado, centrifugadas e no plasma a glicemia foi quantificada utilizando-se 10 µl das amostras. Controles com concentrações diferentes de glicose e um padrão de 100 mg/dl foram incluídos. Em todos os tubos, adicionou-se 1 ml de reagente de cor (método enzimático-colorimétrico GOD-PAP) (Merck, Darmstadt, Alemanha). O material foi homogeneizado e incubado por 10 minutos a 37°C em banho-maria, efetuando-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 500 nm, de acordo com instruções do fornecedor. Animais com valores de glicemia acima de 270 mg/dl foram incluídos nos experimentos.

3.5. MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

As determinações da pressão arterial sistólica (3-5 em cada rato) foram obtidas por pletismografia via caudal em ratos não anestesiados, usando um fisiógrafo MKIII (Narco Biosystem, Houston, EUA). Os animais foram mantidos por 10 minutos em caixa aquecida à 39°C antes da medida da pressão. A temperatura foi mantida em 36°C no contentor através de uma placa de aquecimento, enquanto se obtinha a pressão arterial dos animais. Os animais tiveram a pressão arterial medida no dia anterior ao sacrifício.

3.6. REPLICAÇÃO CELULAR

A replicação celular foi estudada em animais 10 dias após a indução do DM e verificada através da incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) (Calbiochem, La Jolla, EUA), um análogo da timidina que se incorpora ao DNA na fase de síntese (S). Através deste marcador, as células podem, posteriormente, ser identificadas por técnica de imunohistoquímica (HARMS *et al*, 1986). Este método tem sido reconhecido como padrão ouro para marcação de células em replicação (LYNCH *et al*, 1994). Ratos diabéticos SHR (n=7) e WKY (n=7) e ratos controle, após jejum de 8-12 horas, receberam uma injeção intraperitoneal de BrdU na dose de 100 mg/Kg de peso corpóreo, dissolvido em salina. Uma hora após a injeção, os rins foram extraídos, fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas e então mergulhados em álcool 80% por pelo menos mais 24 horas. O mesmo tratamento foi dado a uma porção do trato gastrointestinal (ceco ou estômago), que foi usada como controle positivo para a reação devido a alta taxa de replicação encontrada neste tecido. O material foi colocado em diafanizador de tecidos automático (Shandon Lipshaw, Pittsburgh, EUA) que consiste em consecutivos banhos com xilol, álcool 80% e parafina, finalizando-se o processo com a inclusão dos tecidos em blocos de parafina em auto-inclusor (Leica, Wetzlar, Alemanha). Estes foram cortados para utilização na técnica de imunohistoquímica em espessura de 4 µm, em micrótomo (Spencer, EUA).

3.7. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA BrdU

Para demonstrar a imunorreação da incorporação da BrdU, os cortes foram incubados no dia anterior em estufa à 110°C por 1 hora e mantidos a 60°C durante o período noturno (8-12 horas). No dia seguinte, foram desparafinizados em xilol (3 banhos de 1 minuto cada), reidratados em etanol 100% (3 banhos de 1 minuto cada), 95% (1 banho de 1 minuto) e 70% (3 banhos de 1 minuto cada), em TA. As lâminas foram colocados em HCl 2N a 31°C por 20 minutos e em seguida em tripsina 0,005% em tampão PBS a 37°C por 2 minutos para recuperação antigênica. Após este pré-tratamento, as lâminas foram mergulhadas em leite desnatado 1% em PBS por 1 hora em TA para bloqueio das ligações inespecíficas. Em seguida, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo monoclonal anti BrdU (Dako, Glostrup, Denmark), em diluição 1:50 em albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS, por 1 hora e meia, em TA. Após 3 lavagens de 5 minutos cada em PBS, as lâminas foram incubadas com um anticorpo secundário anti mouse IgG policlonal biotinizado (Vector, Burlingame, EUA), em diluição 1:200, no mesmo diluente do anticorpo primário, e foram mantidas em câmara úmida por 1 hora, em TA. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas em H₂O₂ 3% em metanol por 5 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. O complexo avidina-biotina (ABC) (Vector Burlingame, EUA) foi aplicado as lâminas por 30 minutos em TA, seguido por lavagens em PBS e incubação com tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, EUA) na presença de água oxigenada 30%, usado como solução cromógeno-substrato. Foi realizada uma contracoloração com hematoxilina, os cortes foram desidratados em etanol 70% (1 banho de 1 minuto), 95% (1 banho de 1 minuto), 100% (2 banhos de 1 minuto cada) e mergulhados em xilol (3 banhos de 1 minuto cada), em TA, montados com Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analisados ao microscópio óptico. Para cada animal foi utilizado um corte do trato gastrointestinal como controle da injeção de BrdU, e para cada ensaio de imunohistoquímica, um corte de rim de rato com insuficiência renal aguda induzida por glicerol como controle positivo da reação. O controle negativo consistia da omissão do anticorpo primário.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS

Para a quantificação de células em replicação, os tecidos foram analisados quanto à conservação de suas características morfológicas e estruturais. As células positivas para BrdU foram quantificadas em 50 glomérulos e 50 campos de um retículo de 0,02 mm² para o túbulo-interstício, utilizando-se um contador manual. Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata para cada animal e a média foi utilizada para análise estatística.

3.9. ISOLAMENTO DE GLOMÉRULOS

Para extração de proteína a partir de glomérulos isolados, foram utilizados 29 ratos SHR e 30 ratos WKY, machos, que receberam injeção de estreptozotocina com 4 semanas de idade e foram sacrificados 10 dias após a indução do DM. Os animais foram anestesiados, os rins imediatamente extraídos, decapsulados e pesados. A camada cortical foi separada da medular, e mergulhada em solução de Hank's (GibcoBRL, Grand Island, EUA) mantida em gelo. O material coletado de 3-4 animais foi cortado em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 mm, e separado através de passagens por peneiras de aço inox (W. Tyles CO., Mentor, EUA) de poros com tamanhos decrescentes, iniciando-se com poro de 250 µ, 106 µ e 63 µ; nesta última ficam retidos os glomérulos. As preparações finais continham mais de 95% de glomérulos em análise em microscópio óptico de contraste de fase. Os glomérulos foram lavados 2 vezes em solução de Hank's, centrifugados em 1500 rpm, a 4°C, por 5 minutos. O material foi lisado com o auxílio de processador ultrasônico de alta frequência (20 kHz- 20.000 ciclos por segundo), por aproximadamente 10 segundos, diretamente em 300 µl de um tampão contendo SDS 2% e Tris-HCl (pH 6,8) 60 mmol/l, suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Completo, Boehringer Mannheim, Alemanha, contendo: HCl-antipaina, quemostatina, leupeptina, bestatina, pepstatina, fosforamidona, aprotinina, EDTA) (WOLF *et al*, 1999). O material foi novamente centrifugado a 9000 rpm, 10 minutos, 15°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a proteína total foi quantificada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foi acrescentado um tampão utilizado para eletroforese, contendo glicerol 5%, azul de bromofenol 0,03% e 10 mmol/l de dithiothreitol. Esta solução foi fervida por 5 minutos e estocada a -80°C até a sua utilização.

3.10. WESTERN BLOT

3.10.1. Eletroforese

As proteínas (15 e 30 µg) obtidas de glomérulos isolados de 3-4 ratos foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15%, contendo duas fases: uma disposta superiormente chamada de fase de empilhamento, contendo 4,2 ml de água deionizada, 1,0 ml de acrilamida 40%, 20 µl de TEMED, 270 µl de APS 10%, e 5,6 ml de tampão de empilhamento (composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, Tris base 50 mM, diluídos em água deionizada para 1 litro, pH 6.7), e outra disposta inferiormente, chamada fase de resolução, contendo 1,8 ml de glicerol, 6,3 ml de acrilamida 40%, 27 µl de TEMED, 380 µl de APS 10% e 9,0 ml de tampão de resolução (composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, Tris base 750 mM, diluídos em água deionizada para 2 litros, pH 8.9). Um marcador de peso molecular (Rainbow; Amersham, Little Chalfont, Inglaterra) na faixa de 14300-220000 Daltons foi usado como padrão de peso molecular. A eletroforese foi realizada inicialmente com 20-40 volts, até que as amostras chegassem ao final do gel de empilhamento, sendo ajustada para 120 volts até completarem a migração pelo gel de resolução.

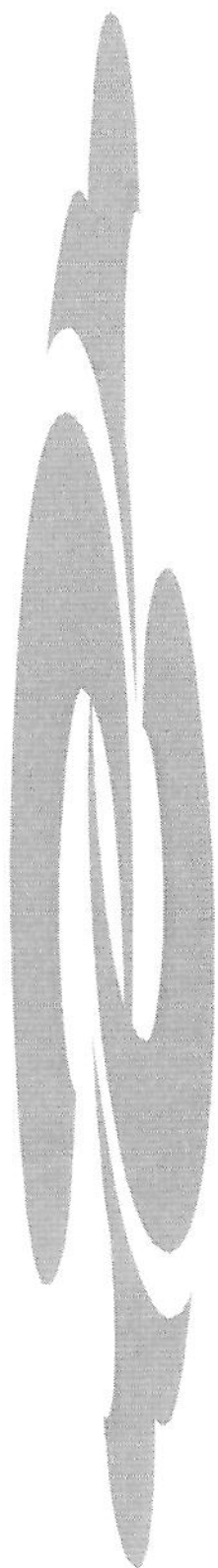
3.10.2. Transferência e Imunoreação

Ao final da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, EUA) por gradiente elétrico de 200 volts, por 2 horas, em tampão de transferência (Tris-HCl pH 7,0 50 mmol/l, glicina 380 mmol/l, SDS 0,1%, metanol 20%). Ligações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das membranas em leite desnatado 5% em PBS acrescido de Tween 20 0,1%, a 4°C, no período noturno (8-12 horas). Para a detecção do inibidor de CDK, p27^{Kip1}, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti p27^{Kip1} (Transduction Laboratories, Lexington, EUA), na diluição de 1:1000 em solução de bloqueio, por 1 hora, em TA. As membranas foram lavadas em TBST (3 lavagens de 10 minutos, em TA) e incubadas com anticorpo anti mouse conjugado com peroxidase (New England Biolabs, Beverly, EUA), usando-se uma diluição de 1:3000, em solução de bloqueio, por 1 hora, em TA. As membranas foram novamente lavadas em

TBST e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando um substrato para quiluminescência, composto por partes iguais de solução de luminol e de peroxidase (Super Signal CL-HRP; Pierce, Rockford, EUA), com incubação da membrana por 10 minutos, em TA. Este método consiste em uma reação química que ocorre entre a enzima “horseradish peroxidase” (HRP) e uma molécula quiluminescente, o luminol, resultando em emissão de luz. Um controle positivo (lisado de células HeLa, uma linhagem de células epiteliais semelhante a linhagem de adenocarcinoma) fornecido pelo fabricante do anticorpo primário foi incluído nos experimentos. As membranas foram expostas aos filmes (Hyper Film ECL, Amersham, EUA) de 30 segundos a 2 minutos e as bandas correspondentes ao p27^{Kip1} foram submetidas à quantificação, utilizando-se um densitômetro a laser (Bio-Rad, Hercules, EUA) e um programa de análises múltiplas Macintosh® (Bio-Rad, Hercules, EUA). Para a intensidade dos sinais, aos controles foi considerado arbitrariamente um valor de 1,00 e as amostras foram analisadas pela porcentagem dos controles. Os experimentos de Western Blot foram repetidos de 3-5 vezes para cada amostra, com resultados qualitativos semelhantes.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. Nos estudos de replicação celular e nos estudos de expressão protéica do inibidor de CDK, p27^{Kip1}, as comparações entre os 4 grupos estudados (SHR controle, SHR diabético, WKY controle, WKY diabético) foram feitas usando o teste ANOVA, seguido pelo teste de Fisher. Para análise estatística utilizou-se o programa Statview para Macintosh®. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, PESO CORPÓREO, GLICOSE SANGÜÍNEA E PESO DOS RINS

Como notado por outros investigadores (CLUBB *et al.*, 1987), ratos SHR com 4 semanas de idade são menores que ratos WKY. Ambos os grupos de animais diabéticos tiveram um menor ganho de peso 10 dias após a injeção de estreptozotocina, comparados a seus controles normoglicêmicos (tabela 1). A glicose sangüínea foi semelhante nos dois grupos de animais diabéticos (WKY $438,0 \pm 15,9$ mg/dl; SHR $449,6 \pm 10,7$ mg/dl). Assim como para o peso corpóreo (WKY controle $141,8 \pm 3,3$ g; SHR controle $109,8 \pm 5,3$ g; $p < 0,05$), o peso absoluto do rim foi significativamente menor no SHR controle quando comparado ao WKY controle (WKY controle $0,62 \pm 0,01$ g; SHR controle $0,45 \pm 0,02$ g; $p < 0,05$), com uma tendência à redução nas duas linhagens de ratos diabéticos (WKY DM $0,60 \pm 0,02$ g; SHR DM $0,43 \pm 0,01$ g). Devido a este fato, tem sido sugerido que o peso do rim seja corrigido pelo peso corpóreo, particularmente em animais diabéticos (AL-DOUAHJI *et al.*, 1999; AWAZU *et al.*, 1999). O peso do rim corrigido pelo peso corpóreo foi semelhante nos ratos não-diabéticos (WKY $0,44 \pm 0,01$ g; SHR $0,41 \pm 0,01$ g). Nos animais diabéticos, o peso do rim corrigido aumentou significativamente em ambas as linhagens, entretanto o peso do rim dos ratos SHR diabéticos foi significativamente maior que nos ratos WKY diabéticos ($0,55 \pm 0,02$ g vs $0,51 \pm 0,01$ g, peso do rim/peso corpóreo, $p < 0,05$). A pressão arterial sistólica foi levemente maior em ambos os grupos de ratos SHR quando comparados ao grupo WKY controle, todavia não houve diferença entre os dois grupos diabéticos (WKY $113,9 \pm 2,7$ mmHg; SHR $117,4 \pm 3,9$ mmHg).

Tabela 1: Parâmetros dos grupos experimentais de ratos.

	WKY controle (n=25)	WKY diabético (n=19)	SHR controle (n=20)	SHR diabético (n=23)
Peso corpóreo, g	$141,8 \pm 3,3$	$118,3 \pm 2,5^a$	$109,8 \pm 5,3^a$	$79,7 \pm 3,2^{a,b,c}$
Glicose sanguínea, mg/dl	$145,7 \pm 3,6$	$438,0 \pm 15,9^a$	$134,1 \pm 4,8$	$449,6 \pm 10,7^c$
Peso absoluto do rim, g	$0,62 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02^{a,b}$	$0,43 \pm 0,01^{a,b}$
Peso do rim/peso corpóreo, g	$0,44 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,01^a$	$0,41 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,02^{a,b,c}$
Pressão arterial sistólica, mmHg	$103,9 \pm 3,3$	$113,9 \pm 2,7$	$120,4 \pm 3,8^a$	$117,4 \pm 3,9^a$

^a $p < 0,05$ vs WKY controle

^b $p < 0,05$ vs WKY diabético

^c $p < 0,05$ vs SHR controle

4.2. REPLICAÇÃO DE CÉLULAS RENAIIS

A técnica de imunohistoquímica utilizando um anticorpo monoclonal anti BrdU foi realizada para obter informações quanto à localização de células renais em replicação nos ratos WKY e SHR com 10 dias de DM e seus respectivos controles. A figura 1 mostra raras células BrdU positivas no rim do rato SHR diabético (A) quando comparado ao rato SHR controle (B). O gráfico 1 representa a quantificação do número de células positivas para BrdU em glomérulos e túbulo-interstício de ratos WKY e SHR, controles e diabéticos 10 dias após a injeção de estreptozotocina. A quantificação por experimento está representada nas tabelas 2 e 3 (Anexos). Nos ratos SHR, o *diabetes mellitus* promoveu um decréscimo significativo na replicação celular renal quando comparado aos ratos SHR controles (glomérulos SHR controles $13,2 \pm 1,7$; SHR diabéticos $0,6 \pm 0,3$, $p < 0,05$ e túbulo-interstício SHR controles $48,6 \pm 9,7$; SHR diabéticos $2,8 \pm 0,6$, $p < 0,05$). Nos ratos WKY, não houve diferença no número de células renais em replicação entre os dois grupos (glomérulos WKY controles $14,0 \pm 1,8$; WKY diabéticos $14,3 \pm 3,5$, $p > 0,05$ e túbulo-interstício WKY controles $63,9 \pm 10,6$; WKY diabéticos $66,4 \pm 11,5$, $p > 0,05$).

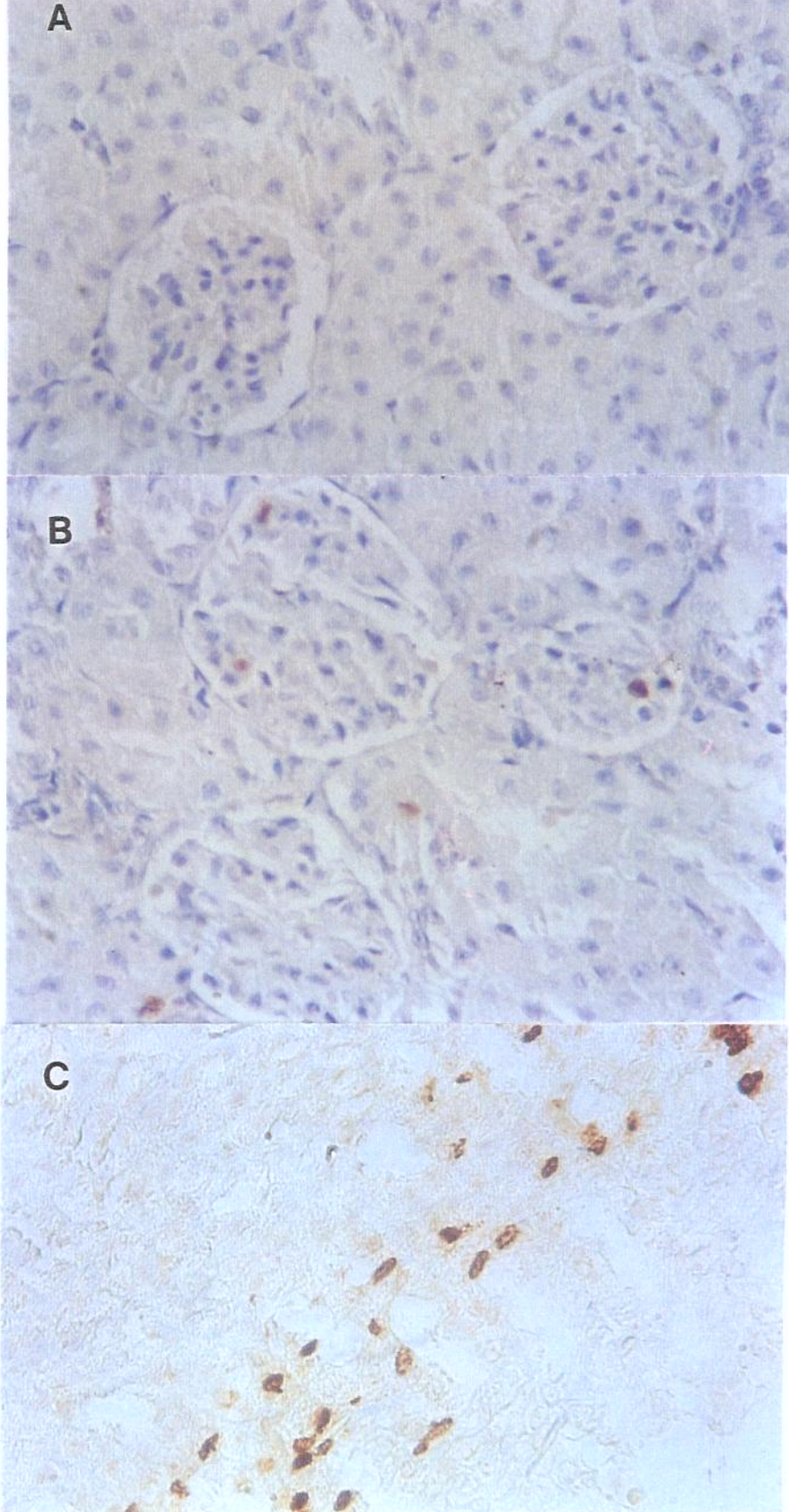
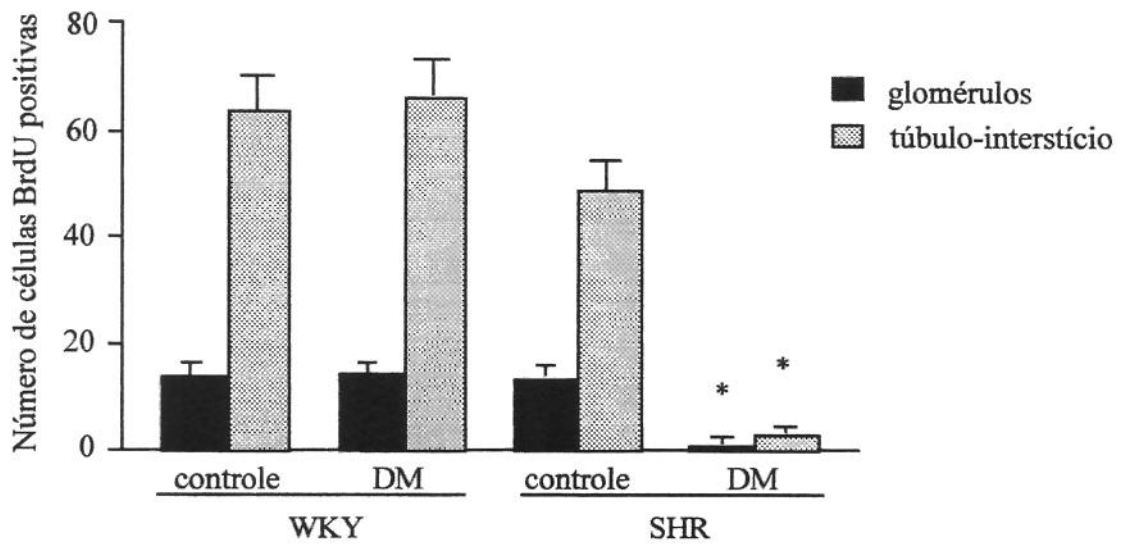


Figura 1: Imunohistoquímica para identificação de células BrdU positivas em cortes histológicos de rim de rato SHR. O número de células em replicação nos glomérulos e túbulo-interstício foi significativamente reduzido nos ratos SHR diabéticos (A) comparados aos SHR controles (B). Ceco (controle positivo) (C). Contracoloração com hematoxilina, aumento de 400X.

Gráfico 1. Número de células BrdU positivas (replicação) em glomérulos e túbulo-interstício de ratos WKY e SHR controles e 10 dias após a indução do *diabetes mellitus* (DM). Foram realizados 2-4 experimentos por animal e os valores representam a média±EP. * $p<0,05$ vs SHR controle, WKY controle e WKY DM



4.3. EXPRESSÃO GLOMERULAR DE $p27^{Kip1}$ EM RATOS COM *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

A fim de investigar o potencial papel das proteínas reguladoras do ciclo celular no decréscimo da replicação celular renal e na hipertrofia glomerular observada nos ratos SHR diabéticos, foi estudada a expressão de um inibidor de quinases dependente de ciclina (CDK), o $p27^{Kip1}$. Em glomérulos isolados, o nível de $p27^{Kip1}$ detectado por Western Blot (figura 2) foi significativamente maior em ratos SHR diabéticos ($n=5$) que nos SHR não diabéticos ($n=5$) ($1,52 \pm 0,14$ vs $1,00 \pm 0,10$, % do controle, $p=0,0052$). Nos ratos WKY, o DM promoveu um aumento não significativo na expressão de $p27^{Kip1}$ ($1,33 \pm 0,20$ vs $1,00 \pm 0,10$, % do controle, $p=0,31$). Estes achados sugerem que a diminuição na replicação de células glomerulares e a hipertrofia renal observada nos ratos SHR em fase de pré-hipertensão podem ser, pelo menos parcialmente, mediados por maior expressão do inibidor de quinases dependente de ciclina, $p27^{Kip1}$.

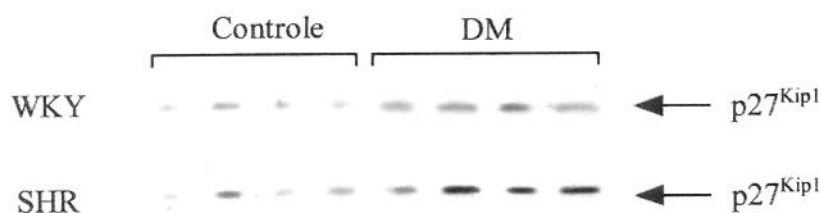
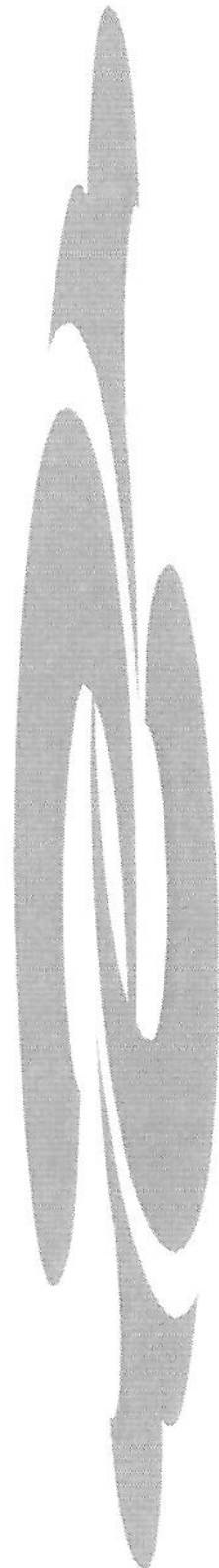


Figura 2: Western Blot para $p27^{Kip1}$ de proteína extraída de glomérulos isolados de ratos WKY e SHR controles e 10 dias após a indução do *diabetes mellitus* (DM). Cada banda representa um “pool” de glomérulos isolados de 3-4 animais (15 e 30 μ g de proteína foram utilizados, respectivamente).



5. DISCUSSÃO

Se a hiperglicemia fosse exclusivamente responsável pelo desenvolvimento da doença renal diabética, seria esperado que quanto maior o tempo de exposição ao ambiente diabético, maior a chance de desenvolver nefropatia diabética. Entretanto, isso não é inteiramente verdade. Estudos mostraram que em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 (insulino-dependentes) e com tempo de duração da doença maior que 30 anos, o risco de desenvolver nefropatia diabética é relativamente pequeno (BORCH-JOHNSEN, ANDERSEN, DECKERT, 1985; KROLEWSKI *et al.*, 1985). Muitas linhas de evidências sugerem que a susceptibilidade à nefropatia diabética pode estar relacionada à predisposição à hipertensão (KROLEWSKI *et al.*, 1988; MANGILI *et al.*, 1988; LOPES DE FARIA *et al.*, 1992). Entretanto, pouco progresso tem sido feito para entender o mecanismo da associação da predisposição à hipertensão e susceptibilidade à doença renal diabética.

As alterações estruturais decorrentes da nefropatia diabética, incluem hipertrofia renal, espessamento da membrana basal e acúmulo glomerular progressivo de componentes da matriz extracelular (ZIYADEH, 1993). A glomerulopatia diabética avançada é comumente caracterizada por glomerulosclerose difusa e pode ocasionalmente exibir uma aparência morfológica distinta, com formação de nódulos (glomerulosclerose nodular), descrita por Kimmelstiel e Wilson (KIMMELSTIEL & WILSON, 1936). Estudos morfométricos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 mostram que a alteração renal mais precoce é um aumento generalizado do órgão (MOGENSEN, ANDERSEN, DENMARK, 1973; OSTERBY, 1972). Estudo de ZIYADEH (1993) em animais com *diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina mostrou que a hipertrofia glomerular e o espessamento da membrana basal estão entre as alterações morfológicas mais precoces. Além disso, a hipertrofia túbulo-epitelial e da membrana basal tubular também ocorrem muito precocemente no curso da doença renal diabética e são provavelmente os precursores de mudanças tardias irreversíveis na arquitetura túbulo-intersticial, levando à atrofia tubular e fibrose intersticial (ZIYADEH, 1993; SEYER-HANSEN, 1983). O desenvolvimento de mudanças renais no *diabetes mellitus*, como a glomerulosclerose e a fibrose túbulo-intersticial são sempre precedidos por processos hipertróficos precoces nos compartimentos glomerular e tubular (ZIYADEH, 1993). Outros autores (MAUER *et al.*, 1984; WOLF &

ZIYADEH, 1999) também mostraram que a hipertrofia renal e glomerular ocorre logo após o aparecimento do *diabetes mellitus*, precedendo o desenvolvimento da glomerulosclerose.

Neste presente estudo, observou-se que, quando comparados aos ratos geneticamente normotensos WKY, os ratos SHR jovens diabéticos e ainda normotensos mostram uma redução na replicação de células renais glomerulares e túbulo-intersticiais acompanhada de uma hipertrofia renal mais pronunciada. Sugeriu-se também que o aumento na expressão de um inibidor de CDK, o p27^{Kip1}, verificado nos glomérulos de ratos SHR diabéticos, possa explicar parcialmente a diminuição na replicação de células glomerulares observada nos ratos SHR diabéticos em fase pré-hipertensão. Estas observações são importantes para o melhor entendimento do mecanismo que associa a predisposição à hipertensão e a nefropatia diabética, além de, eventualmente, contribuírem para a identificação de marcadores precoces da susceptibilidade à nefropatia diabética.

Estudo anterior (COOPER *et al.*, 1988) demonstrou que ratos SHR com *diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina apresentam nefropatia mais grave que os WKY diabéticos. Entretanto, neste estudo os ratos já manifestavam o fenótipo hipertensão, o que pode ter contribuído para a maior gravidade da nefropatia nos ratos SHR diabéticos.

Recentemente, têm-se acumulado evidências que sugerem que no *diabetes mellitus*, a hipertrofia glomerular é secundária à hipertrofia celular, mais que a hiperplasia (KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; HANNKEN *et al.*, 2000). Em cultura de células mesangiais, tem sido demonstrado que altas concentrações de glicose inibem replicação celular (COSIO, 1995), porém há estudos que indicam o contrário (WOLF *et al.*, 1992). No *diabetes mellitus* experimental, apesar de um aumento precoce na replicação de células glomerulares (YOUNG *et al.*, 1995) e tubulares (RASCH & NORGAARD, 1983) ser observado, este é seguido por uma interrupção do ciclo celular e concomitante hipertrofia (WOLF *et al.*, 1997; KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; AL-DOUAHJI *et al.*, 1999; HANNKEN *et al.*, 2000). O mecanismo molecular pelo qual altas concentrações de glicose induz hipertrofia celular tem sido mais recentemente explicado. A atividade da quinase do complexo ciclina-CDK é essencial para guiar as células pelo ciclo celular (HARTWELL & WEINERT, 1989). Pequenas proteínas chamadas inibidores de CDK regulam negativamente os complexos ciclina-CDK. Estas pequenas proteínas se

ligam ao complexo ciclina-CDK e inibem a sua atividade de quinase (GRANA & REDDY, 1995; SHERR & ROBERTS, 1995; PETER & HERSKOWITZ, 1994). A consequência é a parada do ciclo celular na fase G1, podendo a célula sofrer hipertrofia (WOLF *et al.*, 1997; KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; WOLF *et al.*, 1998). Têm sido demonstrado que altas concentrações de glicose e a hiperglicemia aumentam a expressão dos inibidores de CDK p27^{Kip1} e p21^{Cip1} em cultura de células mesangiais (WOLF *et al.*, 1997; HANNKEN *et al.*, 2000), e *in vivo* em diferentes modelos animais de diabetes (KUAN, AL-DOUAHJI, SHANKLAND, 1998; AL-DOUAHJI *et al.*, 1999; WOLF *et al.*, 1998). Têm sido sugerido que os efeitos de altas concentrações de glicose na hipertrofia renal, replicação celular e inibidores de CDK são mediados por TGF- β (WOLF *et al.*, 1992; SHANKLAND & SCHOLEY, 1994) e por angiotensina II (WOLF *et al.*, 1999; WOLF & STAHL, 1996; WOLF & ZIYADEH, 1997). Também em experimentos com transgênicos, tem sido recentemente demonstrado que a presença do p21^{Cip1} é uma condição necessária para o desenvolvimento da hipertrofia glomerular e proteinúria em camundongos diabéticos (AL-DOUAHJI *et al.*, 1999).

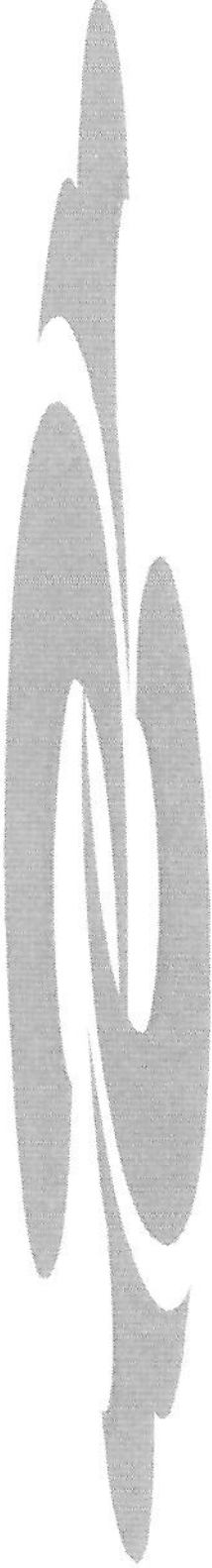
No presente trabalho demonstrou-se pela primeira vez que a genética da hipertensão pode antecipar e modificar algumas das anormalidades descritas acima, envolvidas na patogênese da doença renal diabética (revisado por SHANKLAND & WOLF, 2000). O exato mecanismo pelo qual a genética da hipertensão afeta a resposta celular renal à hiperglicemia ainda não está claro. Entretanto é provável que anormalidades na replicação celular determinadas geneticamente e sua regulação estão envolvidos neste processo. Foi demonstrado que cultura de células mesangiais obtidas de ratos não diabéticos em fase pré-hipertensão, com 4 semanas de idade, proliferam mais rápido do que as mesmas células obtidas de seus controles geneticamente normotensos, os ratos WKY (LOPES DE FARIA, ZOUKHRI, LORENZI, 1997). De acordo com este estudo *in vitro*, nós recentemente observamos que o número de células glomerulares em replicação *in vivo*, estimado pela incorporação de BrdU é significativamente maior em ratos SHR pré-hipertensão com 4 semanas de idade que em seus controles WKY (LOPES DE FARIA & SILVEIRA, 2001). HAMAGUCHI *et al.* (1995) sugeriram que o glomérulo e outras estruturas de ratos SHR hipertensos apresentam um maior número de células em processo de replicação que células dos ratos controles WKY, e que o número é reduzido pelo

tratamento anti-hipertensivo, entretanto os investigadores não indicaram se o tratamento corrigiu completamente o aumento na replicação celular observado nos SHR.

Estas observações de eventos celulares precoces encontrados nos ratos SHR em fase pré-hipertensão também podem ser relevantes para estudos visando a prevenção do desenvolvimento da doença renal diabética em indivíduos com predisposição à hipertensão. Para isto, tem sido demonstrado que o uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina em um modelo de *diabetes mellitus* espontâneo é capaz de reduzir a expressão glomerular de inibidores de CDK, como o p16^{INK4} e o p27^{Kip1} (WOLF *et al.*, 1999).

Para um futuro próximo, pretende-se estudar o efeito da inibição do p27^{Kip1} na replicação celular renal. Ainda está sob investigação a melhor abordagem para este experimento, porém uma hipótese seria através do uso de enalapril, um inibidor de enzima de conversão de angiotensina, como citado em estudo de WOLF e colaboradores (1999). A expressão de outro inibidor de CDK, o p21^{Cip1} nos glomérulos de ratos SHR também será verificada por Western blot, assim como seu possível papel regulador na replicação celular renal. Também visando um estudo de maior longo prazo, pretende-se testar a resposta na replicação celular renal e o envolvimento de proteínas reguladoras do ciclo celular no *diabetes mellitus* abordado em diferentes tempos de duração da doença.

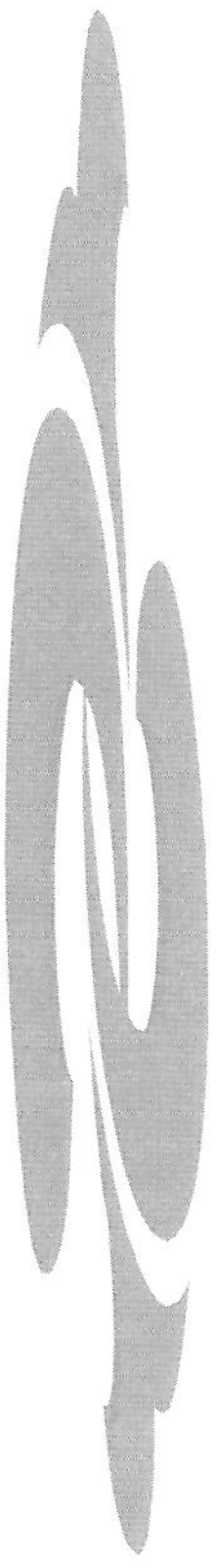
Em resumo, este estudo demonstrou que a indução do *diabetes mellitus* por 10 dias em ratos SHR pré-hipertensão, um modelo animal de hipertensão arterial essencial, leva à uma redução na replicação de células renais, maior hipertrofia renal e aumento na expressão glomerular de um inibidor de CDK, o p27^{Kip1}. Estes resultados poderão ajudar a melhor compreender os mecanismos que associam a predisposição à hipertensão e susceptibilidade à doença renal diabética.



6. CONCLUSÕES

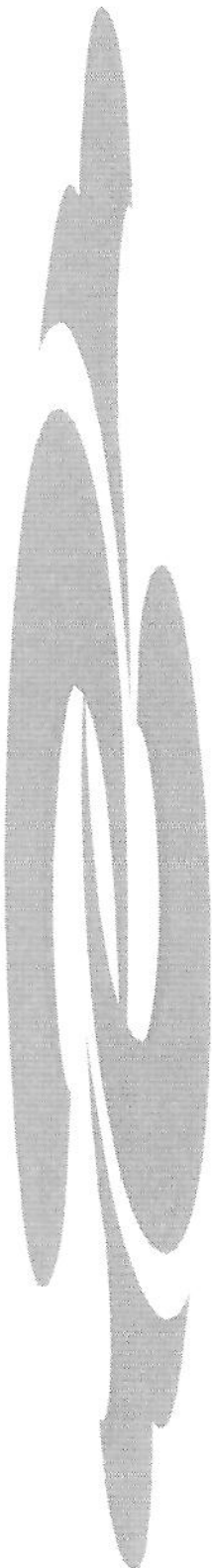
- O número de células BrdU positivas (replicação) tanto em glomérulos quanto em túbulo-interstício em rim de ratos geneticamente hipertensos (SHR), porém em fase pré-hipertensão, foi marcadamente reduzido 10 dias após a indução do *diabetes mellitus* experimental por estreptozotocina quando comparados aos seus controles não-diabéticos.

- A expressão da proteína de um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK), o p27^{Kip1}, foi significativamente maior nos ratos SHR diabéticos 10 dias após a injeção de estreptozotocina quando comparados aos controles não-diabéticos, sugerindo que o aumento desta proteína seja parcialmente responsável pela menor replicação de células glomerulares e eventualmente maior hipertrofia renal observada nestes animais.



7. SUMMARY

To investigate if the genetics of hypertension modifies the renal cell events in experimental *diabetes mellitus* we studied the renal cell replication and its regulation by a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, p27^{Kip1}, in pre-hypertensive spontaneously hypertensive rats (SHR) and their genetically normotensive counterparts, Wistar Kyoto (WKY) rats with streptozotocin induced *diabetes mellitus*. Animals received streptozotocin injection at 4 weeks of age and the experiments were performed after 10 days of duration of diabetes. The number of replicating cells was assessed by incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU), a thymidine analogue that incorporates to DNA in S phase, using immunohistochemistry technique. In the diabetic SHR glomerular and tubulointerstitial cells was significantly lower than in the SHR control rats, positive cell/50 glomeruli: 0.6 ± 0.3 vs 13.2 ± 1.7 ($p < 0.05$) and positive tubulointerstitial cells/50 grid fields (0.02 mm^2): 2.8 ± 0.6 vs 48.6 ± 9.7 ($p < 0.05$). By contrast, in the WKY rats, there was no difference in the number of replicating renal cells in control and diabetic rats (14.0 ± 1.8 vs 14.3 ± 3.5 and 63.9 ± 10.6 vs 66.4 ± 11.5 , for glomerular and tubulointerstitial cells, respectively). The kidney weight increased significantly in both diabetic strains, however the weight of diabetic SHR kidney was significantly higher than in the diabetic WKY rats (0.55 ± 0.02 g vs 0.51 ± 0.01 g, kidney weight/body weight, $p < 0.05$). In freshly isolated glomeruli the level of p27^{Kip1} as detected by Western blots was significantly higher in the diabetic SHR rats than in the non-diabetic SHR (1.52 ± 0.14 vs 1.00 ± 0.10 , % of control, $p = 0.0052$). In conclusion, the response of renal cell replication to *diabetes mellitus* differs markedly between pre-hypertensive SHR and their controls, WKY rats. It is possible that the decreased glomerular cell replication and renal hypertrophy observed in the pre-hypertensive diabetic SHR are at least partly mediated by higher expression of the CDK inhibitor p27^{Kip1}.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, S. - Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **5**: 1165-1172, 1994.
- AL-DOUAHJI, M.; BRUGAROLAS, J.; BROWN, P. A. J.; STEHMAN-BREEN, C. O.; ALPERS, C. E.; SHANKLAND, S. J. - The cyclin kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1} is required for glomerular hypertrophy in experimental diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, **56**: 1691-1699, 1999.
- AWAZU, M.; ISHIKURA, K.; HIDA, M.; HOSHIYA, N. - Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **10**: 738-745, 1999.
- BRADFORD, M. M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.
- BOERWINKLE, E.; TURNER, S., T.; WEINSHILBOUM, R.; JOHNSON, M.; RICHELSON, E.; SING, C., F. - Analysis of the distribution of erythrocyte sodium lithium countertransport in a sample representative of the general population. **Genet. Epidemiol.**, **3**:365-378, 1986.
- BORCH-JOHNSEN, K.; ANDERSEN P. K.; DECKERT T. - The effect of proteinuria on relative mortality in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, **28**: 590-596, 1985.
- BORCH-JOHNSEN, K.; NISSEN, R. N.; NERUP, J. - Blood pressure after 40 years of insulin-dependent diabetes. **Diabetic Nephrop.**, **4**: 11-12, 1985.
- BRENNER, B. M. - Hemodinamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. **Kidney Int.**, **23**: 647-655, 1983.
- CANESSA, M.; ADRAGNA, N.; SOLOMON, H. S.; CONNOLLY, T., M.; TOSTESON, D. C. - Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. **N. Eng. J. Med.**, **302**:772-776, 1980.
- CLUBB JR, F. J.; BELL, P. D.; KRISEMAN, J. D.; BISHOP, S. P. - Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. **Lab. Invest.**, **56**: 189-197, 1987.

- COOPER, M. E.; ALLEN, T. J.; O'BRIEN, R. C.; MACMILLAN, P. A.; CLARKE, B.; JERUMS, G.; DOYLE, A. E. - Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat: functional and structural characteristics. **J. Hypertens.**, 6: 1009-1016, 1988.
- COSIO, F. G. - Effects of high glucose concentrations on human mesangial cell proliferation. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 5: 166-1609, 1995.
- COWIE, C. C.; PORT, F. K.; WOLFE, R. A.; SAVAGE, P. J.; MOLL, P. P.; HAWTHORNE, V. W. - Disparities in incidence of diabetic end-stage renal disease according to race and type of diabetes. **N. Eng. J. Med.**, 321: 1074-1079, 1989.
- DADONE, M. M.; HASSTEDT, S. J.; HUNT, S., C.; SMITH, J. B. ASH, K. O.; WILLIAMS R. R. - Genetic analysis of sodium-lithium countertransport in 10 hypertension-prone kindreds. **Am. J. Med. Genet.**, 17:565-577, 1984.
- THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT) RESEARCH GROUP - Effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Eng. J. Med.**, 329: 977-986, 1993.
- FIORETTO, P.; STEFFES, M. W.; SUTHERLAND, D. E.; GOETZ, F. C.; MAUER, M. - Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. **N. Eng. J. Med.**, 39: 69-75, 1998.
- GALL, M. A.; ROSSING, P.; SKOTT, P.; DAMSBO, P.; VAAG, P.; BECH, K.; DEJGAARD, A.; LAURITZEN, M.; LAURITZEN, E.; HOUGAARD, P. - Prevalence of micro- and macro-albuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients. **Diabetologia**, 34: 655-666, 1991.
- GRANA, X. & REDDY, E. P. - Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinases inhibitors (CKIs). **Oncogene**, 11: 211-219, 1995.

- HAMAGUCHI, A.; LIM, S.; OHTA, K.; YAGI, K.; YUKIMURA, T.; MIURA, K.; FUKUDA, T.; IWAIO, H. - Transforming growth factor- β 1 expression and phenotypic modulation in the kidney of hypertensive rats. **Hypertension**, **26**: 199-207, 1995.
- HANEDA, M.; ARAKI, S.; TOGAWA, M.; SIGIMOTO, T.; ISONO, M.; KIKKAWA, R. - Activation of mitogen-activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial cells cultured under high glucose conditions. **Kidney Int.**, **51** (Suppl 60): S66-S69, 1997.
- HANNKEN, T.; SCHROEDER, R.; ZAHNER, G.; STAHL, R. A. K.; 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.**, **11**: 1387-1397, 2000.
- HANNON, G. J. & BEACH, D. - p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta induced cell-cycle arrest. **Nature**, **371**: 257-261, 1994.
- HARMS, G.; GOOR, H.; KOUDSTAAL, J.; LEY, L.; HARDONK, M. J. - Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromodeoxyuridine in frozen and plastic embedded sections. **Histochemistry**, **85**: 139-143, 1986.
- HARPER, J. W.; ADAMI, G. R.; WEI, N.; KEYOMARSI, K.; ELLEDGE S. J. - The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, **75**: 805-816, 1993.
- HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J.; KEYOMARSI, K.; DYNLACHT, B.; TSAI, L. H.; ZHANG, P.; DOBROWOLSKI, S.; BAI, C.; CONNEL-CROWLEY, L.; SWINDELL, E. - Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. **Mol. Biol. Cell.**, **6**: 387-400, 1995.
- HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. - Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, **246**: 629-634, 1989.
- HOSTETTER, T. H.; TROY, J. L.; BRENNER, B. M. - Glomerular hemodynamics in experimental diabetes. **Kidney Int.**, **19**: 410-415, 1981.

- INGRAM, A. J. & SCHOLEY, J. W. - Protooncogene expression and diabetic kidney injury. **Kidney Int.**, **51** (Suppl. 60): S70-S76, 1997.
- KIMMELSTIEL, P. & WILSON, C. - Inter-capillary lesions in glomeruli of the kidney. **Am. J. Pathol.**, **12**: 83-97, 1936.
- KROLEWSKI, A. S.; CANESSA, M.; WARRAM, J. H.; LAFFEL, L. M. B.; CHRISTLIEB, R.; KNOWLER, W. C.; RAND, L. I. - Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Eng. J. Med.**, **318**: 140-145, 1988.
- KROLEWSKI, A. S.; WARRAM, J. H.; CHRISTLIEB, A. R.; BUSICK, E. J.; KAHN, C. R. - The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. **Am. J. Med.**, **78**: 785-794, 1985.
- KUAN, C. J.; AL-DOUAHJI, M.; SHANKLAND, S. J. - The cyclin kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1} is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **9**: 986-993, 1998.
- LOPES DE FARIA, J. B. - Tratamento conservador da nefropatia diabética. In: CRUZ, J.; BARROS, R. T.; SESSO, R. C. C. - **Atualidades em nefrologia 3**. São Paulo. Sarvier, 1994. P.202-211.
- LOPES DE FARIA, J. B.; FRIEDMAN, R.; TARIQ, T.; VIBERTI, G. C. - Prevalence of raised sodium-litium countertransport activity in type 1 diabetic patients. **Kidney Int.**, **41**: 877-882, 1992.
- LOPES DE FARIA, J. B. & SILVEIRA, L. A. - Increased renal cell proliferation in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. **Nephron**, 2001 [In press].
- LOPES DE FARIA, J. B.; ZOUKHRI, D.; LORENZI, M. - Mesangial cell abnormalities in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. **Kidney Int.**, **52**: 387-392, 1997.

- LYNCH, D. A. F.; CLARKE, A. M. T.; JACKSON, P.; AXON, A. T. R.; DIXON, M. F.; QUIRKE, P. - Comparison of labelling by bromodeoxyuridine, MIB-1, and proliferating cell nuclear antigen in gastric mucosal biopsy specimens. **J. Clin. Pathol.**, **47**: 122-125, 1994.
- MAHNENSMITH, R. L. & ARONSON, P. S. - The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. **Circ. Res.**, **56**: 773-788, 1985.
- MAKITA, Z.; RADOFF, S.; RAYFIELD, E. J.; YANG, Z.; SKOLNIK, E.; DELANEY, V.; FRIEDMAN, E. A.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. - Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. **N. Eng. J. Med.**, **325**: 836-842, 1991.
- MANGILI, R.; BENDING, J. J.; SCOTT, G.; LI, L. K.; GUPTA, A.; VIBERTI, G. C. - Increased sodium-lithium countertransport activity in red cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. **N. Eng. J. Med.**, **318**: 146-150, 1988.
- MAUER, S., M. - Structural-functional correlations of diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, **45**: 612-622, 1994.
- MAUER, S. M.; STEFFES, M. W.; ELLIS, E. N.; SUTHERLAND, D. E. R.; BROWN, D. M.; GOETZ, F. C. - Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **J. Clin. Invest.**, **74**: 1143-1155, 1984.
- MOGENSEN, C. E.; ANDERSEN, M. J. F.; DENMARK, A. - Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. **Diabetes**, **22**: 706-712, 1973.
- MOGENSEN, C. E. & CHRISTENSEN, C. K. - Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. **N. Eng. J. Med.**, **311**: 89-93, 1984.
- MOGYORÓSI, A. & ZIYADEH, F. N. - Update in pathogenesis, markers and management of diabetic nephropathy. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, **5**: 243-254, 1996.
- MORGAN, D. O. - Principles of CDK regulation. **Nature**, **374**: 131-134, 1995.
- MURRAY, A. & HUNT, T. - The cell cycle. An introduction. New York: Oxford Univ. Press, 1993.

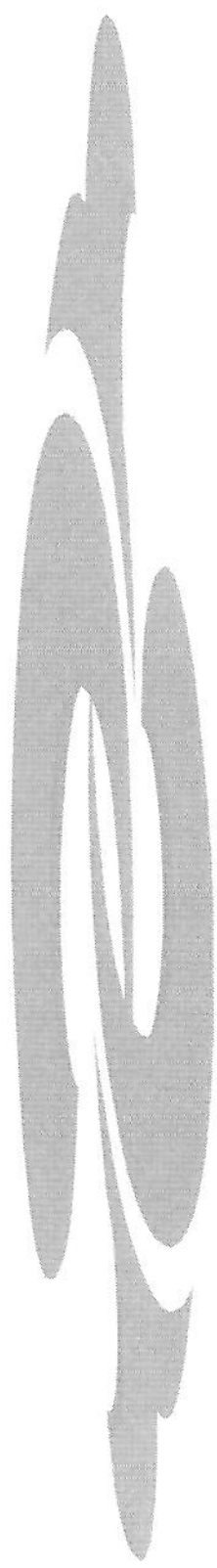
- NELSON, R. G.; KUNZELMAN, C. L.; PETTITT, D. J.; SAAD, M. F.; BENNETT, P. H.; KNOWLER, W. C. – Albuminuria in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Pima Indians. **Diabetologia**, **32**: 870-876, 1989.
- NG, L. L.; QUINN, P. A.; BAKER, F.; CARR, S. J. - Red cell Na^+/Li^+ countertransport and Na^+/H^+ exchanger isoforms in human proximal tubules. **Kidney Int.**, **58**: 229-235, 2000.
- OAKLEY, W. G.; PYKE, D. A.; TATTERSALL, R. B.; WATKINS, P. J. - Long-term diabetes: a clinical study of 92 patients after 40 years. **Q. J. Med.**, **43**: 145-156, 1974.
- OKAMOTO, K.; TABEL, R.; FUKUSHIMA, M.; NOSAKA, S.; YAMORI, Y.; ICHIJIMA K, HAEBARA, H.; MASTUMOTO, M.; MARUYAMA, T.; SUZUKI, Y.; TAMEGAI, I. M. - Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, **30**: 703-716, 1966.
- OSTERBY, R. – Morphometric studies of the peripheral glomerular basement membrane in early juvenile diabetes I. Development of initial basement membrane thickening. **Diabetologia**, **8**: 84-92, 1972.
- OSTERBY, R. & GUNDERSEN, H. J. G. - Glomerular size and structure in diabetes mellitus. **Diabetologia**, **11**: 451-456, 1975.
- PARVING, H. H.; OSTERBY, R.; ANDERSON, P. W.; HSUEH, W. A. – Diabetic nephropathy. In: BRENNER, B. M. – **The kidney**. 5th ed. Philadelphia. WB Saunders Co, 1996.
- PARVING, H. H.; SMIDT, U. M.; FRISBERG, B.; BONNEVIE-NIELSEN, V.; ANDERSEN, A. R. - A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin-dependent diabetes with diabetic nephropathy. **Diabetologia**, **20**: 457-461, 1981.
- PETER, M.; HERSKOWITZ, I. - Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. **Cell**, **79**: 181-184, 1994.

- POLYAK, K.; KATO, J. Y.; SOLOMON, M. J.; SHERR, C. J.; MASSAGUE, J.; ROBERTS, J. M.; KOFF, A. – p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes Dev.**, **8**: 9-22, 1994.
- RASCH, R.; NORGAARD, J. O. R. -Renal enlargement: comparative autoradiographic studies of ³H-thymidine uptake in diabetic and uninephrectomized rats. **Diabetologia**, **25**: 280-287, 1983.
- SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. – A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, **366**: 704-707, 1993.
- SEYER-HANSEN, K - Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus. **Kidney Int.**, **23**: 643-646, 1983.
- SHANKLAND, S. J. - Cell cycle control and renal disease. **Kidney Int.**, **52**: 294-308, 1997.
- SHANKLAND, S. J.; HUGO, C.; COATS, S. R.; NANGAKU, M.; PICHLER, R. H.; GORDON, K. L.; PIPPIN, J.; ROBERTS, J. M.; COUSER, W. G.; JOHNSON, R. J. - Changes in cell cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. **Kidney Int.**, **50**: 1230-1239, 1996.
- SHANKLAND, S. J.; PIPPIN, J.; FLANAGAN, M.; COATS, S. R.; NANGAKU, M.; GORDON, K. L.; ROBERTS, J. M.; COUSER, W. G.; JOHNSON, R. J. - Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27^{Kip1}. **Kidney Int.**, **51**: 1088-1099, 1997.
- SHANKLAND, S. J.; SCHOLEY, J. W. - Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. **Kidney Int.**, **47**: 782-788, 1995.
- SHANKLAND, S. J.; SCHOLEY, J. W. - Expression of transforming growth factor-β1 during diabetic renal hypertrophy. **Kidney Int.**, **46**: 430-442, 1994.
- SHANKLAND, S. J. & WOLF, G. - Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, **278**: F515-F529, 2000.

- SHARMA, K.; JIN, Y.; GUO, J.; ZIYADEH, F. N. - Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. **Diabetes**, **45**: 522-530, 1996.
- SHARMA, K & ZIYADEH, F. N. - Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. **Am. J. Physiol.**, **267**: F1094-F2001, 1994.
- SHERR, C. J. - G1 fase progression: cyclin on cue **C. Cell**, **79**: 551-444, 1994.
- SHERR, C. J. & ROBERTS, J. M. - Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, **Gene Dev.**, **9**: 1149-1163, 1995.
- SHERR, C. J. - Mammalian G1 cyclins. **Cell**, **73**: 1059-1065, 1993.
- STEFFES, M. W.; BILOUS, R. W.; SUTHERLAND, D. E. R.; MAUER, S. M. - Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type 1 diabetes. **Diabetes**, **41**: 679-684, 1992.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP - Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, **352**: 837-853, 1998.
- VIBERTI, G. C.- Mechanisms os diabetic renal and cardiovascular disease. **Acta Diabetol. Lat.**, **27**: 267-276, 1990.
- VIBERTI, G. C.; BILOUS, R. W.; MACKINTOSH, D.; BENDING, J. J.; KEEN, H. - Long term correction of hyperglycaemia and progression of renal failure in insulin-dependent diabetes. **Br. Med. J.**, **286**: 598-602, 1983.
- VIBERTI, G. C.; KEEN, H.; WISEMAN, M. J. - Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin-dependent diabetics. **Br. Med. J.**, **295**: 515-517, 1987.
- WEDER, A. B. - Red-cell lithium-sodium countertransport and renal lithium clearance in hypertension. **N. Eng. J. Med.**, **314**: 198-201, 1986.

- WILMER, W. A. & COSIO, F. G. - DNA binding of activator protein-1 is increased in human mesangial cells cultured in high glucose concentrations. **Kidney Int.**, **53**: 1172-1181, 1998.
- WOLF, G.; SCHROEDER, R.; THAISS, F.; ZIYADEH, F. N.; HELMCHEN, U.; STAHL, R. A. K. - Glomerular expression of p27^{Kip1} in diabetic db/db mouse: Role of hyperglycemia. **Kidney Int.**, **53**: 869-879, 1998.
- WOLF, G.; SCHROEDER, R.; ZIYADEH, F. N.; THAISS, F.; ZAHNER, G.; STAHL, R. A. K. - High glucose stimulates expression of p27^{Kip1} in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. **Am. J. Physiol.**, **273**: F348-F356, 1997.
- WOLF, G.; SHARMA, K.; CHEN, Y.; ERICKSEN, M.; ZIYADEH, F. N. - High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . **Kidney Int.**, **42**: 647-656, 1992.
- WOLF, G. & STAHL, R. A. K. - Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK₁ cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. **Kidney Int.**, **50**: 2112-2119, 1996.
- WOLF, G.; WENZEL, U.; ZIYADEH, F. N.; STAHL, R. A. K. - Angiotensin converting-enzyme inhibitor treatment reduces glomerular p16^{INK4} and p27^{Kip1} expression in diabetic BBdp rats. **Diabetologia**, **42**: 1425-1432, 1999.
- WOLF, G. & ZIYADEH, F. N. - Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. **Kidney Int.**, **56**: 393-405, 1999.
- WOLF, G. & ZIYADEH, F. N. - The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamics mechanisms. **Am. J. Kidney Dis.**, **29**: 153-163, 1997
- WOODS, J. W. & WATSON, B. S. - Red-cell lithium-sodium countertransport in sons of normotensive and hypertensive parents: a follow-up study. **N. Eng. J. Med.**, **310**: 1191, 1984.
- YAMAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; NOBLE, N. A.; RUOSLAHTI, E.; BORDER, W. - Expression of transforming growth factor β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 1814-1818, 1993.

- YOUNG, B. A.; JOHNSON, R. J.; ALPERS, C. E.; ENG, E.; GORDON, K.; FLOEGE, J.; COUSER, W.G. - Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, **47**: 935-944, 1995.
- ZHANG, P.; LIEGEOIS, N. J.; WONG, C.; FINEGOLD, M.; HOU, H.; THOMPSON, J. C.; SILVERMAN, A.; HARPER, J. W.; DEPINHO, R. A.; ELLEDGE, S. J. - Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57^{Kip2} indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nature**, **387**: 151-158, 1997.
- ZIYADEH, F. N. - The extracellular matrix in diabetic nephropathy. **Am. J. Kidney Dis.**, **22**: 736-744, 1993.
- ZIYADEH, F. N. & SHARMA, K. - Role of transforming growth factor-beta in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. **Kidney Int.**, **51**: S34-S36, 1995.
- ZIYADEH, F. N.; HOFFMAN, B. B.; HAN, D. C.; IGLESIAS-DE LA CRUZ, M. C.; HONG S. W.; ISONO, M.; CHEN, S.; MCGOWAN, T. A.; SHARMA, K. - Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 8015-8020, 2000.



9. *ANEXOS*

Tabela 2. Número de células BrdU positivas (replicação) em glomérulos de ratos WKY e SHR, controles (cont) e 10 dias após a indução do *diabetes mellitus* (DM). Quantificação por experimento realizado.

Grupos	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	Média ± EP
	1	2	3	4	
SHR cont 1	8	9	12		9.7±1.2
SHR cont 2	14	13	17		14.7±1.2
SHR cont 3	19	13	11		14.3±2.4
SHR cont 4	12	9			10.5±1.5
SHR cont 5	12	17	14		14.3±1.4
SHR cont 6	16	23	25		21.3±2.7
SHR cont 7	3	10	11		8.0±2.5
SHR DM 1	1	0	0		0.3±0.3
SHR DM 2	2	1			1.5±0.5
SHR DM 3	0	0	0	0	0±0
SHR DM 4	2	1	2	1	1.5±0.3
SHR DM 5	0	0	0	0	0±0
SHR DM 6	0	0	0	0	0±0
SHR DM 7	1	1	-		1.0±0
WKY cont 1	8	10	10		9.3±0.7
WKY cont 2	23	22	23		22.7±0.3
WKY cont 3	21	16	15		17.3±1.8
WKY cont 4	13	17	18		16.0±1.5
WKY cont 5	10	13	13		12.0±1.0
WKY cont 6	7	12	15		11.3±2.3
WKY cont 7	8	10	11		9.7±0.9
WKY DM 1	29	27	36		30.7±2.7
WKY DM 2	26	19	12		19.0±4.0
WKY DM 3	11	11	5	11	9.5±1.5
WKY DM 4	8	28			18.0±10.0
WKY DM 5	2	2	3		2.3±0.3
WKY DM 6	6	17	17		13.3±3.7
WKY DM 7	7	8			7.5±0.5

Tabela 3. Número de células BrdU positivas (replicação) em túbulo-interstício de ratos WKY e SHR, controles (cont) e 10 dias após a indução do *diabetes mellitus* (DM). Quantificação por experimento realizado.

Grupos	Experimento	Experimento	Experimento	Experimento	Média±EP
	1	2	3	4	
SHR cont 1	35	44	35		38.0±3.0
SHR cont 2	81	87	79		82.3±2.4
SHR cont 3	86	63	44		64.3±12.1
SHR cont 4	32	18			25.0±7.0
SHR cont 5	26	32	35		31.0±2.6
SHR cont 6	56	83	95		78.0±11.5
SHR cont 7	12	22	32		22.0±5.8
SHR DM 1	2	5	3		3.3±0.9
SHR DM 2	5	5			5.0±0.0
SHR DM 3	9	0	3	5	4.2±1.9
SHR DM 4	3	1	4	2	2.5±0.6
SHR DM 5	0	5	-	-	2.5±2.5
SHR DM 6	0	0	0	0	0.0±0.0
SHR DM 7	2	2	-		2.0±0
WKY cont 1	74	79	69		74.0±2.9
WKY cont 2	111	108	106		108.3±1.5
WKY cont 3	101	88	89		92.7±4.2
WKY cont 4	64	40	41		48.3±7.8
WKY cont 5	41	35	44		40.0±2.6
WKY cont 6	37	37	34		36.0±1.0
WKY cont 7	34	62	48		48.0±8.1
WKY DM 1	141	121	111		124.3±8.8
WKY DM 2	79	66	58		67.7±6.1
WKY DM 3	39	52	32	38	40.2±4.2
WKY DM 4	42	82			62.0±20.0
WKY DM 5	16	32	37		28.3±6.3
WKY DM 6	41	80	91		70.7±15.2
WKY DM 7	62	81			71.5±9.5

**Aumento na replicação de células renais em ratos espontaneamente hipertensos antes
do aparecimento da hipertensão**

(Trabalho aceito para publicação na revista "Nephron")

RESUMO

Introdução/Objetivos: Anormalidades na replicação celular tem sido implicadas nos mecanismos que associam predisposição à hipertensão e susceptibilidade à patologia glomerular. Para melhor compreender a relação entre predisposição à hipertensão e susceptibilidade à patologia glomerular, investigou-se a replicação celular renal e apoptose em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em fase pré-hipertensão e seus controles normotensos, os ratos Wistar Kyoto (WKY). *Material e Métodos:* Células em replicação foram estimadas pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina que se incorpora ao DNA na fase de síntese (S), permitindo sua identificação através de técnica de imunohistoquímica. A morte celular *in situ* foi detectada por imunohistoquímica usando o método de marcação com a enzima terminal deoxinucleotidil transferase. *Resultados:* O número de células BrdU positivas foi significativamente maior nos ratos SHR quando comparados aos ratos WKY, tanto em glomérulos: 16 ± 3 vs 7 ± 1 (células positivas/50 glomérulos) ($p=0,017$) quanto em túbulo-interstício: 129 ± 26 vs 54 ± 15 (células positivas/50 campos, retículo $0,02 \text{ mm}^2$) ($p=0,024$), para ratos SHR e WKY, respectivamente. O número de células em processo de apoptose foi semelhante nos dois grupos de ratos estudados. *Conclusão:* Estas observações podem ajudar na melhor compreensão dos mecanismos que associam a genética da hipertensão à predisposição à patologia glomerular.

INTRODUÇÃO

A susceptibilidade à doença renal diabética é variável em pacientes com *diabetes mellitus* (Borch-Johnsen, Andersen, Deckert, 1985). Tem sido sugerido que um importante componente para tal susceptibilidade é a predisposição à hipertensão (KROLEWSKI *et al.*, 1988; LOPES DE FARIA *et al.*, 1992). Recentemente demonstrou-se que fibroblastos oriundos de pacientes com nefropatia diabética e cultivados *in vitro* por várias gerações mostraram crescimento acelerado quando comparados à fibroblastos de pacientes sem nefropatia (LURBE *et al.*, 1996; TREVISAN *et al.*, 1992). Ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um modelo de hipertensão bastante usado (OKAMOTO & AOKI, 1963), desenvolvem esclerose glomerular mesmo quando o aparecimento da hipertensão arterial é prevenido através do uso de drogas anti-hipertensivas (FELD *et al.*, 1981). Têm sido demonstrado em cultura de células mesangiais obtidas de ratos SHR com 4 semanas de idade, portanto ainda normotensos, que estas células tem aumento na replicação quando comparado às células obtidas de seus controles geneticamente normotensos, os ratos Wistar Kyoto (WKY) (LOPES DE FARIA, ZOUKHRI, LORENZI, 1997). As anormalidades genéticas no crescimento celular descritas no diabetes em humanos e nos ratos SHR tem sido sugeridas como possíveis fatores que associam predisposição à hipertensão e susceptibilidade à patologia renal (LURBE *et al.*, 1996; TREVISAN *et al.*, 1992, LOPES DE FARIA, ZOUKHRI, LORENZI, 1997).

O objetivo do presente estudo foi investigar se o aumento na replicação das células mesangiais observadas nos ratos SHR em fase pré-hipertensão *in vitro* também ocorre *in vivo*, além disso, testar se existe diferença na morte celular programada (apoptose) nas células renais destes mesmos ratos SHR pré-hipertensos e os ratos controles WKY.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo para este estudo está de acordo com as normas para o cuidado e uso de animais de laboratório desta Universidade. Foram utilizados ratos WKY (n=8) e SHR (n=7) machos, com 4 semanas de idade, fornecidos pela Taconic (Germantown, NY, USA) e criados no biotério central da Unicamp. As determinações da pressão arterial sistólica (3-5 em cada rato) foram obtidas por pletismografia via caudal em ratos não anestesiados, usando um fisiógrafo MKIII (Narco Biosystem, Houston, EUA), de acordo com protocolo descrito no item 3.5. A replicação celular foi estimada pela incorporação da bromodeoxiuridina (BrdU), de acordo com descrição no item 3.6. Para a localização das células BrdU positivas, utilizou-se técnica de imunohistoquímica, como descrito no item 3.7 e quantificação de acordo com o item 3.8. Foram realizados 2-4 experimentos por animal e as médias utilizadas para análise estatística.

As células em processo de apoptose (TUNEL positivas) foram demonstradas através da detecção de fragmentos de DNA *in situ* (GAVRIELI, SHERMAN, BEN-SASSON, 1992). Os experimentos foram realizados nos mesmos tecidos de rins de ratos WKY e SHR com 4 semanas de idade utilizados na imunohistoquímica para BrdU. Cortes de 4 µm de espessura foram desparafinizados em xilol (3 banhos de 1 minuto cada), reidratados em etanol 100% (3 banhos de 1 minuto cada), 95% (1 banho de 1 minuto) e 70% (3 banhos de 1 minuto cada), em TA. Após recuperação antigênica através de fervura em ácido cítrico 0,01M pH 6,9 as lâminas foram incubadas com 6,2 µg/ml de proteinase K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, EUA) por 15 minutos em TA. Depois de bloqueada a atividade da peroxidase endógena, os cortes foram lavados em tampão TdT (Tris 30mM, cacodilato de sódio 140 mM, cloreto de cobalto 1 mM), pH 7,2, seguido por TdT (Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA) na diluição de 1:50 e Bio-dATP (Gibco BRL, Gand Island, EUA) na diluição de 1:50 em tampão TdT por 60 minutos, em TA. Núcleos marcados foram detectados com complexo avidina-biotina (Vectastain ABC, Vector, EUA) em PBS e DAB foi usado como substrato-cromógeno. Como controle positivo, foi incluída uma lâmina tratada com DNase (20 Kunitz U/ml; Sigma, St Lous, EUA). Realizou-se contracoloração com hematoxilina. Como o número de células em apoptose detectadas no

rim em condições normais é muito baixo, as células coradas foram quantificadas em 100 glomérulos e para a área tubulointersticial, 100 campos de um retículo de 0,02 mm².

Os dados apresentados representam a média±EP. O teste de Mann-Whitney U foi usado para avaliar diferenças entre os ratos SHR e WKY, e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Assim como observado por outros investigadores (IMIG *et al.*, 1993), ratos SHR com 4 semanas de idade são menores que os ratos WKY e tem pressão arterial mais elevada. O peso corpóreo foi 50 ± 2 g para os ratos SHR e 83 ± 10 g para os ratos WKY ($p = 0,0075$). A pressão arterial sistólica foi 120 ± 5 e 99 ± 3 mmHg ($p = 0,0047$) para SHR e WKY, respectivamente, documentando a ausência de hipertensão.

O número de células BrdU positivas foi significativamente maior nos ratos SHR quando comparados aos ratos WKY, tanto em glomérulos: 16 ± 3 vs 7 ± 1 (células positivas/50 glomérulos) ($p = 0,017$) quanto no túbulo-interstício: 129 ± 26 vs 54 ± 15 (células positivas/50 campos, retículo 0,02 mm²) ($p = 0,024$), para ratos SHR e WKY, respectivamente (figura 1 e gráfico 1). O número de células em processo de apoptose foi semelhante nos dois grupos de ratos estudados: 1.2 ± 0.5 vs 1.2 ± 0.3 (células positivas/100 glomérulos) e 10.5 ± 2.3 vs 7.3 ± 3.4 (células positivas/100 campos, retículo 0,02 mm²), para SHR e WKY, respectivamente (gráfico 2).

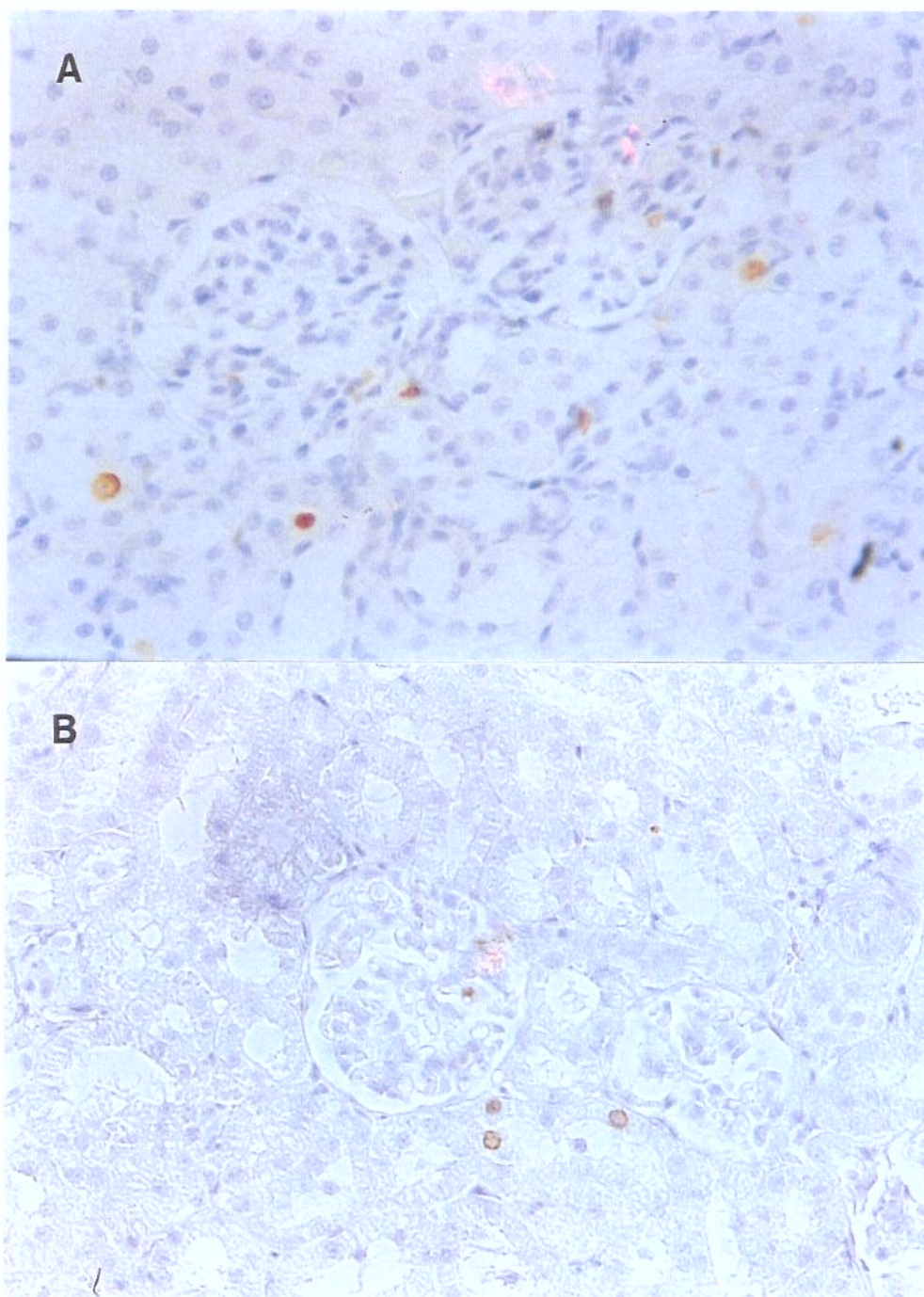


Figura 1: Imunohistoquímica para identificação de células BrdU positivas em corte histológico de rim de ratos com 4 semanas de idade. O número de células em replicação nos glomérulos e túbulo-interstício foi maior nos ratos SHR (A) quando comparado aos ratos WKY (B). Contracoloração com hematoxilina, aumento de 400X.

Gráfico 1. Número de células BrdU positivas (replicação) em glomérulos e túbulo-interstício de ratos WKY e SHR com 4 semanas de idade. Foram realizados 2-4 experimentos por animal e os valores representam a média±EP.

* $p=0,017$ e # $p=0,024$ vs WKY.

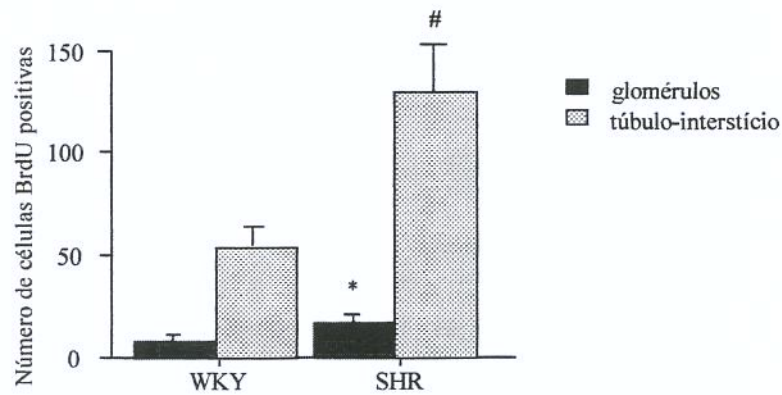
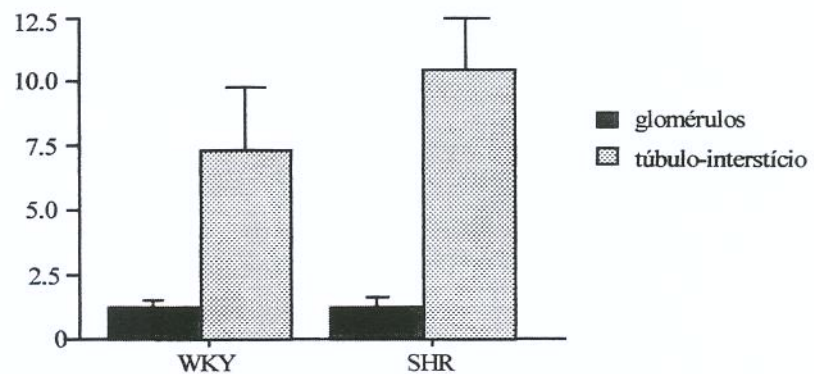


Gráfico 2 . Número de células TUNEL positivas (apoptose) em glomérulos e túbulo-interstício de ratos WKY e SHR com 4 semanas de idade. Os valores representam a média±EP.



DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que, quando comparados com os ratos geneticamente normotensos WKY, os ratos SHR com 4 semanas de idade e ainda normotensos exibem replicação celular renal acelerada e semelhante índice de morte celular programada (apoptose). Estas observações confirmam e complementam estudo prévio, que reportou aumento na replicação de células mesangiais em cultura, oriundas de ratos SHR com 4 semanas de idade (LOPES DE FARIA, ZOUKHRI, LORENZI, 1997). Estes achados podem ser relevantes para a melhor compreensão da predisposição à nefropatia diabética de indivíduos com uma história familiar de hipertensão (KROLEWSKI *et al.*, 1988). De fato, as observações obtidas de fibroblastos de pacientes diabéticos com nefropatia tem sugerido que anormalidades na regulação do crescimento celular determinadas geneticamente podem constituir um importante mecanismo para a susceptibilidade à patologia glomerular (LURBE *et al.*, 1996; TREVISAN *et al.*, 1992). Poderíamos dizer que, se este crescimento celular anormal se manifestasse nas células renais de indivíduos predispostos à hipertensão, assim como acontece nos ratos SHR em fase pré-hipertensão, isto poderia ter um papel importante na expansão de matriz extracelular, que eventualmente leva à nefropatia clínica. A contribuição seria não somente através da hiperplasia, mas também pelo aumento do depósito de matriz extracelular devido ao maior número de gerações celulares contribuintes, especialmente sob o efeito estimulatório de altos níveis de glicose. De fato, tem sido sugerido que o efeito de altas concentrações de glicose no aumento de componentes da matriz extracelular é observado não somente nas células glomerulares endoteliais, epiteliais e mesangiais (DANNE, SPIRO, SPIRO, 1993), mas também em células do túbulo-interstício, incluindo células epiteliais tubulares e fibroblastos corticais (JONES *et al.*, 1999). As observações do presente estudo no crescimento celular anormal no túbulo-interstício são de interesse, pois a fibrose túbulo-intersticial é a alteração morfológica renal que melhor se correlaciona com a diminuição na filtração glomerular em pacientes diabéticos (LANE *et al.*, 1993).

Para que se compreenda melhor o papel deste crescimento anormal nas células renais dos ratos SHR no *diabetes mellitus*, estudos com estes animais em fase pré-hipertensão e com *diabetes mellitus* induzido serão necessários. Para isto, tem sido demonstrado que ratos SHR com *diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina

manifestam características da nefropatia mais graves quando comparados aos ratos WKY diabéticos, ou aos ratos SHR controles (COOPER *et al.*, 1988). Entretanto, estes ratos foram estudados depois de prolongado tempo de duração do diabetes e já hipertensos, o que poderia estar contribuindo para a maior gravidade da doença nos ratos SHR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORCH-JOHNSEN, K.; ANDERSEN P. K.; DECKERT T. - The effect of proteinuria on relative mortality in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, **28**: 590-596, 1985.
- COOPER, M. E.; ALLEN, T. J.; O'BRIEN, R. C.; MACMILLAN, P. A.; CLARKE, B.; JERUMS, G.; DOYLE, A. E. - Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat: functional and structural characteristics. **J. Hypertens.**, **6**: 1009-1016, 1988.
- DANNE, T.; SPIRO, M. J.; SPIRO, R. G. - Effect of high glucose on type IV collagen production by cultured glomerular epithelial, endothelial, and mesangial cells. **Diabetes**, **42**: 170-177, 1993.
- FELD, L. G.; VAN LIEW, J. B.; BRENT JENS, J. R.; BOYLAN, J. W. - Renal lesions and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat made normotensive by treatment. **Kidney Int.**, **20**: 606-614, 1981.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, T.; BEN-SASSON, S. A. - Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, **119**: 493-501, 1992.
- IMIG, J. D.; FALCK, J. R.; GEBREMEDHIN, D.; HARDER, D. R.; ROMAN, R. J. - Elevated renovascular tone in young spontaneously hypertensive rats. Role of cytochrome P-450. **Hypertension**, **22**: 357-364, 1993.
- JONES, S. C.; SAUNDERS, H. J.; QI, W.; POLLOCK, C. A. - Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. **Diabetologia**, **42**: 1113-1119, 1999.

- KROLEWSKI, A. S.; CANESSA, M.; WARRAM, J. H.; LAFFEL, L. M. B.; CHRISTLIEB, R.; KNOWLER, W. C.; RAND, L. I. - Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Eng. J. Med.**, **318**: 140-145, 1988.
- LANE, P. H.; STEFFES, M. W.; FIORETTO, P.; MAUER, S. M. - Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. **Kidney Int.**, **43**: 661-667, 1993.
- LOPES DE FARIA, J. B.; FRIEDMAN, R.; TARIQ, T.; VIBERTI, G. C. - Prevalence of raised sodium-litium countertransport activity in type 1 diabetic patients. **Kidney Int.**, **41**: 877-882, 1992.
- LOPES DE FARIA, J. B.; ZOUKHRI, D.; LORENZI, M. - Mesangial cell abnormalities in spontaneously hypertensive rats before the onset of hypertension. **Kidney Int.**, **52**: 387-392, 1997.
- LURBE, A.; FIORETTO, P.; MAUER, M.; LAPOINTE, M. S.; BATLLE, D. - Growth phenotype of cultured skin fibroblasts from IDDM patients with and without nephropathy and overactivity of the Na^+/H^+ antiporter. **Kidney Int.**, **50**: 1684-1693, 1996.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. - Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J.**, **27**: 282-293, 1963.
- TREVISAN, R.; LI, L. K.; MESSENT, J.; TARIQ, T.; EARLE, K.; WALKER, J. D.; VIBERTI, G. C. - Na^+/H^+ antiport activity and cell growth in cultured skin fibroblasts of IDDM patients with nephropathy. **Diabetes**, **41**: 1239-1246, 1992.

