

*Ana Lúcia Mattar*

# **PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERFILTRAÇÃO GLOMERULAR EM RATOS DIABÉTICOS**

**Dissertação apresentada ao Departamento de  
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médica da  
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção  
do Título de Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Roberto Zatz**



1150017895



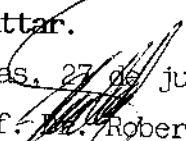
FCM  
T/UNICAMP M429p

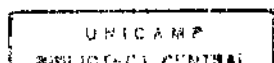
**São Paulo**

**1994**

Este exemplar corresponde à versão  
final da tese de Mestrado, apresentada  
à Faculdade de Ciências Médicas - U  
CAMP, para obtenção do Título de Me  
stre em Farmacologia da Farmacêutica  
**Ana Lúcia Mattar.**

Campinas, 27 de julho de 1994

Prof.  Roberto Zatz



À minha mãe Wilma, pelo seu amor e pela sua coragem  
para vencer os mais variados percalços.

Em memória de meu pai, Fause.

Ao meu marido, real companheiro de alegrias e tristezas,  
pela confiança e pelo apoio incondicional. Que seja esta a  
primeira de muitas realizações nossas feita a quatro mãos.

À minha filha Sofia, pelo seu sorriso.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Zatz, por seu conhecimento científico do qual tanto me beneficiei e por todo carinho e paciência sempre demonstrados.

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pelo apoio para ingressar no curso de pós-graduação do Departamento de Farmacologia da UNICAMP.

Agradeço à Clarice Kazue Fujihara e Miriam Oliveira Ribeiro pela disposição em me orientar no decorrer deste trabalho e pela amizade.

Agradeço à Biologista Regina Maria Padilha pela inestimável assistência prestada.

Agradeço aos colegas do curso de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pela simpatia e orientações recebidas durante todo o curso de mestrado.

Agradeço aos profissionais e colegas do Laboratório de Fisiopatologia Renal do Departamento de Clínica médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela cooperação no decorrer das minhas atividades de mestrado e pelo ambiente de trabalho agradável que me proporcionaram.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

## ÍNDICE

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumo .....</b>                                    | <b>2</b>  |
| <b>1. Introdução. ....</b>                             | <b>3</b>  |
| <b>2. Estrutura Básica do Estudo .....</b>             | <b>8</b>  |
| Estudo 1.....                                          | 8         |
| Estudo 2.....                                          | 8         |
| Estudo 3.....                                          | 9         |
| Estudo 4.....                                          | 9         |
| Estudo 5.....                                          | 9         |
| <b>3. Métodos .....</b>                                | <b>11</b> |
| Grupos Experimentais e Indução do Diabetes.....        | 11        |
| Estudo Funcional Renal.....                            | 12        |
| Efeito Agudo da Endotelina 1 e da Angiotensina II..... | 15        |
| Medida da Produção de Óxido Nítrico.....               | 15        |
| <b>4. Análise Estatística.....</b>                     | <b>18</b> |
| <b>5. Resultados.....</b>                              | <b>19</b> |
| <b>6. Figuras.....</b>                                 | <b>23</b> |
| <b>7. Gráficos.....</b>                                | <b>31</b> |
| <b>8. Discussão.....</b>                               | <b>36</b> |
| <b>9. Sumário.....</b>                                 | <b>42</b> |
| <b>10. Conclusão.....</b>                              | <b>43</b> |
| <b>11. Referências Bibliográficas.....</b>             | <b>44</b> |

## RESUMO

Nós examinamos a hipótese de que o óxido nítrico (NO) possa mediar a hiperfiltração do diabetes mellitus experimental. Foram utilizados no estudo 75 ratos Munich-wistar machos tornados diabéticos por estreptozotocina e 39 ratos controles não diabéticos que foram distribuídos em 4 grupos: C, controles normais; C+NAME, controles que receberam o inibidor do NO, N-nitro-metil-éster-L-arginina (L-NAME), 40 mg/dl dissolvido em água; DM, ratos diabéticos; DM+NAME, ratos diabéticos que receberam L-NAME, 15 mg/dl dissolvidos em água. Depois de 1 mês de tratamento, o L-NAME aumentou a pressão arterial nos grupos C+NAME e DM+NAME e preveniu a hiperfiltração e a hiperperusão renal no grupo DM+NAME. A administração aguda de L-NAME, 2,5 mg/kg, aumentou a pressão arterial, normalizou o RFG e promoveu vasoconstrição muito mais acentuada no grupo DM que no grupo C. A administração de endotelina I (600ng/kg em bôlus) ou de angiotensina II (25 g/kg/min em infusão contínua) resultou em efeitos similares na hemodinâmica renal tanto no grupo C quanto no grupo DM, sugerindo que a resposta aumetada pela infusão aguda de L-NAME no grupo DM reflete uma sensibilidade específica dos animais diabéticos à inibição do NO. A excreção urinária de nitratos e nitritos foi 4 vezes maior em DM comparado com C. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que a produção aumentada de NO pode estar mediando a hiperperusão e a hiperfiltração glomerulares no diabetes.

## INTRODUÇÃO

A incidência do diabetes mellitus, no Brasil e no mundo, é bastante elevada. Estima-se em mais de 10 milhões o número de diabéticos nos Estados Unidos, sendo que 90% desse total apresenta a forma não dependente de insulina (Tipo II). Embora menos frequente, a diabetes do Tipo I parece associar-se a um maior risco de desenvolvimento de nefropatia diabética: 40% desses pacientes acabam desenvolvendo lesões renais irreversíveis após um período médio de 15 anos, aproximadamente (Breyer, 1992), enquanto o risco associado ao diabetes do Tipo II parece menor, talvez algo em torno de 10%. Mesmo assim, considerando-se o grande número de pacientes acometidos, o diabetes mellitus tipo II é importante causa de insuficiência renal crônica. Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da lesão glomerular em um número tão grande de diabéticos são ainda obscuros. Um grande número de possíveis fatores patogênicos tem sido apontados como prováveis causadores da glomerulopatia diabética, incluindo alterações hemodinâmicas renais, glicosilação não-enzimática de proteínas glomerulares, deposição glomerular de lipídeos e ativação da via dos polióis. Pela consistência entre os achados clínicos e experimentais, as alterações hemodinâmicas renais ocupam lugar de destaque na etiopatogênese da lesão renal causada pelo diabetes mellitus.

Há muito se sabe que o diabetes mellitus caracteriza-se em suas fases iniciais por aumento considerável da taxa de filtração glomerular, por aumento menos acentuado no fluxo plasmático renal e também pelo desenvolvimento de hipertrofia renal (Hostetter et al, 1981; Marre et al, 1992). Estudos feitos em pacientes diabéticos do Tipo I sem comprometimento importante da microcirculação renal é comum um aumento de até 40% no ritmo de filtração

glomerular (Hostetter et al, 1981; Marre et al, 1992). Ocorre também um aumento, embora menos acentuado, no fluxo plasmático renal, causando elevação da fração de filtração nesses pacientes. Esses mesmos achados também foram demonstrados no diabetes mellitus experimental (Hostetter et al, 1981; Zatz et al, 1986; Fujihara et al, 1992). Em 1981, os estudos de Hostetter e colaboradores (Hostetter et al, 1981) descreveram as alterações basais da hemodinâmica glomerular em ratos tornados diabéticos através de estreptozotocina. Neste estudo os animais foram mantidos moderadamente hiperglicêmicos (200-400 mg/dl) e foram estudados num período de 1 a 2 meses de diabetes, caracterizado pela ausência de lesões glomerulares aparentes. Observou-se nesses animais, tal como em humanos, hipertrofia renal e a um aumento de 40% no ritmo de filtração glomerular por néfron (SNGFR). Através de micropunção evidenciou-se pronunciada vasodilatação intrarenal tanto na artéria aferente como na eferente e aumento da pressão hidráulica glomerular ( $P_{GC}$ ). Esses resultados foram reproduzidos por Zatz e colaboradores (Zatz et al, 1985) e por Fujihara e colaboradores (Fujihara et al, 1992) que também observaram hiperperusão e hiperfiltração glomerulares além de aumento da perusão hidráulica glomerular. Por óbvia impossibilidade técnica, inexistem informações sobre a pressão hidráulica e o coeficiente de ultrafiltração em pacientes diabéticos. Entretanto, é possível que estes dois determinantes da filtração glomerular estejam aumentados em pacientes tal como ocorre em ratos diabéticos. Como já foi demonstrado, o uso de manobras experimentais que limitam essas alterações da hemodinâmica glomerular parece prevenir as respectivas lesões. Nesse sentido, dois importantes estudos foram desenvolvidos por Zatz e colaboradores (Zatz et al, 1985). Em um desses estudos (Zatz et al, 1985) ratos diabéticos receberam variadas quantidades de proteína na dieta (6%, 12% e 50%) de modo a promover uma

ampla variação da hemodinâmica glomerular. O grupo que recebeu a dieta contendo 50% de proteína exibiu valores de RFG (ritmo de filtração glomerular), FPR (fluxo plasmático renal) e pressão hidráulica glomerular ( $P_{GC}$ ) significativamente maiores quando comparado com os grupos que receberam menor quantidade de proteína (6% e 12%). Após um ano de diabetes, somente o grupo que recebeu 50% de proteína apresentou um grau significativo de esclerose glomerular, enquanto nos outros grupos a frequência dessas lesões foi semelhante normal. Outro experimento desenvolvido por Zatz e colaboradores (Zatz et al, 1986) consistiu em tratar ratos diabéticos com enalapril, um inibidor da enzima conversora de Angiotensina I, o qual é capaz de reverter a hipertensão glomerular que ocorre nesses animais. O grupo que recebeu o Enalapril foi protegido das lesões de esclerose glomerular associadas ao diabetes, as quais foram evidentes no grupo não tratado.

Considerando-se as inúmeras evidências experimentais apontando para o importante papel da hiperfiltração glomerular na gênese da glomeruloesclerose e da glomerulopatia diabética muitos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de se entender os mecanismos responsáveis por esse estado de vasodilatação renal que termina por levar hiperfiltração glomerular no diabetes mellitus. Entretanto, estes mecanismos não são atualmente conhecidos. Há evidências de que uma série de agentes vasorrelaxantes pode promover vasodilatação renal e aumento do RFG nos pacientes diabéticos, incluindo o hormônio de crescimento (Christiansen et al, 1981), o glucagon (Parving et al, 1977), a própria glicose (Appiani et al, 1990) ou a produção aumentada de cininas e prostaglandinas (Harvey et al, 1992). Além disso, a expansão de volume extracelular, frequentemente verificada em diabéticos (Brocher-Mortensen, 1973), pode estar associada a uma hiperperusão renal, em parte talvez em decorrência do aumento dos níveis

circulantes do fator natriurético atrial (Ortola et al, 1987). Mais recentemente, surgiu a possibilidade de que a hiperfiltração do diabetes seja consequência da atividade de um fator relaxante endotelial.

O endotélio vascular exerce um papel importante no que diz respeito regulação do tônus muscular liso. Em resposta a agonistas diversos, o endotélio libera substâncias constrictoras (como a endotelina) ou relaxantes (como o fator relaxante derivado do endotélio-EDRF) as quais agindo localmente irão produzir mudanças no tônus da musculatura lisa adjacente. A existência do EDRF foi demonstrada por Furchgott e Zawadzki em 1980 (Furchgott & Zawadzki, 1980) e poucos anos mais tarde o fator foi quimicamente caracterizado como sendo o óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é sintetizado pelo endotélio utilizando a L-arginina como precursor, sendo sintetizado também pelas células endoteliais glomerulares, exercendo assim influência na hemodinâmica renal (Zatz & De-Nucci, 1991; Baylis et al, 1992). Evidências obtidas nos últimos anos utilizando inibição aguda da síntese de NO indicam que este composto relaxa a microcirculação, participa intensamente da manutenção da pressão arterial sistêmica, particularmente no território renal (Ribeiro et al, 1992). Dois importantes estudos onde a síntese de NO foi inibida, tanto aguda quanto cronicamente, ilustram o importante papel do óxido nítrico na regulação da hemodinâmica renal (Zatz & De-Nucci, 1991; Ribeiro et al, 1992). O estudo agudo (Zatz & De-Nucci, 1991) foi desenvolvido tratando-se ratos normais com LNMMA, N- monometil L-arginina, um inibidor específico da síntese de NO, por via endovenosa. Observou-se após a administração desse composto uma acentuada vasoconstrição arteriolar glomerular, especialmente junto arteríola eferente, com consequente hipoperfusão glomerular, além de uma pronunciada elevação da pressão hidráulica glomerular e queda do coeficiente de ultrafiltração

glomerular. No estudo crônico (Ribeiro et al, 1992), os ratos tiveram a síntese de óxido nítrico bloqueada pelo L-NAME (L-nitro arginina metil éster) administrado por via oral durante 4 a 6 semanas. Os animais mostraram acentuada vasoconstrição renal com queda do fluxo plasmático renal e redução de 30% no RFG, além de um aumento de 39% na fração de filtração. Os resultados obtidos são consistentes com a hipótese de que o óxido nítrico exerce um efeito relaxante tônico sobre a microcirculação, especialmente no território renal. Esses efeitos sobre a hemodinâmica renal do NO e de seu precursor a L-arginina, são consistentes com a hipótese de que a produção exagerada desse composto possa ser um dos fatores envolvidos no processo de hiperfiltração glomerular do diabetes mellitus. A administração de uma mistura de aminoácidos (King et al, 1991; Tolins & Raij, 1991); ou de L-arginina pura (Baylis et al, 1990) a ratos normais induz substancial aumento do ritmo de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal, além de uma queda na resistência vascular renal e poliúria acentuada, o que sugere que uma liberação local de NO esteja promovendo importante vasodilatação renal nesses animais.

Uma vez que o NO é um potente vasodilatador renal com importante papel fisiológico, emerge naturalmente a hipótese de que o aumento da atividade desse composto possa se constituir em um dos mecanismos responsáveis pela vasodilatação renal e hiperfiltração associadas ao diabetes mellitus. O presente estudo tem como objetivo investigar esta hipótese examinando o efeito hemodinâmico renal pela inibição aguda e crônica de NO em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina.

Os resultados do presente estudo são consistentes com a hipótese de que o NO contribua para o estado de hiperperfusão e hiperfiltração glomerulares observada no diabetes mellitus insulino-dependente.

## ESTRUTURA BÁSICA DO ESTUDO

### **ESTUDO 1**

#### Inibição Crônica do NO

Ratos diabéticos por estreptozotocina (grupo D+NAME) e ratos controles normais (grupo C+NAME) receberam L-NAME por via oral (inibidor da síntese de óxido nítrico) por 30 a 40 dias. Os animais diabéticos foram mantidos moderadamente hiperglicêmicos (200-400 mg/dl) através de injeções diárias de insulina ajustadas individualmente. Após esse período (30 a 40 dias) os animais foram submetidos ao estudo funcional renal, onde se determinou os parâmetros renais básicos (ritmo de filtração glomerular (RFG); fluxo plasmático renal (FPR); fração de filtração (FF); resistência vascular renal (RVR).

### **ESTUDO 2**

#### Inibição Aguda do NO

Foram estudados ratos diabéticos por estreptozotocina (grupo DM) e ratos controles normais (grupo C). Os ratos diabéticos foram mantidos hiperglicêmicos por 30 a 40 dias como no grupo DM+NAME. Decorrido esse período, os animais foram submetidos ao estudo funcional renal que foi dividido em:

1º período) Determinação dos parâmetros renais basais: RFG, FPR, FF, RVR.

2º período) Infusão aguda de L-NAME e nova avaliação dos

parâmetros renais.

A fim de excluir a hipótese de que um eventual efeito da inibição do NO sobre a filtração glomerular deva-se tão somente a uma maior sensibilidade da microcirculação de ratos diabéticos a agentes vasoconstritores em geral, dois estudos adicionais foram realizados. No primeiro (Estudo 3) estudou-se o efeito na hemodinâmica renal de infusões agudas de endotelina I (ET I). No segundo (Estudo 4), avaliou-se o efeito de infusões agudas de angiotensina II (A II).

### **ESTUDO 3**

#### Efeito Agudo da Endotelina I

Após 30 dias de diabetes, como descrito nos estudos 1 e 2, a hemodinâmica renal de ratos diabéticos e ratos controles normais foi avaliada antes e após a infusão de ET I.

### **ESTUDO 4**

#### Efeito Agudo da Angiotensina II

Como no estudo 3 os parâmetros funcionais renais de ratos diabéticos e ratos controles foram determinados antes e depois da infusão aguda de A II.

### **ESTUDO 5**

#### Medida da Produção de Óxido Nítrico pelo Rim

A metabolização do NO leva a formação de nitratos e nitritos

(metabólitos estáveis), assim, a determinação destes compostos na urina pode fornecer uma idéia quantitativa da produção de óxido nítrico. Dessa forma, ratos diabéticos e ratos controles normais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para a coleta de urina durante 24 horas. A partir das respectivas amostras de urina a excreção urinária de nitratos e nitritos foi então determinada pelo método de Griess (Conrad et al, 1993).

## MÉTODOS

### Grupos experimentais e indução do diabetes

Foram utilizados 74 ratos Munich-Wistar machos com peso inicial de 240 a 260 g, os quais são mantidos no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Universidade de São Paulo. Os animais foram tornados diabéticos com injeção única de Estreptozotocina 65mg/kg em tampão citrato 0,05M através da veia caudal, sob anestesia com pentobarbital sódico 50mg/kg (Seconal). Semanalmente, foi avaliada a concentração de glicose plasmática por reflectometria (GLUCOMETER II, Ames Division, Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana). Os animais receberam ração padrão comercial (NUVITAL, Curitiba,PR) e água de torneira ad libitum. Injeções diárias de insulina NPH, ajustadas individualmente permitiu manter a glicemia destes ratos moderadamente elevada (200 a 400 mg/dl). Ratos normais não-diabéticos foram usados como grupo controle, nos quais apenas o tampão citrato foi injetado.

Trinta e dois ratos, 16 diabéticos e 16 controles normais, foram distribuídos em 4 grupos:

|         |                                                          |
|---------|----------------------------------------------------------|
| C       | Ratos controle sem qualquer tratamento                   |
| DM      | Ratos diabéticos sem qualquer tratamento                 |
| C+NAME  | Ratos controle, recebendo L-NAME cronicamente            |
| DM+NAME | Ratos diabéticos, recebendo L-NAME como no Grupo C+LNAME |

Para o grupo C+NAME, o L-NAME (Sigma Co., St. Louis, MO) foi dissolvido diariamente na água numa concentração de 40 mg/dl correspondendo a uma ingestão diária de 30mg/kg . Os ratos diabéticos ingerem quantidade de água duas a três vezes maior que os animais controles, assim o L-NAME foi diluído numa concentração de 15 mg/100 ml o que resulta na mesma ingestão diária da droga. Cerca de 45 dias após a indução do diabetes, os ratos foram preparados para o estudo funcional renal conforme descrito a seguir.

### **Estudo Funcional Renal**

Os ratos submetidos a experimentos de estudo de função renal foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de inactina (100/mg) e colocados em mesa cirúrgica com temperatura controlada. A temperatura retal foi mantida a  $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ . A artéria femoral foi canulada com polietileno PE-50 para determinação do hematócrito arterial basal e coleta periódica de amostras de sangue arterial, assim como para monitorização contínua da pressão arterial (PA) através de um transdutor de pressão P23Db Statham conectado a um fisiógrafo (modelo A8200, Anamed Instrumentos, São Paulo, Brasil). Depois da traqueostomia, as veias jugulares foram cateterizadas com polietileno PE-50 para infusão de plasma e inulina. Solução fisiológica contendo inulina marcada com  $^{14}\text{C}$  ( $2\mu\text{Ci/ml}$ ), foi infundida até o final do experimento numa velocidade de 1,5 ml/h. A infusão de salina foi mais rápida em ratos diabéticos para compensar as perdas urinárias: 4,5ml/h. O plasma foi infundido para repor as perdas de fluido durante a cirurgia (Maddox et al, 1977). Uma quantidade de plasma equivalente a 1% do peso corpóreo foi infundida durante 45 min,

seguindo-se uma infusão de 0,5-1ml/h até o final do experimento. A superfície do rim esquerdo foi exposta, liberada da glândula adrenal e do tecido adiposo perirenal, sendo continuamente banhada com solução salina isotônica. O ureter foi cateterizado com um tubo de polietileno PE-10 para coleta de urina durante os períodos experimentais. Após um período de estabilização de aproximadamente 2 horas após a anestesia procedeu-se a coleta de urina durante 2 períodos de 20-30 minutos para determinação do fluxo urinário e do clearance de inulina (Cin). Para a obtenção do clearance de inulina, o que equivale ao ritmo de filtração glomerular (RFG), uma amostra de sangue foi coletada da artéria femoral e a atividade de  $^{14}\text{C}$  no plasma e na urina foi determinada em um contador de cintilação líquida (modelo LS-3150T, Beckman Instruments, Schiller Park, IL, USA).

Assim, o ritmo de filtração glomerular foi obtido pela fórmula:

$$\text{RFG} = (\text{UIN}/\text{PIN}) \cdot \text{V},$$

onde UIN e PIN representam as concentrações de inulina na urina e no plasma, respectivamente, e V representa o fluxo urinário.

A fração de filtração (FF) foi determinada aproximadamente metade de cada período pela coleta simultânea de sangue da artéria femoral e veia renal, e determinação das respectivas atividades de  $^{14}\text{C}$  para calcular a extração de inulina. A coleta de sangue da veia renal foi realizada com a utilização de micropipetas afiadas de vidro com diâmetro de 40  $\mu\text{m}$ , que foram previamente siliconizadas e heparinizadas. A atividade de  $^{14}\text{C}$  no plasma e na urina foi determinada em um contador de cintilação líquida (modelo LS-3150T, Beckman Instruments, Schiller Park, IL, USA), como citado anteriormente. Assim:

$$\text{EIN} = (\text{Ain} - \text{Vin})/\text{Ain},$$

onde Ain e Vin representam as concentrações de inulina radioativa no plasma

sistêmico e na veia renal, respectivamente, sendo que:

$$\text{Fração de Filtração (FF)} = \text{Extração de Inulina (EIN)}$$

O fluxo plasmático renal (FPR) foi calculado utilizando o ritmo de filtração glomerular (RFG) e a fração de filtração (FF) através da fórmula:

$$\text{FPR} = \text{RFG}/\text{FF}.$$

A resistência vascular renal (RVR) foi estimada pela expressão:

$$\text{RVR} = \text{PA} \cdot (1 - \text{Ht}) / \text{FPR}$$

onde PA representa a pressão arterial média e Ht representa o hematócrito arterial.

Após a determinação dos parâmetros hemodinâmicos renais básicos o que caracteriza o 1 período experimental, os ratos que não tiveram tratamento prévio (Grupos C e DM) receberam uma infusão experimental adicional de L-NAME, 2.5 mg/kg em injeção única. Os animais que foram tratados cronicamente com o L-NAME (Grupos C+NAME e DM+NAME) receberam L-arginina (SIGMA Co, St Louis, MO), bôlus de 300mg/kg seguido de uma infusão de 50 mg/kg/min. Posteriormente, os parâmetros renais foram reavaliados, caracterizando o 2 período.

Esquemáticamente:

| GRUPO   | DIABETES | TRATAMENTO PRÉVIO | INFUSÃO AGUDA |
|---------|----------|-------------------|---------------|
| C       | Não      | Nenhum            | L-NAME        |
| DM      | Sim      | Nenhum            | L-NAME        |
| C+NAME  | Não      | L-NAME            | L-arginina    |
| DM+NAME | Sim      | L-NAME            | L-arginina    |

Esse esquema experimental permitiu avaliar o grau de dependência da hiperfiltração glomerular dos diabéticos em relação ao sistema NO, tanto agudamente (através da infusão aguda de L-NAME no grupo DM) quanto cronicamente, através dos níveis basais de filtração no Grupo DM+NAME). Também foi avaliado se uma eventual prevenção da hiperfiltração pelo L-NAME (Grupo DM+NAME) poderia ser revertida através da infusão aguda de L-arginina, já que este aminoácido é o precursor da biossíntese de NO.

**Efeito agudo da endotelina I e da angiotensina II**

A fim de comparar os efeitos hemodinâmicos agudos pelo L-NAME com outros vasoconstritores foi desenvolvido um estudo adicional com 12 ratos diabéticos e 16 ratos controles seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. A função renal foi então avaliada antes e após a infusão de endotelina I ou angiotensina II. A endotelina I (Sigma CO., St Louis, MO) foi infundida em dose única numa concentração de 600ng/kg. A angiotensina II

(Sigma CO., St Louis, MO) foi infundida numa taxa de 25 µg/kg/min.

A Endotelina 1 (ET-1), recentemente caracterizada, é um peptídeo derivado de células endoteliais, com potente atividade constritora nas células musculares lisas vasculares (Claria et al, 1991)) Kamal e colaboradores (Badr et al, 1989) mostrou que a microcirculação renal de ratos é altamente sensível infusão aguda de ET 1, já que doses muito baixas desse peptídeo provocou intensa vasoconstrição renal com pequeno aumento na pressão arterial sistêmica. De acordo com este estudo, a administração de ET 1 resultou numa queda severa da fluxo sanguíneo renal (FSR), redução acentuada do coeficiente de ultrafiltração glomerular (Kf) e consequente queda do ritmo de filtração glomerular (RFG). Sabe-se que a Angiotensina II (A II) é um potente vasoconstritor produzido biologicamente que age no músculo liso vascular aumentando a resistência vascular periférica além de promover intensa vasoconstrição renal. Estudos de Blantz e colaboradores (Blantz et al, 1976) mostraram que a infusão de A II leva a um aumento da pressão hidráulica glomerular com queda do coeficiente de ultrafiltração glomerular e aumento marcante da fração de filtração.

### **Medida da Produção de Óxido Nítrico**

Também foi avaliada no presente estudo a produção de óxido nítrico pelo rim. Uma vez que no organismo o NO é rapidamente oxidado a nitratos e nitritos (derivados estáveis), a determinação destes pode fornecer uma idéia quantitativa da produção de óxido nítrico por esses animais. Estudos mostraram que em ratos diabéticos a concentração destes metabólitos está significativamente aumentada no plasma e na urina (Bank & Aynedjian, 1993; Tolins et al, 1993).

Para determinar a taxa de excreção urinária de nitratos e nitritos (produtos de metabolização do óxido nítrico) sete ratos diabéticos por estreptozotocina e 7 ratos controles normais foram tratados como descrito anteriormente. Após 30 dias de diabetes, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina por 24 horas. Em cada recipiente onde a urina foi coletada adicionou-se uma solução de antibióticos contendo 100 U/ml de Penicilina, 100 mg/ml de Estreptomicina e 0.25 µg/ml de anfotericina (Tolins et al, 1993). Esse procedimento teve o objetivo de preservar a urina impedindo o crescimento de bactérias. Após 24 horas a concentração de nitratos e nitritos foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Conrado et al (Conrad et al, 1993). Sucintamente, a concentração de  $\text{NO}_2$  foi inicialmente determinada usando o reagente de Griess (Green et al, 1982). Posteriormente, alíquotas de urina foram incubadas por 1 hora com a enzima nitrato redutase e NADPH (Boehringer, Mannheim, Germany), para redução de todos os nitratos presentes na urina em nitrito. Depois deste procedimento a reação de Griess foi aplicada novamente para determinação da concentração de nitrito que equivale a soma da concentração inicial de nitrito mais a de nitrato.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os efeitos combinados de diabetes e tratamento crônico com L-NAME, os dados foram submetidos a análise de variância de dois fatores (Wallenstein et al, 1980), associada a comparações simultâneas pareadas de acordo com o método de Bonferroni. Além disso, foi utilizado o teste t-pareado para analisar os efeitos da administração aguda dos compostos vasoativos. A diferença nas excreções urinárias de nitratos e nitritos foram avaliadas pelo teste t não-pareado. Consideraram como significantes níveis de p iguais ou menores do que 0,05.

## RESULTADOS

Os parâmetros hemodinâmicos renais e sistêmicos após 30 dias de indução do diabetes estão relacionados na tabela 1. Tanto o diabetes mellitus quanto o tratamento com L-NAME não afetaram o peso corpóreo dos grupos estudados. Como esperado, o grupo DM apresentou aumento da massa renal ( $1.37 \pm 0.03$  g vs.  $1.04 \pm 0.02$  g nos controles,  $p < 0.05$ ) e esta hipertrofia renal não foi significativamente afetada pelo tratamento com L-NAME ( $1.27 \pm 0.04$  g,  $p > 0.1$  vs. o grupo DM). A concentração de glicose plasmática tanto no grupo DM como no grupo DM+L-NAME foi cerca de quatro vezes maior que nos grupos controles normais não diabéticos. Como já foi demonstrado (Baylis et al, 1992; Ribeiro et al, 1992), o tratamento com L-NAME promoveu nítido aumento da pressão arterial no grupo C+NAME ( $154 \pm 5$  mmHg vs.  $117 \pm 4$  no grupo C,  $p < 0.05$ ). Os animais diabéticos mostraram pressão arterial sistêmica similar aos animais controles não diabéticos e o tratamento com o L-NAME resultou em um aumento da pressão arterial sistêmica no grupo DM+NAME de mesma magnitude que nos controles normais ( $149 \pm 5$  mmHg,  $p < 0.05$  vs DM). O ritmo de filtração glomerular foi significamente maior no grupo DM ( $1.91 \pm 0.11$  ml/min vs  $1.40 \pm 0.05$  ml/min no grupo C,  $p < 0.05$ ), caracterizando a hiperfiltração associada ao Diabetes Mellitus. Houve uma queda de 14% no ritmo de filtração glomerular nos controles não diabéticos que receberam tratamento crônico com L-NAME comparados com o grupo controle sem tratamento ( $1.12 \pm 0.04$  ml/min vs  $1.40 \pm 0.07$  ml/min  $0.05 < p < 0.1$ ) enquanto o tratamento com L-NAME preveniu a hiperfiltração no grupo DM+L-NAME trazendo o ritmo de filtração glomerular a valores semelhantes ao grupo C ( $1.26 \pm 0.08$  ml/min vs grupo DM,  $p < 0.05$ ). No grupo C+NAME, o FPR foi

28% menor ( $2.82 \pm 0.18$  ml/min vs  $4.28 \pm 0.16$  nos controles,  $p < 0.05$ ) enquanto a fração de filtração foi 21% maior ( $0.40 \pm 0.02$  vs  $0.33 \pm 0.01$  no grupo C,  $p < 0.05$ ) que os controles. O grupo DM apresentou FPR significativamente maior em relação aos controles não diabéticos ( $5.93 \pm 0.53$  ml/min vs  $4.28 \pm 0.16$  no grupo C,  $p < 0.05$ ). O grupo DM+LNAME exibiu aumento na fração de filtração ( $0.40 \pm 0.02$  vs  $0.33 \pm 0.02$  no grupo DM,  $p < 0.05$ ) e queda do FPR ( $3.54 \pm 0.7$  vs  $5.93 \pm 0.53$  no grupo DM,  $p < 0.05$ ). Efeito similar foi observado no fluxo sanguíneo renal. Nenhuma alteração significativa no hematócrito arterial foi verificada entre os grupos estudados. Como esperado, o tratamento crônico com L-NAME aumentou em 106% a resistência vascular renal no grupo C+LNAME ( $30.2 \pm 3.1$  mmHg/(ml.min) vs  $14.6 \pm 0.6$  no grupo C,  $p < 0.05$ ). A resistência vascular renal foi numericamente menor nos ratos diabéticos embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $10.8 \pm 1.2$  mmHg/(ml-min),  $p > 0.05$  vs  $14.6 \pm 0.6$  no grupo C,  $0.1 < p < 0.05$ ).

Os resultados do estudo funcional renal após a infusão aguda do L-NAME nos grupos C e DM estão expostos na tabela 2. A infusão aguda do inibidor do NO promoveu um aumento de 15 % da pressão arterial no grupo controle ( $135 \pm 5$  vs  $117 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.05$ ). Este efeito pressor foi significativamente maior nos animais diabéticos ( $145 \pm 5$  vs  $110 \pm 5$  mmHg,  $p < 0.05$ ). O RFG manteve-se no grupo C após a infusão aguda do L-NAME ( $1.40 \pm 0.06$  vs  $1.40 \pm 0.05$  ml/min,  $p > 0.4$ ). No entanto, houve queda de 26% no GFR dos diabéticos trazendo a filtração deste grupo a valores idênticos ao grupo controle não diabético ( $1.39 \pm 0.07$  vs  $1.91 \pm 0.11$  mmHg,  $p < 0.05$ ). Similarmente, o FPR praticamente não foi alterado nos animais normais com a infusão aguda do L-NAME. Entretanto, houve decréscimo de 50% no FPR do grupo DM com aumento marcante na fração de filtração ( $3.00 \pm 0.21$  vs  $5.93 \pm 0.53$  ml/min,  $p < 0.05$ ). A infusão aguda de L-NAME promoveu aumento de 39% na RVR em

ratos normais ( $20.7 \pm 2.0$  vs  $14.6 \pm 0.6$  mmHg/(ml.min),  $p < 0.05$ ) Este efeito vasoconstritor renal foi aproximadamente três vezes maior nos animais diabéticos ( $10.8 \pm 1.2$  para  $27.5 \pm 2.8$  mmHg/(ml.min),  $p < 0.05$ ) indicando um efeito de sensibilidade desses animais ao L-NAME.

A tabela 3 mostra o efeito da infusão aguda de L-arginina nos grupos C+NAME e DM+NAME. Os valores basais estão expostos na tabela 1. A infusão aguda de L-arginina diminuiu similarmente a pressão arterial tanto no grupo C+NAME ( $154 \pm 5$  vs  $128 \pm 5$  mmHg,  $p < 0.05$ ) quanto no grupo DM+NAME ( $149 \pm 3$  vs  $122 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.05$ ). No grupo C+NAME o ritmo de filtração glomerular, RFG, foi ligeiramente aumentado pela infusão de L-arginina ( $1.25 \pm 0.08$  vs  $1.12 \pm 0.04$  ml/min,  $p > 0.1$ ) e não foi afetada no grupo DM+NAME ( $1.31 \pm 0.05$  vs  $1.26 \pm 0.03$  ml/min,  $p > 0.1$ ). Ao contrário do modesto efeito no RFG, a L-arginina normalizou a fração de filtração e elevou bastante FPR em ambos os grupos C+NAME (de  $2.82 \pm 0.18$  para  $4.63 \pm 0.47$ ,  $p < 0.05$ ) e DM+NAME (de  $3.54 \pm 0.57$  para  $5.12 \pm 0.59$ ,  $p < 0.05$ ). A infusão de L-arginina também normalizou a RVR tanto no grupo C+NAME (de  $30.2 \pm 3.1$  para  $15.6 \pm 2.1$  mmHg/(ml.min),  $p < 0.05$ ) quanto no grupo DM+NAME (de  $26.6 \pm 0.7$  para  $14.0 \pm 1.2$  mmHg/(ml.min),  $p < 0.05$ ).

A administração aguda de endotelina I (Tabela 4) resultou em pequena elevação da pressão arterial média no grupo controle (de  $111 \pm 3$  para  $122 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.05$ ) assim como no grupo diabético (de  $110 \pm 4$  para  $116 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.05$ ). O RFG diminuiu 12% nos ratos controles (de  $1.36 \pm 0.04$  para  $1.20 \pm 0.06$  ml/min,  $p < 0.05$ ) e 18% nos ratos diabéticos (de  $1.76 \pm 0.08$  para  $1.62 \pm 0.09$  ml/min,  $p < 0.05$ ). Houve um decréscimo no FPR de 30% no grupo controle e de 31% no grupo diabético. Os ratos controles não-diabéticos tiveram sua resistência vascular renal aumentada em 50% enquanto os animais diabéticos responderam com um aumento de 46% da RVR após a infusão

aguda de endotelina I (de  $13.6 \pm 0.7$  para  $21.3 \pm 1.3$  mmHg/(ml.min) no grupo controle e de  $11.5 \pm 1.1$  para  $16.8 \pm 1.2$  mmHg/(ml.min) no grupo diabético,  $p < 0.05$ ).

Os resultados obtidos antes e depois da infusão aguda de Angiotensina II estão na tabela 5. A Angiotensina II levou a aumento na pressão arterial de aproximadamente 30% animais controles ( $110 \pm 3$  para  $142 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.05$ ) e nos animais diabéticos ( $108 \pm 5$  para  $144 \pm 6$  mmHg,  $p < 0.05$ ). O ritmo de filtração glomerular praticamente não se alterou com a infusão aguda de angiotensina II. A fração de filtração apresentou aumento marcante em ambos os grupos (de  $0.34 \pm 0.01$  para  $0.48 \pm 0.02$  no grupo controle e de  $0.34 \pm 0.01$  para  $0.49 \pm 0.04$  no grupo diabético,  $p < 0.05$ ). O fluxo plasmático renal diminuiu 30% nos animais controles e 23% nos diabéticos. O efeito sobre a RVR foi similar entre os 2 grupos (de  $15.0 \pm 1.0$  para  $26.5 \pm 1.1$  no grupo controle e de  $11.6 \pm 0.9$  para  $23.3 \pm 2.5$  mmHg/(ml.min),  $p < 0.05$ ).

A excreção total de nitrato e de nítrito na urina foi aproximadamente 4 vezes maior por ratos diabéticos do que por controles normais ( $5430 \pm 723$  vs  $1374 \pm 253$  nM/24h, respectivamente,  $p < 0.05$ ). A quantidade de nitratos foi predominante na urina tanto de controles quanto de diabéticos.

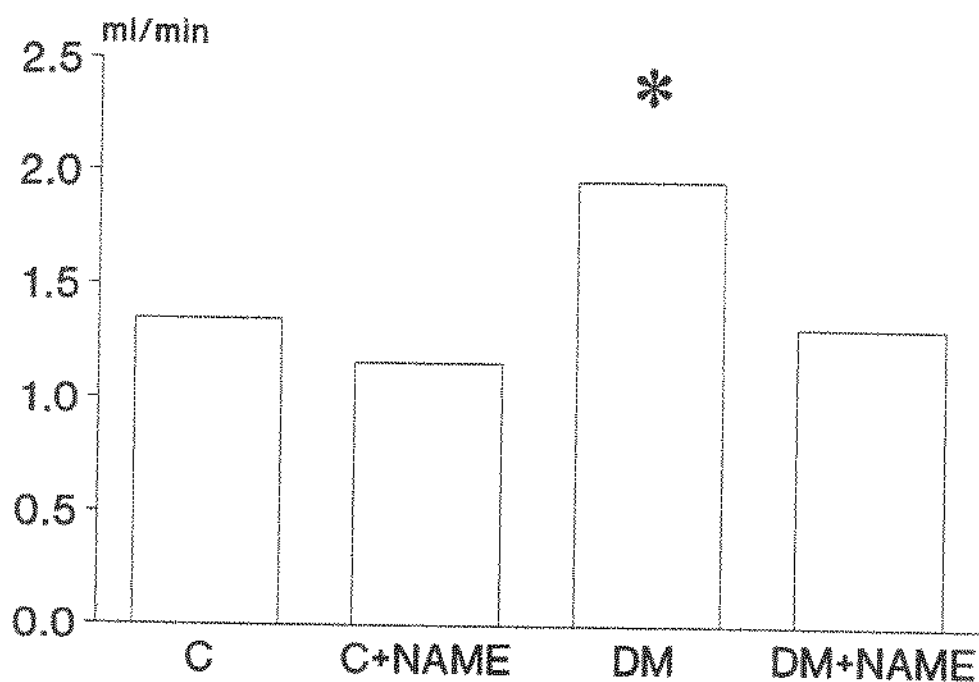
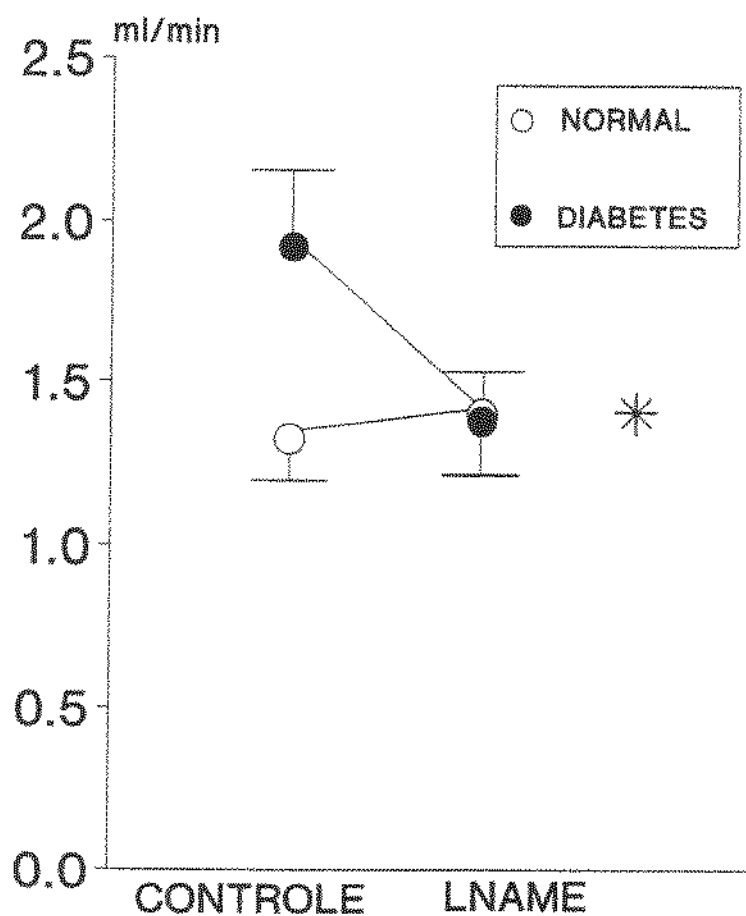


Figura 1: Ritmo de filtração glomerular (RFG) após 30 dias de diabetes. C, ratos controles normais; C+NAME, ratos controles que receberam L-NAME cronicamente; DM, ratos diabéticos; DM+NAME, ratos diabéticos que receberam L NAME cronicamente. \* =  $p < 0.05$



**Figura 2:** Efeito agudo do L-NAME sobre o ritmo de filtração glomerular em ratos normais e ratos diabéticos. Controle (1º período); LNAME (2º período, após a infusão aguda de L-NAME, 2.5 mg/kg). \* =  $p < 0.05$

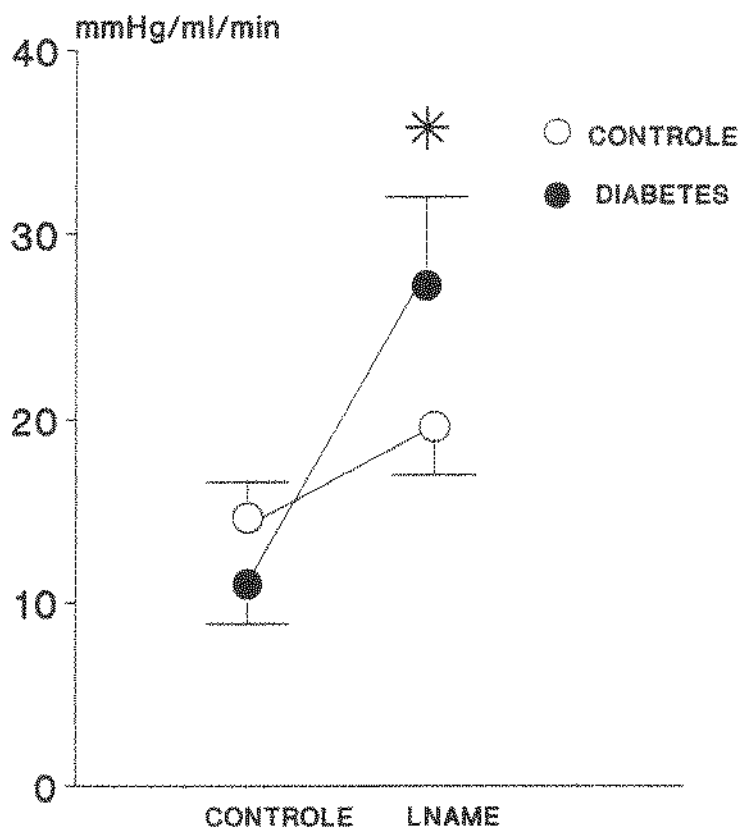


Figura 3: Efeito agudo do L-NAME sobre a resistência vascular renal em ratos normais e ratos diabéticos. Controle (1º período); LNAME (2º período, após a infusão aguda de L-NAME, 2.5 mg/kg). \* =  $p < 0.05$

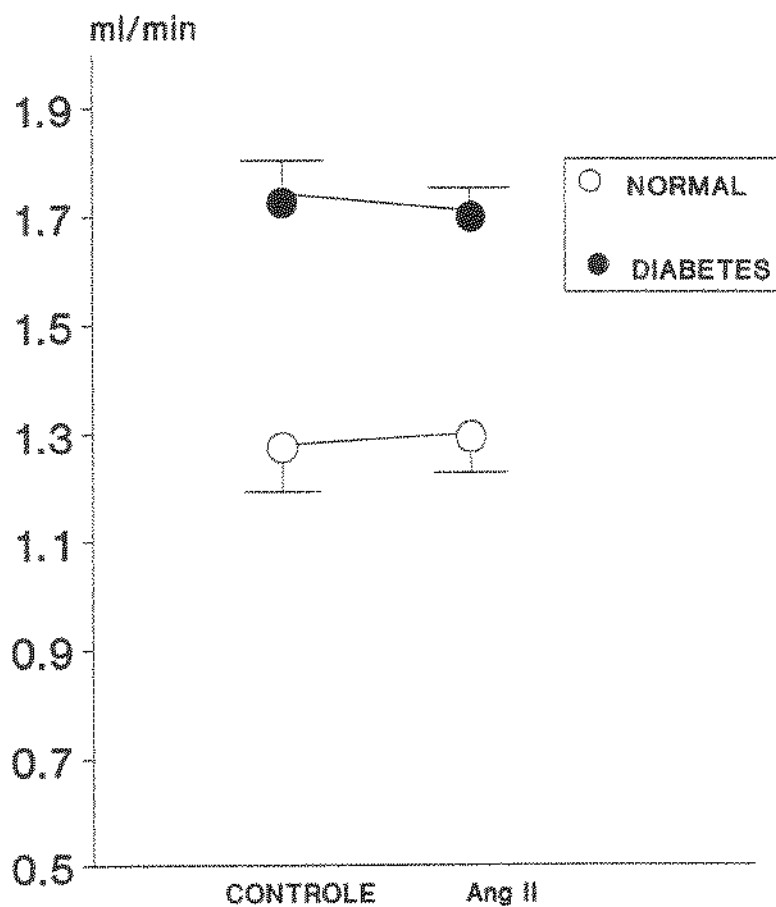


Figura 4: Efeito agudo da angiotensina II sobre o ritmo de filtração glomerular em ratos normais e diabéticos. Controle (1º período); Ang II (2º período, após a infusão aguda de angiotensina II, 100 ng/kg/min).

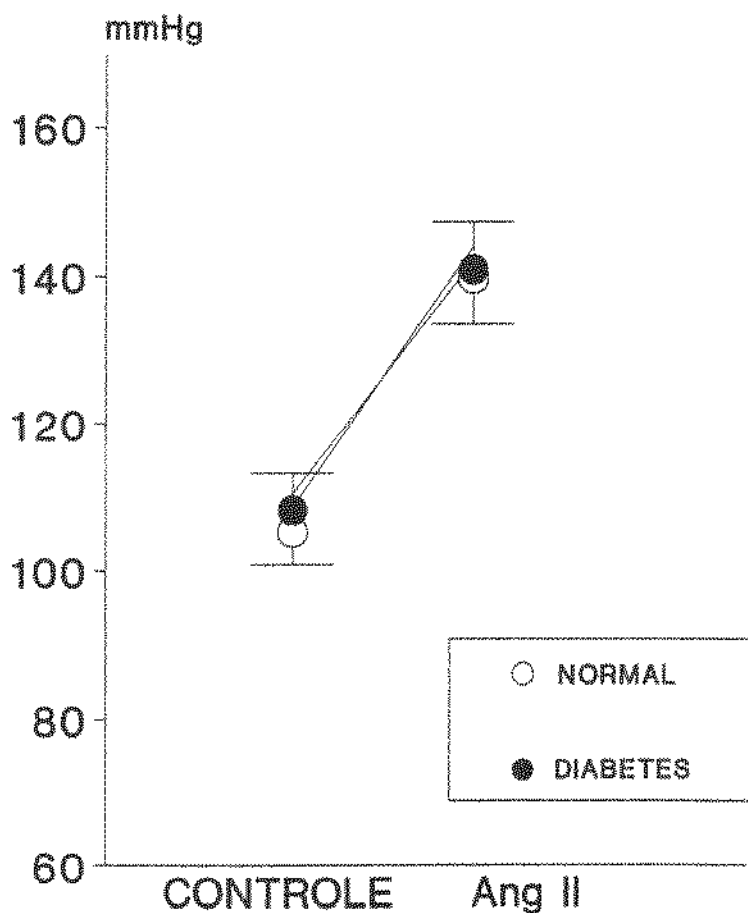


Figura 5: Efeito agudo da angitensina II sobre a pressão arterial média em ratos normais e ratos diabéticos. Controle (1º período); Ang II (2º período, após infusão aguda de angiotensina II, 100 ng/kg/min).

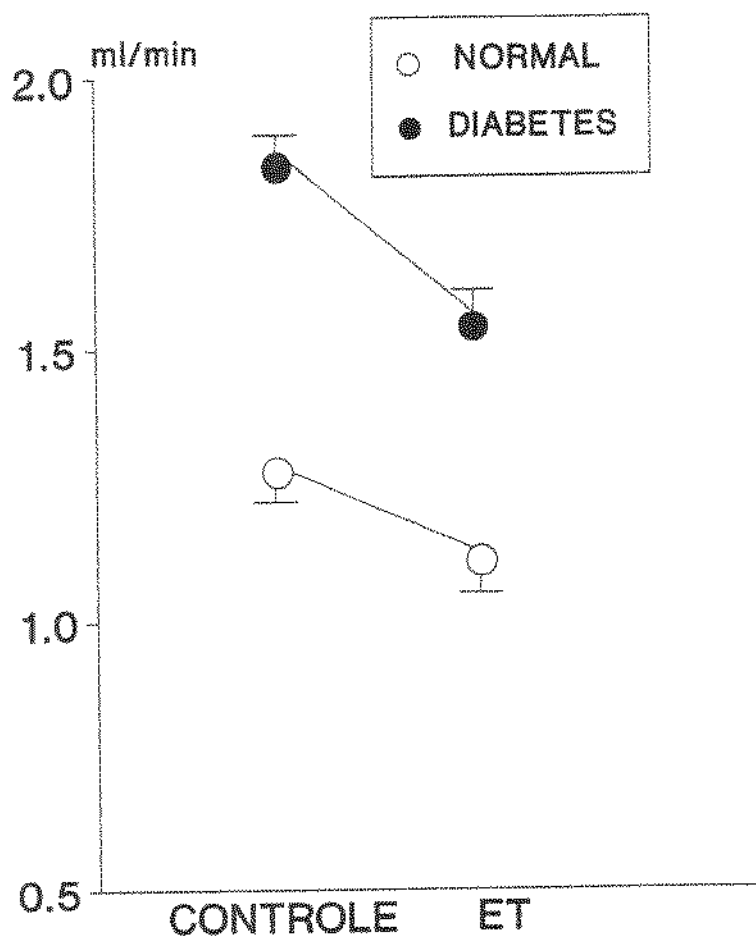


Figura 6: Efeito agudo da endotelina I sobre o ritmo de filtração glomerular em ratos normais e ratos diabéticos. Controle (1º período); ET (2º período, após infusão aguda de endotelina I, 600 ng/kg).

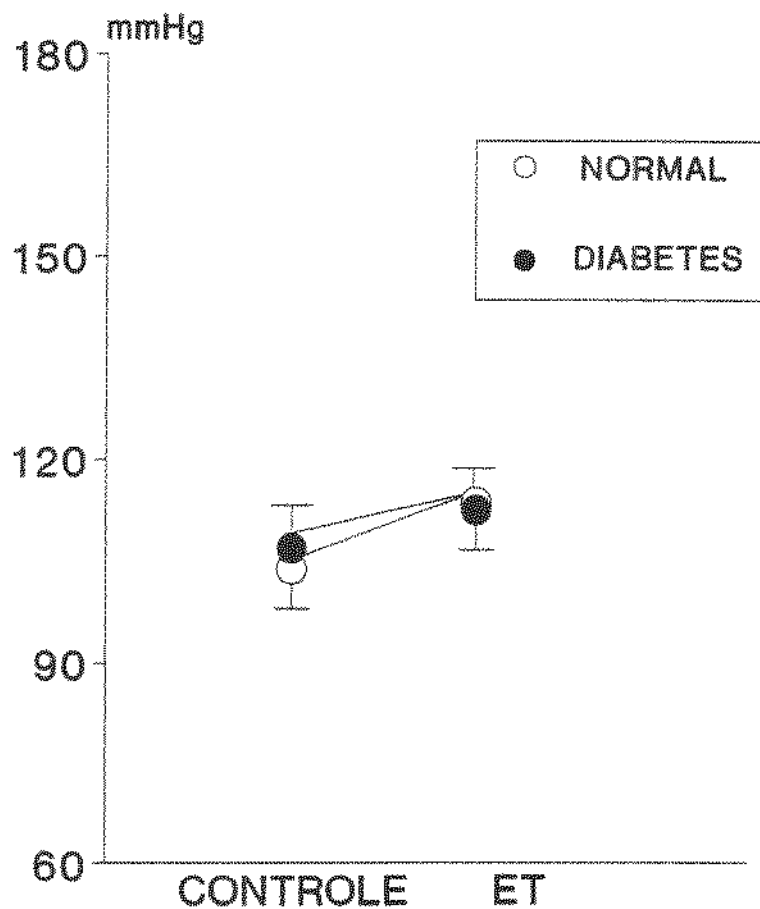


Figura 7: Efeito agudo da endotelina I sobre a pressão arterial média em ratos normais e ratos diabéticos. Controle (1º período); ET (2º período, após infusão aguda de endotelina I, 600 ng/kg).

## EXCREÇÃO DE $\text{NO}_2/\text{NO}_3$

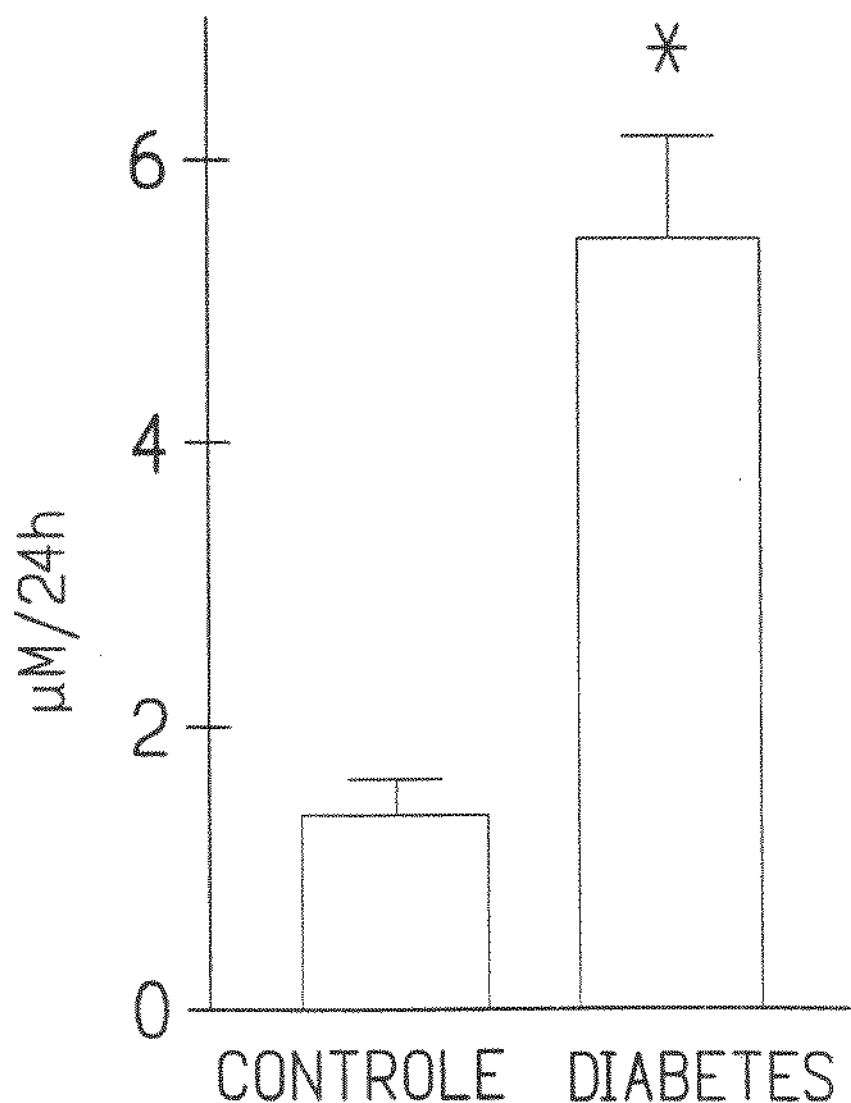


Figura 8: Excreção urinária de nitratos e nitritos ( $\mu\text{M}/24\text{h}$ ) por ratos controles normais e ratos diabéticos. \* =  $p < 0.05$

Tabela 1

Parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e renais basais. 30-45 dias após a indução do diabetes

|          | PC          | PR         | G       | PA     | RFG        | FF         | FPR        | Ht   | FSR        | RVR           |
|----------|-------------|------------|---------|--------|------------|------------|------------|------|------------|---------------|
|          | -----g----- |            | mg/dl   | mmHg   | ml/min     |            | ml/min     |      | ml/min     | mmHg/(ml·min) |
| C        | 290±4       | 1.04±0.02  | 77±2    | 117±4  | 1.40±0.06  | 0.33±0.01  | 4.28±0.16  | 47±1 | 7.57±0.50  | 14.6±0.6      |
| C+LNAME  | 288±7       | 1.10±0.03  | 75±4    | 154±5† | 1.12±0.04  | 0.40±0.02  | 2.82±0.18  | 47±1 | 5.33±0.30  | 30.2±3.1*     |
| DM       | 299±4       | 1.37±0.03* | 374±27* | 110±5  | 1.91±0.11* | 0.33±0.02  | 5.93±0.53* | 46±1 | 10.96±1.02 | 10.8±1.2      |
| DM+LNAME | 291±3       | 1.27±0.04* | 357±15* | 149±5† | 1.26±0.08† | 0.40±0.02† | 3.54±0.57† | 46±1 | 5.91±0.51  | 26.6±2.5*     |

Resultados expressos como a média±1SE. Abreviações utilizadas nesta tabela: PC, peso corpóreo; PRE, peso rim esquerdo; G, glicemia; PA, pressão arterial média; RFG, ritmo de filtração glomerular; FF, fração de filtração; FPR, fluxo plasmático renal; Ht, hematócrito arterial; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal; \*p<0.05 diabético vs.respectivo não diabético; † p<0.05 LNAME vs. respectivo não tratado.

Tabela 2

Efeito agudo da infusão de L-NAME após 30 dias de diabetes

| PA       |        | RFG       |            | FF        |            | FPR       |            | RVR           |           |
|----------|--------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|---------------|-----------|
| mmHg     |        | ml/min    |            |           |            | ml/min    |            | mmHg/(ml·min) |           |
| Controle | L-NAME | Controle  | L-NAME     | Controle  | L-NAME     | Controle  | L-NAME     | Controle      | L-NAME    |
| C 117±4  | 135±6* | 1.40±0.06 | 1.40±0.05  | 0.33±0.01 | 0.40±0.02* | 4.28±0.16 | 3.65±0.28  | 14.6±0.6      | 20.7±2.0  |
| DM 110±5 | 145±5* | 1.91±0.11 | 1.39±0.07* | 0.33±0.02 | 0.47±0.02* | 5.93±0.53 | 3.00±0.21* | 10.8±1.2      | 27.5±2.8* |

Resultados expressos como a média±1SE. Valores basais são iguais aos da tabela 1. Abreviações utilizadas nesta tabela: PA, pressão arterial média; RFG, ritmo de filtração glomerular; FF, fração de filtração, FPR, fluxo plasmático renal; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal; \*p<0.05 diabético vs.respectivo não diabético; \* p<0.05 basa vs. L-NAME.

Tabela 3

Efeito agudo da infusão de L-arginina após 30 dias de diabetes em ratos recebendo L-NAME (Groups C+LNAME e DM+LNAME)

|          | PA       |            | RFG       |            | FF        |            | FPR       |            | RVR      |            |
|----------|----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
|          | Controle | L-Arginine | Controle  | L-Arginine | Controle  | L-Arginine | Controle  | L-Arginine | Controle | L-Arginine |
| C+LNAME  | 154±5    | 128±5*     | 1.12±0.04 | 1.25±0.08  | 0.40±0.02 | 0.30±0.02* | 2.82±0.18 | 4.63±0.47* | 30.2±3.1 | 15.6±2.1*  |
| DM+LNAME | 149±3    | 122±4*     | 1.26±0.03 | 1.31±0.05  | 0.40±0.02 | 0.28±0.03* | 3.54±0.57 | 5.12±0.59* | 26.6±2.5 | 14.0±1.6*  |

\_Resultados expressos como a média±1SE. Valores basais são iguais aos da tabela 1. Abreviações utilizadas nesta tabela: PA, pressão arterial média; RFG, ritmo de filtração glomerular; FF, fração de filtração, FPR, fluxo plasmático renal; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal; \*p<0.05 diabético vs.respectivo não diabético; \* p<0.05 basal vs. L-arginina.

Tabela 4

Efeito agudo da Endotelina-1 após 30 dias de diabetes

|    | PA<br>mmHg | RFG<br>ml/min |           | FF           |           | FPR<br>ml/min |           | RVR<br>mmHg/(ml·min) |           |
|----|------------|---------------|-----------|--------------|-----------|---------------|-----------|----------------------|-----------|
|    | Controle   | Endothelin-1  | Controle  | Endothelin-1 | Controle  | Endothelin-1  | Controle  | Endothelin-1         | Controle  |
| C  | 111±3      | 122±4*        | 1.36±0.04 | 1.20±0.06*   | 0.33±0.02 | 0.39±0.01*    | 4.02±0.22 | 2.87±0.12*           | 13.6±0.7  |
|    |            |               |           |              |           |               |           |                      | 21.3±1.3* |
| DM | 110±4      | 116±4*        | 1.76±0.08 | 1.62±0.09*   | 0.33±0.01 | 0.41±0.02*    | 5.56±0.30 | 3.90±0.27*           | 11.5±1.1  |
|    |            |               |           |              |           |               |           |                      | 16.8±1.2* |

\*Resultados expressos como a média±1SE. Valores basais são iguais aos da tabela 1. Abreviações utilizadas nesta tabela: PA, pressão arterial média; RFG, ritmo de filtração glomerular; FF, fração de filtração; FPR, fluxo plasmático renal; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal; \*p<0.05 diabético vs.respectivo não diabético; \* p<0.05 basal vs. Endotelina-1.

Tabela 5  
Efeito agudo da Angiotensina II 30 dias após da diabetes

|    | PA       |        | RFG       |           | FF        |            | FPR       |            | RVR      |           |
|----|----------|--------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|----------|-----------|
|    | Controle | All    | Controle  | All       | Controle  | All        | Controle  | All        | Controle | All       |
| C  | 110±3    | 142±4* | 1.35±0.06 | 1.32±0.04 | 0.34±0.01 | 0.48±0.02* | 3.96±0.24 | 2.77±0.06* | 15.0±1.0 | 26.5±1.1* |
| DM | 108±5    | 144±6* | 1.76±0.08 | 1.62±0.09 | 0.34±0.01 | 0.49±0.04* | 5.17±0.37 | 3.56±0.48* | 11.6±0.9 | 23.3±2.5* |

Resultados expressos como a média±1SE. Valores basais são iguais aos da tabela 1. Abreviações utilizadas nesta tabela: PA, pressão arterial média; RFG, ritmo de filtração glomerular; FF, fração de filtração, FPR, fluxo plasmático renal; FSR, fluxo sanguíneo renal; RVR, resistência vascular renal; \*p<0.05 diabético vs.respectivo não diabético; \* p<0.05 basal vs. A II.

## DISCUSSÃO

O diabetes mellitus insulino-dependente é caracterizado em suas fases iniciais por pronunciada hiperperfusão e hiperfiltração glomerulares além de hipertrofia renal (Stalder & Schmid, 1959; Hostetter et al, 1981; Fujihara et al, 1992). Os mecanismos responsáveis por este estado de vasodilatação renal ainda permanecem obscuros. Entretanto, é provável que substâncias vasodilatadoras estejam envolvidas.

O óxido nítrico (NO) tem sido apontado como a substância relaxante mais potente derivada do endotélio. Estudos experimentais mostram que a inibição tanto aguda quanto crônica da síntese de NO provocam alterações drásticas na hemodinâmica renal e sistêmica (Zatz & De-Nucci, 1991; Baylis et al, 1992; Ribeiro et al, 1992), ou seja, animais que recebem infusão aguda ou são tratados cronicamente com substâncias inibidoras da síntese de NO, apresentam nítido aumento da pressão arterial sistêmica, queda significativa do FPR e do FSR com aumento marcante da RVR. Entretanto, apenas uma ligeira queda no RFG é observada nestes animais. Isto caracteriza o importante papel do NO na manutenção do tônus da musculatura lisa vascular e pode explicar o aumento no RFG e no FPR devido a infusão aguda de aminoácidos ou a ingestão de sobrecarga proteica demonstradas tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Meyer et al, 1983; Tolins & Raij, 1991). Um trabalho experimental consistente com esta hipótese foi feito por Andrew J. King e colaboradores (King et al, 1991) mostrando que em ratos pré-tratados com L-NMMA, antagonista competitivo da síntese de NO, a resposta da hemodinâmica renal à infusão aguda de uma mistura de aminoácidos estava marcadamente atenuada. Este destacado papel fisiológico exercido pelo óxido

nítrico, particularmente na microcirculação renal, faz desta substância um forte candidato para a gênese da hiperfiltração glomerular associada ao diabetes mellitus.

Bank e Aynedjam (Bank & Aynedjian, 1993) mostraram que o NO pode estar envolvido na hiperfiltração renal do diabetes mellitus tipo I. Neste estudo, ratos diabéticos por estreptozotocina apresentaram nível plasmático e excreção urinária de nitratos e de nitritos (produtos da metabolização de NO) marcadamente elevados quando comparados com ratos normais não diabéticos. Outro trabalho recente que sugere que a produção de NO pode estar aumentada no diabetes mellitus foi descrito por Corbett e colaboradores (Corbett et al, 1992) que demonstraram que a aminoguanidina, que funciona como um inibidor de óxido nítrico, reverte a hiperperfusão tecidual e o vazamento transcáptilar de albumina observada na pele de ratos diabéticos.

No presente estudo, a hiperfiltração glomerular associada ao diabetes mellitus foi completamente bloqueada pelo tratamento crônico com L-NAME, como mostra a figura 1. De forma semelhante, a infusão aguda do inibidor da síntese de NO reverteu a hiperfiltração estabelecida no grupo DM (figura 2). A infusão aguda de L-NAME não alterou o RFG nos ratos controles entretanto, nos animais diabéticos houve um decréscimo de 26%, trazendo-o a valores semelhantes ao normal. Estes achados corroboram a hipótese de que o NO possa estar mediando, ao menos em parte, a hiperperfusão e hiperfiltração renal associada ao diabetes mellitus. Além disso, os ratos diabéticos exibiram maior sensibilidade à inibição do óxido nítrico (tabela 2 e tabela 3). Esta sensibilidade aumentada dos ratos diabéticos ficou bastante evidente com o efeito do L-NAME na RVR, pois enquanto no grupo controle a infusão aguda de L-NAME aumentou em 39% a RVR, nos ratos diabéticos este aumento foi três vezes maior (figura 3). Estes resultados são consistentes com um aumento

da atividade de NO. Entretanto, estes resultados poderiam ser obtidos mesmo com uma produção normal de NO se os animais diabéticos fossem inespecificamente mais sensíveis à ação de substâncias vasoconstritoras, como sugerem alguns estudos (Drury et al, 1984; White & Carrier, 1988; Hill & Larkins, 1989). No entanto, a resposta sistêmica e renal dos ratos diabéticos à infusão aguda de angiotensina II foi similar àquelas apresentadas por ratos controles não diabéticos (figuras 4 e 5). De forma semelhante, os efeitos hemodinâmicos à infusão de endotelina I foram de mesma magnitude tanto nos ratos controles quanto nos diabéticos como ilustra as figuras 6 e 7, sugerindo que a resposta exagerada destes animais ao L-NAME se deve a produção aumentada de NO e não a maior sensibilidade a estímulos vasoconstritores. A excreção urinária de nitratos e nitritos, foi aproximadamente 4 vezes maior por ratos diabéticos do que por animais controles (figura 8). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Bank e Aynedjian (Bank & Aynedjian, 1993) e por Tolins e colaboradores (Tolins et al, 1993); que descreveram uma excreção urinária de nitratos e de nitritos de 4 a 5 vezes maior por ratos diabéticos comparados com ratos não diabéticos.

Embora estudos com inibição crônica de NO em ratos diabéticos não tenham sido desenvolvidos previamente, respostas exacerbadas por inibição aguda de NO no diabetes experimental foram descritos em dois estudos recentes. Cooper e colaboradores (Cooper et al, 1993) mostraram aumento da excreção urinária de GMPc além de uma resposta hemodinâmica renal e sistêmica exacerbada com a administração aguda de L-NAME depois de 18 dias de diabetes. Tolins e colaboradores (Tolins et al, 1993) mostraram que a infusão aguda de L-NAME em ratos diabéticos normalizou completamente o RFG. Por outro lado, alguns trabalhos realizados *in vitro* mostram produção diminuída de GMPc além de diminuição na resposta vasorrelaxante vascular em resposta à

substâncias que levam a liberação de EDRF (óxido nítrico) em tecidos de ratos diabéticos (Teshfamarian et al, 1993; Wang et al, 1993). Embora Bank e Aynedjian tenham demonstrado que em ratos diabéticos há produção aumentada de nitratos e nitritos, estes autores obtiveram uma resposta hemodinâmica diminuída à infusão de L-NAME. A causa destes resultados conflitantes não estão claros. Porém, deve ser observado que no presente estudo, assim como no trabalho de Tolins e colaboradores (Tolins et al, 1993) e Cooper e colaboradores (Cooper et al, 1993), os ratos diabéticos receberam injeções de insulina diariamente a fim de manter níveis moderados de hiperglicemia e simular as condições metabólicas de indivíduos diabéticos. Muitas observações sobre diabetes experimental *in vivo* tem sido feita na ausência de insulina, como no estudo realizado por Bank e Aynedjian (Bank & Aynedjian, 1993). A ausência completa de insulina pode levar a uma diminuição do crescimento, instabilidade hemodinâmica, comprometimento renal e queda do RFG. Tendo em vista a grande influência da insulino-terapia sobre a hemodinâmica renal de animais diabéticos é provável que níveis de insulina extremamente baixos possam alterar os efeitos renais do NO assim como, sua inibição. Além disso, nos experimentos realizados *in vivo* o animal é submetido a um procedimento cirúrgico com consequente perdas de líquido corpóreo. A reposição de volume extracelular com plasma não foi sempre realizada, ao contrário do nosso estudo. Sabe-se que a hemodinâmica renal e sistêmica pode estar deprimida em ratos normais sobre condições hidropênicas (Maddox et al, 1977), assim, é possível que ratos diabéticos sejam mais susceptíveis a tais condições, o que poderia explicar resultados tão divergentes encontrados na literatura.

A administração de vasorrelaxantes dependentes de endotélio tais como acetilcolina tem um efeito menor em tecidos obtidos de animais diabéticos. Isto

poderia ser explicado pelo aumento da produção basal de NO no diabetes. Consequentemente, a resposta relaxante seria menor quando comparados com controles não diabéticos já que o NO adicional, produzido após a administração de acetilcolina, é relativamente pouco importante comparado à produção basal. Entretanto, é importante considerar que o tecido de animais diabéticos estudado isoladamente pode não corresponder a situação real do organismo hiperglicêmico. Nos estudos *in vitro* a ausência de hormônios que parecem estar aumentados no diabetes mellitus clínico e experimental como por exemplo o ANF, algumas prostaglandinas, o glucagon, entre outros, poderia estar levando a esta resposta diminuída. Em desacordo com as observações *in vitro*, um estudo clínico não evidenciou nenhuma diferença significativa na resposta relaxante dependente do endotélio em indivíduos diabéticos tipo I comparados com indivíduos sadios após a infusão de uma droga análoga à Acetilcolina (Smits et al, 1993). Assim, vale lembrar que os resultados obtidos a partir de experimentos *in vitro* nem sempre podem ser extrapolados para uma situação *in vivo*.

Como demonstrado previamente (Ribeiro et al, 1992), a administração de L-arginina reverteu a hipertensão sistêmica, a vasoconstrição renal e a hipoperfusão associada ao tratamento crônico com L-NAME em ratos controles e ratos diabéticos, confirmando que o efeito deste composto foi devido a inibição de NO. Em contrapartida, a infusão de L-arginina não reverteu a hiperfiltração glomerular nos ratos diabéticos, embora as condições necessárias para o desenvolvimento de hiperfiltração estivessem presumivelmente presentes. Estes resultados poderiam ser uma evidência contra a hipótese de que o NO participa do processo de hiperfiltração do diabetes. No entanto deve-se lembrar que para que se instalem as alterações hemodinâmicas glomerulares associadas ao diabetes mellitus é necessário um

período relativamente longo desde a indução até que as alterações fisiológicas e ou hormonais estejam estabelecidas (Carney et al, 1979), o que pode explicar o fato da L-arginina não ter revertido a hiperfiltração.

A consistência dos resultados obtidos sugerem que a atividade do NO está aumentada e que este composto pode estar mediando, ao menos em parte, a hiperperusão e hiperfiltração glomerularares associada ao diabetes mellitus experimental.

## SUMÁRIO

1 - O tratamento crônico com L-NAME preveniu a hiperfiltração e a hiperperfusão em ratos diabéticos. Em concordância, a administração aguda do inibidor promoveu acentuada vasoconstrição renal e reverteu a hiperperfusão e a hiperfiltração estabelecida em ratos diabéticos sem tratamento crônico.

2 - As respostas microcirculatória renal e sistêmica a endotelina I e a angiotensina II foram de mesma magnitude em ratos diabéticos e ratos controles normais, indicando que a resposta aumentada dos ratos diabéticos ao L-NAME não resultou de uma hiperresponsividade inespecífica à vasoconstritores.

3 - A excreção urinária de metabólitos do NO foi 4 vezes maior por ratos diabéticos do que por ratos controles normais.

## CONCLUSÃO

A produção aumentada de óxido nítrico pode contribuir, ao menos em parte, para a vasodilatação renal e a hiperfiltração glomerular observadas no diabetes mellitus experimental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BREYER, J. A. Diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *Am. J. Kidney. Dis.* 20: 533-547, 1992.
2. MARRE, M.; HALLAB, M.; ROY, J.; LEJEUNE, J.-J.; JALLET, P.; FRESSINAUD, P. Glomerular hyperfiltration in type I, type II, and secondary diabetes. *J. Diabetes. Complications.* 6: 19-24, 1992.
3. HOSTETTER, T. H.; TROY, J. L.; BRENNER, B. M. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 19: 410-415, 1981.
4. ZATZ, R.; DUNN, B. R.; MEYER, T. W.; ANDERSON, S.; RENNKE, H. G.; BRENNER, B. M. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J. Clin. Invest.* 77: 1925-1930, 1986.
5. FUJIHARA, C. K.; PADILHA, R. M.; ZATZ, R. Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes: Role of hemodynamic and nonhemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy. *Diabetes* 41: 286-293, 1992.
6. ZATZ, R.; MEYER, T. W.; RENNKE, H. G.; BRENNER, B. M. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factor in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:

5963-5967, 1985.

7. CHRISTIANSEN, J. S.; GAMMELGARD, J.; ORSKOV, H.; ANDERSON, A. R.; TELMER, S.; PARVING, H. H. Kidney function and size in normal subjects before and during-growth hormone administration for one week. *Eur. J. Clin. Invest.* 11: 487-490, 1981.
8. PARVING, H.-H.; NOER, I.; KEHLET, H.; MOGENSEN, C. E.; SVENDSEN, P. A.; HEDING, L. The effect of short-term glucagon infusion on kidney function in normal man. *Diabetologia.* 13: 323-325, 1977.
9. APPIANI, A. C.; ASSAEL, B. M.; TIRELLI, A. S.; CAVANNA, G.; MARRA, G. Sodium excretion and hyperfiltration during glucose infusion in man. *Am. J. Nephrol.* 10: 103-108, 1990.
10. HARVEY, J. N.; EDMUNDSON, A. W.; JAFFA, A. A.; MARTIN, L. L.; MAYFIELD, R. K. Renal excretion of kallikrein and eicosanoids in patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Relationship to glomerular and tubular function. *Diabetologia.* 35: 857-862, 1992.
11. BROCHER-MORTENSEN, J. Glomerular filtration rate and extracellular fluid volume during normoglycemia and moderate hyperglycemia in diabetes. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 32: 311-316, 1973.
12. ORTOLA, F. V.; BALLERMANN, B. J.; ANDERSON, S.; MENDEZ, R. E.; BRENNER, B. M. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. Potential mediator of hyperfiltration. *J. Clin. Invest.* 80:

670-674, 1987.

13. FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
14. BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest.* 90: 278-291, 1992.
15. ZATZ, R.; DE-NUCCI, G. Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte. Physiol.* 261: F360-F363, 1991.
16. RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE-NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20: 298-303, 1992.
17. KING, A. J.; TROY, J. L.; ANDERSON, S.; NEURINGER, J. R.; GUNNING, M.; BRENNER, B. M. Nitric oxide: a potential mediator of amino acid-induced renal hyperemia and hyperfiltration. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 1271-1277, 1991.
18. TOLINS, J. P.; RAIJ, L. Effects of amino acid infusion on renal hemodynamics: Role of endothelium-derived relaxing factor. *Hypertension* 17: 1045-1051, 1991.

19. BAYLIS, C.; HARTON, P.; ENGELS, K. Endotelium-derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 875-881, 1990.
20. CLARIA, J.; JIMENEZ, W.; LA VILLA, G.; ASBERT, M.; CASTRO, A.; LLIBRE, J.; ARROYO, V.; RIVERA, F. Effects of endotelin on renal haemodynamics and segmental handling in conscious rats. *Acta Physiol Scand* 141: 305-308, 1991.
21. BADR, K. F.; MURRAY, J. J.; BREYER, M. D.; TAKAHASHI, K.; INAGAMI, T.; HARRIS, R. C. Mesangial Cell, Glomerular and Renal Vascular Responses to Endotelin in the Rat Kidney. *J. Clin. Invest.* 83: 336-342, 1989.
22. BLANTZ, R. C.; KONNEN, K. S.; TUCKER, B. J. Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. *J. Clin. Invest.* 57: 419-434, 1976.
23. BANK, N.; AYNEDJIAN, H. S. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.* 43: 1306-1312, 1993.
24. TOLINS, J. P.; SCHULTZ, P. J.; RAIJ, L.; BROWN, D. M.; MAUER, S. M. Abnormal renal hemodynamic response to reduced perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am. J. Physiol.* 265: F886-F895, 1993.
25. CONRAD, K. P.; JOFFE, G. M.; KRUSZYNA, H.; KRUSZYNA, R.; ROCHELLE, L. G.; SMITH, R. P.; CHAVEZ, J. E.; MOSHER, M. D.

Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats.

FASEB J. 7: 566-571, 1993.

26. GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.

27. WALLENSTEIN, S.; ZUCKER, C. L.; FLEISS, J. L. Some statistical methods useful in circulation research. *Circulation* 41: 1-9, 1980.

28. STALDER, G.; SCHMID, R. Severe functional disorders of glomerular capillaries and renal hemodynamics in treated diabetes mellitus during childhood. *Ann. Paediat.* 193: 129-138, 1959.

29. MEYER, T. W.; ICHIKAWA, I.; ZATZ, R.; BRENNER, B. M. : The renal hemodynamic response to amino acid infusion in the rat. *Trans Am Soc Phys.* 96: 76-83, 1983.

30. CORBETT, J. A.; TILTON, R. G.; CHANG, K.; HASAN, K. S.; IDO, Y.; WANG, J. L.; SWEETLAND, M. A.; LANCASTER, J. R., Jr.; WILLIAMSON, J. R.; MCDANIEL, M. L. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41: 552-556, 1992.

31. DRURY, P. L.; SMITH, G. M.; FERRISS, J. B. Increased vasopressor responsiveness to angiotensin II in Type I (insulin-dependent) diabetic patients without complications. *Diabetologia.* 27: 174-179, 1984.

32. WHITE, R. E.; CARRIER, G. O. Enhanced vascular alpha-adrenergic neuroeffector system in diabetes: importance of calcium. *Am. J. Physiol.* 255: H1036-H1042, 1988.
33. HILL, M. A.; LARKINS, R. G. Altered microvascular reactivity in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Am. J. Physiol.* 257: H1438-H1445, 1989.
34. COOPER, M. E.; KOMERS, R.; ALLEN, T. J. Diabetic hyperfiltration: role of nitric oxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4: 546, 1993.
35. WANG, Y.-X.; BROOKS, D. P.; EDWARDS, R. M. Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 264: R952-R956, 1993.
36. TESHAMARIAN, B.; PALACINO, J. J.; WEISBROD, R. M.; COHEN, R. A. Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21: 205-211, 1993.
37. MADDOX, D. A.; PRICE, D. C.; RECTOR, J., FC. Effects of surgery on plasma volume and salt and water excretion in rats. *Am. J. Physiol.* 233: F600-F606, 1977.
38. SMITS, P.; KAPMA, J.-A.; JACOBS, M.-C.; LUTTERMAN, J.; THIEN, T. Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with Type I diabetes. *Diabetes* 42: 148-153, 1993.

39. CARNEY, S. L.; WONG, N. L. M.; DIRKS, J. H. Acute effects of streptozotocin diabetes on rat renal function. *J. Lab. Clin. Med.* 93: 950-961, 1979.

## ABSTRACT

**NITRIC OXIDE OVERPRODUCTION MEDIATES GLOMERULAR HYPERFILTRATION IN DIABETIC RATS.** We examined the hypothesis that nitric oxide (NO) could mediate hyperfiltration in experimental diabetes. Thirty-five adult male Munich-Wistar rats with streptozocin-induced diabetes and 39 nondiabetic controls were distributed among 4 groups: C, normal controls; C+LNAME, controls receiving the NO inhibitor N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 40 mg/dl in drinking water; DM, diabetic rats; DM+LNAME, diabetic rats receiving L-NAME, 15 mg/dl in drinking water. After 1 month of treatment, L-NAME raised blood pressure in Groups C+LNAME and DM+LNAME and prevented renal hyperfiltration and hyperperfusion in Group DM+LNAME. Acute administration of L-NAME, 2.5 mg/kg, raised blood pressure, depressed GFR and promoted renal vasoconstriction to a much greater extent in Group DM than in Group C. Acute administration of endothelin 1 (600 ng/kg in bolus) or angiotensin II (25  $\mu$ g/kg/min continuous infusion) exerted similar renal hemodynamic effects in Groups C and DM, suggesting that the enhanced effect of acute L-NAME in DM reflected a specific sensitivity of DM to NO inhibition. Urinary excretion of nitrates and nitrites was fourfold higher in DM compared to C. These results support the notion that augmented NO production may mediate renal hyperfiltration and hyperperfusion in diabetes.