

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Elen White Mateus Suedekum

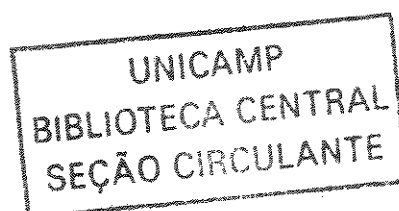
ESTUDO DA MANIPULAÇÃO TUBULAR RENAL DE SÓDIO E DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS DIABÉTICOS APÓS O TRATAMENTO COM FUROSEMIDA: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES AT1 DA ANGIOTENSINA E DA INERVAÇÃO RENAL

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Elen White Mateus Suedekum e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia

Orientador: Prof. Dr José Antônio Rocha Gontijo

2002



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	71 Unicamp
	Su 24e
V	EX
TOMBO BC	55125
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/08/03
Nº CPD	

CM00187294-B

Buhol 297796

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Su24e **Suedekum, Elen White Mateus**
 Estudo da manipulação tubular renal de sódio e da pressão arterial
 em ratos diabéticos após o tratamento com furosemida: envolvimento
 de receptores AT1 da angiotensina e da inervação renal/
 Elen White Mateus Suedekum. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: José Antônio Rocha Gontijo
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

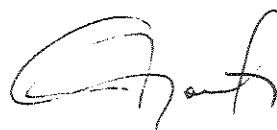
1.Diabetes. 2.Angiotensina. 3. Pressão arterial. I. Gontijo, José
 Antônio Rocha. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Biologia. III. Título

Data da defesa: 19 de dezembro de 2002

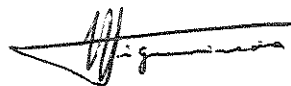
Banca examinadora da dissertação de mestrado

Membros

Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo (**Orientador**)



Prof. Dr. José Francisco Figueiredo



Profa Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho



Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheiras

154976751

Dedicatória

Ao Ivo e Guilherme, esposo e filho, pelo amor,
carinho e incentivo.

Agradecimentos

A Deus, pela vida, sabedoria e maravilhas realizadas em minha vida.

Ao Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo, meu orientador, pelos seus ensinamentos e incentivos, possibilitando assim a realização deste trabalho. Muito obrigada.

Ao Ivo Suedekum, meu esposo, pelo amor, companheirismo e incentivos.

Ao Guilherme Mateus Suedekum, meu filho, pelo carinho e respeito, e pela felicidade que proporciona à minha vida.

Aos meus pais (em memória), pelo amor e educação cristã.

Aos meus irmãos que sempre apoiaram meus estudos.

Ao Prof. Dr. José Francisco Figueiredo, pelo apoio e utilização de seu laboratório.

Às amigas Leda Bento, Paula Belline e Renata Romanez, pelo apoio e amizade incondicionais.

Às amigas Rosana Yuri, Maria Helena Lima, Rosa Tambascia e Ivone, pelo apoio nas horas difíceis.

À amiga Adriana Zapparoli, pela amizade e orientações das técnicas utilizadas neste trabalho.

À funcionária D. Neide Gaspar, pelo auxílio diário.

À Conceição Silva, pela orientação e auxílio nas dosagens laboratoriais.

Aos amigos Fabiana de Paula e Adilton pelo apoio e dicas.

Ao Alexandre Mateus, meu sobrinho, colaborador na área de informática.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos animais de experimentação, sem os quais a pesquisa científica estaria estacionada.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	viii
Lista de tabelas e figuras	x
Resumo	xiii
<i>Summary</i>	xv
Introdução	1
Objetivos	19
Métodos e materiais	21
Resultados	35
Discussão	88
Conclusão	120
Referências bibliográficas	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AGES: agentes finais da glicolização avançada

All: angiotensina II

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

ARNA: atividade neural renal aferente

AT1: receptores AT1 de angiotensina II

AT2: receptores AT2 de angiotensina II

Ca²⁺: íon cálcio

Ccr: *clearence* de creatinina

CLi: *clearence* de lítio

LiCl: cloreto de lítio

CNa: *clearence* de creatinina

Co: animais-controle

CR: quimiorreceptores

DM: animais diabéticos induzidos por estreptozotocina

DM+DNx: animais diabéticos induzidos por estreptozotocina e submetidos à denervação renal bilateral.

DM+Los: animais diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com losartan

DM+sham: animais diabéticos induzidos por estreptozotocina e submetidos à cirurgia simulada de denervação renal bilateral

DNx: animais submetidos à denervação renal bilateral

ECA: enzima conversora de angiotensina I

ERNA: atividade neural renal eferente

GMPc: monofosfato de guanosina cíclico

FEK: fração de excreção de potássio

FENa: fração de excreção de sódio

FEPNa: fração de excreção proximal de sódio

FEPPNa: fração de excreção pós-proximal de sódio

IP3: trifosfato-inositol

K⁺: potássio

Li⁺: lítio

Los: animais tratados com losartan

MB: membrana basal

Mr: mecanorreceptores

Na⁺: sódio

NaCl: cloreto de sódio

PAC: pressão arterial caudal

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

sham: animais submetidos à cirurgia simulada de denervação renal bilateral

SRA: sistema renina-angiotensina

TGFβ1: fator de crescimento transformador β1

V: volume urinário

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura A- Esquema experimental do <i>clearance</i>	28
Figura B- Pressão arterial	34
Tabela e figura 1- Pressão arterial caudal dos grupos Co e Los	39
Tabela e figura 2- Massa corporal dos grupos Co e Los	40
Tabela e figura 3- Volume urinário dos grupos Co e Los	41
Tabela e figura 4- <i>Clearance</i> de creatinina dos grupos Co e Los	42
Tabela e figura 5- Fração de excreção urinária de potássio dos grupos Co e Los	43
Tabela e figura 6- Fração de excreção urinária de sódio dos grupos Co e Los	44
Tabela e figura 7- <i>Clearance</i> de sódio dos grupos Co e Los	45
Tabela e figura 8- <i>Clearance</i> de lítio dos grupos Co e Los	46
Tabela e figura 9- Fração de excreção proximal de sódio dos grupos Co e Los	47
Tabela e figura 10- Fração de excreção pós-proximal de sódio dos grupos Co e Los	48
Tabela e figura 11- Glicemia dos grupos DM e DM+Los	52
Tabela e figura 12- Massa corporal dos grupos DM e DM+Los	53
Tabela e figura 13- Pressão arterial caudal dos grupos DM e DM+Los	54
Tabela e figura 14- Volume urinário dos grupos DM e DM+Los	55
Tabela e figura 15- <i>Clearance</i> de creatinina dos grupos DM e DM+Los	56
Tabela e figura 16- Fração de excreção urinária de potássio dos grupos DM e DM+Los	57
Tabela e figura 17- Fração de excreção urinária de sódio dos grupos DM e DM+Los	58
Tabela e figura 18- <i>Clearance</i> de sódio dos grupos DM e DM+Los	59
Tabela e figura 19- <i>Clearance</i> de lítio dos grupos DM e DM+Los	60
Tabela e figura 20- Fração de excreção proximal de sódio dos grupos DM e	

DM+Los	61
Tabela e figura 21- Fração de excreção pós-proximal de sódio dos grupos DM e DM+Los	62
Tabela e figura 22- Massa corporal dos grupos sham e DNx	65
Tabela e figura 23- Pressão arterial caudal dos grupos sham e DNx	66
Tabela e figura 24- Volume urinário dos grupos sham e DNx	67
Tabela e figura 25- <i>Clearance</i> de creatinina dos grupos sham e DNx	68
Tabela e figura 26- Fração de excreção urinária de potássio dos grupos sham e DNx	69
Tabela e figura 27- Fração de excreção urinária de sódio dos grupos sham e DNx	70
Tabela e figura 28- <i>Clearance</i> de sódio dos grupos sham e DNx	71
Tabela e figura 29- <i>Clearance</i> de lítio dos grupos sham e DNx	72
Tabela e figura 30- Fração de excreção proximal de sódio dos grupos sham e DNx	73
Tabela e figura 31- Fração de excreção pós-proximal de sódio dos grupos sham e DNx	74
Tabela e figura 32- Glicemia dos grupos DM+sham e DM+DNx	77
Tabela e figura 33- Massa corporal dos grupos DM+sham e DM+Los	78
Tabela e figura 34- Pressão arterial caudal dos grupos DM+sham e DM+DNx	79
Tabela e figura 35- Volume urinário dos grupos DM+sham e DM+DNx	80
Tabela e figura 36- <i>Clearance</i> de creatinina dos grupos DM+sham e DM+DNx	81
Tabela e figura 37- Fração de excreção urinária de potássio dos grupos DM+sham e DM+DNx	82
Tabela e figura 38- Fração de excreção urinária de sódio dos grupos DM+sham e DM+DNx	83
Tabela e figura 39- <i>Clearance</i> de sódio dos grupos DM+sham e DM+DNx	84
Tabela e figura 40- <i>Clearance</i> de lítio dos grupos DM+sham e DM+DNx	85

Tabela e figura 41- Fração de excreção proximal de sódio dos grupos DM+sham e DM+DNx	86
Tabela e figura 42 - Fração de excreção pós-proximal de sódio dos grupos DM+sham e DM+DNx	87

RESUMO

Alterações morfológicas e funcionais de diferentes sistemas e aparelhos e a hipertensão arterial têm sido demonstrados freqüentemente na evolução da *diabetes mellitus*. Dentre estas alterações funcionais, destacam-se aquelas manifestações relacionadas à modificação de manipulação tubular de sódio e do balanço hidrossalino. Pouco se conhece sobre o envolvimento da angiotensina II e da atividade neural nesta alteração, bem como da importância destas na modulação de uma resposta contra-reguladora durante a depleção volêmica induzida pela furosemida.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do bloqueio de receptores AT1 da angiotensina II e da atividade neural renal sobre a pressão arterial e a manipulação tubular renal de sódio, após a administração aguda ou crônica de furosemida, na *diabetes mellitus* experimental

Para a avaliação do papel dos receptores AT1 da angiotensina II e da atividade neural renal, comparamos oito grupos de animais: 1) controle; 2) controle tratado com losartan; 3) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina, 4) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina e tratado com losartan, 5) controle submetido à cirurgia simulada de denervação renal bilateral; 6) controle submetido à denervação renal bilateral, 7) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina e submetido à cirurgia simulada de denervação renal bilateral; e 8) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina e submetido à denervação renal bilateral.

A pressão arterial foi aferida semanalmente através do método de plestimografia de cauda e o estudo funcional renal foi estimado através dos *clearances* de creatinina endógeno e de lítio, em ratos Wistar-Hannover acordados em gaiolas metabólicas individuais.

Nossos resultados mostram que: 1) uma progressiva elevação da pressão arterial ocorreu em animais diabéticos, que foi atenuada pela denervação renal bilateral; 2) losartan 10 mg/kg/dia reduz a pressão arterial em animais-controle; todavia, perde a sua eficácia hipotensora em animais diabéticos, após a

administração crônica de furosemida; 3) a administração oral aguda de furosemida promoveu uma natriurese em animais-controle e diabéticos, por elevar a excreção de sódio em segmentos proximais e pós-proximais do néfron; 4) o tratamento crônico de furosemida promoveu uma significativa atenuação nesta resposta natriurética por promover uma queda na fração de excreção de sódio, principalmente em segmentos pós-proximais do néfron, associada também à queda da taxa de filtração glomerular em animais controles e diabéticos; 5) losartan atenua a resposta diurética induzida pela administração aguda e crônica de furosemida em animais diabéticos; 6) losartan não modificou a resposta natriurética observada principalmente em segmentos pós-proximais do néfron em animais controles; 7) o bloqueio de receptores AT1 da angiotensina causa elevação da taxa de filtração glomerular associada à queda da fração de excreção proximal de sódio em animais diabéticos; 8) a denervação renal bilateral atenuou a resposta natriurética à administração aguda de furosemida por reduzir a excreção de sódio em segmentos pós-proximais do néfron; 9) a denervação renal não aboliu a resposta natriurética induzida por furosemida administrada cronicamente.

Portanto, nosso estudo mostra que na *diabetes mellitus* ocorre uma elevação significativa da pressão arterial sistêmica, que é atenuada pela denervação renal bilateral, e sugere que mecanismos contra-regulatórios à depleção do volume sanguíneo ocorrem independentemente da ação de angiotensina II e da atividade neural renal.

SUMMARY

Functional and morphological modification of the different animal systems and apparatus, and arterial blood pressure has been demonstrated in the evolution of the diabetes mellitus. Among these dysfunctions, detach to these related to the modifications of sodium tubular handling and the hydro-saline homeostasis. The studies evaluating the evolving of angiotensin II and renal nerve activity in this pathophysiological situation are not wide at the moment, as well as the importance these in the modulation of a counter-regulatory answer during depletion's volume that was induce by furosemide

The objective of study was evaluate the influence of the blockade of the AT1 angiotensin receptors and of the renal nerve activity on the arterial blood pressure and sodium renal tubular handling, after acute and chronic administration of furosemide, in diabetes mellitus animal model induced by streptozotocin i.v administration in rats. To examine the role of AT1 angiotensin receptors and of the renal nerve activity, we compared eight groups of animals: 1) contol rats, 2) losartan treated rats; 3) streptozotocin-induced DM rats; 4) losartan treated streptozotocin-induced DM rats; 5) sham-operated rats; 6) denervated rats; 7) sham-operated streptozotocin-induced DM rats, e 8) denervated streptozotocin-induced DM rats.

The arterial blood pressure was measured weekly by tail plethysmography method and renal function test was estimated by lithium and creatinine clearance, in concious and unrestrained rats and individual metabolic cages.

The results of present study demostrate that: 1) a progressive elevation of the arterial pressure occured in diabetic animals that is attenuaded by bilateral renal denervation; 2) losartan 10 mg/kg/day reduced the arterial pressure in controls animals; but it lose its efficacy in diabetic animals, after the chronic administration of furosemide; 3) the acute oral administration of furosemide promoted a natriurese, in controls and diabetic animals, by elevate the sodium excretion in proximal and post-proximal nefron segment.; 4) the chronic tratment of

furosemide promoted a significant attenuation in this natriuretic response by induced a fall in sodium excretion fraction, mainly in post-proximal segment of nephron associated too to the fall of the glomerular filtration rate in controls and diabetic animals. 5) losartan attenuate the diuretic response induced by acute and chronic of furosemide in diabetic animals; 6) losartan no modified the natriurese response observed principally in post-proximal segment of nephron in controls animals; 7) the blockade of AT1 receptors of angiotensin II causes an elevation of the glomerular filtration rate associated to the a fall of the sodium proximal excretion fraction in diabetic animal; 8) the bilateral renal denervation attenuated the natriuretic response to acute administration of furosemide by reduce the sodium excretion in post-proximal segment nephron; 9) the renal denervation no abolished a natriuretic response induced by chronic administration of furosemide.

Therefore, our study demonstrate that in *diabetes mellitus* occurs a significant elevation of the systemic arterial pressure that is attenuated by bilateral renal denervation. And, it suggests that contra-regulatory mechanisms to the blood volume depletion occur independently of angiotensin II and renal nerve activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A *diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, caracterizada pela falta de secreção pancreática de insulina ou da resistência periférica à ação insulínica (108), causando disfunção no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Seus sintomas clínicos mais comuns são poliúria, polidipsia, polifagia associada à perda de peso, decorrentes da hiperglicemia. Atualmente, é classificada em *diabetes mellitus* tipo 1, *diabetes mellitus* tipo 2 e diabetes secundário (121).

A *diabetes mellitus* tipo 1 é uma doença multifatorial com caráter autoimune e cuja suscetibilidade é determinada por fatores genéticos e ambientais, tendo como resultado final a destruição de células β pancreáticas e hipoinsulinemia (139).

A hiperglicemia crônica, consequência da hipoinsulinemia, tem sido relatada como o principal fator de risco para desenvolvimento de complicações tais como doenças cardíacas (79), retinopatia (79), nefropatia (136) e neuropatia (137).

1.2 NEFROPATIA DIABÉTICA

O comprometimento renal é uma séria complicação da DM que ocorre em 30-40% dos pacientes (4), caracterizada por uma inicial hipertrofia e hiperfunção renal (hiperfiltração e hiperfluxo glomerular) associada a uma progressiva e persistente proteinúria, queda da taxa de filtração glomerular e desenvolvimento da hipertensão arterial (160).

A evolução da nefropatia diabética apresenta três fases distintas. Na primeira fase, fase silenciosa, observa-se uma hiperfiltração glomerular acompanhada de uma hipertrofia renal. Na segunda fase, modificações estruturais do glomérulo causam o aparecimento de microalbuminúria (15 e 200 µgramas/minuto) e em alguns pacientes a elevação da pressão arterial sistêmica. E na terceira fase, ocorrem alterações estruturais avançadas do glomérulo associadas à proteinúria maciça (> 500 mg/24 horas), à hipertensão arterial estabelecida e à uma redução progressiva de filtração glomerular evoluindo para insuficiência renal crônica (146).

A hiperfiltração glomerular tem sido documentada tanto clínica (22) quanto experimentalmente (66). Estudos de Hostetter *et al.* (66) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina com hiperglicemia moderada mostraram que a hiperfiltração glomerular ocorre como consequência da diminuição da resistência arteriolar aferente glomerular, resultando em uma elevação do fluxo sanguíneo renal e da pressão hidráulica capilar glomerular.

Fatores humorais, a própria hiperglicemia e fatores nutricionais têm sido considerados os possíveis mediadores da hiperfiltração glomerular. Estudos em ratos diabéticos tratados com um antagonista de receptor B₂ de cininas (BKA) (69) demonstraram que estas são possíveis mediadoras da hiperfiltração glomerular, uma vez que promoveram um decréscimo na resistência arteriolar renal elevando conseqüentemente o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular. Woods *et al.* (154) e Blatz *et al.* (18) relataram que a hiperglicemia eleva a pressão hidráulica intersticial renal, atenuando o *feedback* túbulo-glomerular e

causando a vasodilatação peritubular renal. Ortola *et al.* (106) demonstraram que o peptídeo atrial natriurético, associado à elevação do volume extracelular em ratos diabéticos, promove uma hiperfiltração glomerular. Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentam hiperfiltração e hiperfluxo glomerular associado a uma elevação renal da síntese de óxido nítrico (12).

As alterações volêmicas e da taxa de filtração glomerular (GFR) estão diretamente relacionadas ao nível glicêmico. Na hiperglicemia moderada (aproximadamente 370 mg/dl), observa-se uma elevação da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal decorrente do decréscimo da resistência arteriolar aferente glomerular associada à elevação da pressão de ultrafiltração. Inversamente, na hiperglicemia severa (≥ 560 mg/dl), ocorre um decréscimo da taxa de filtração glomerular acompanhada por uma elevação da resistência arteriolar glomerular (66).

A hiperfusão e a hiperfiltração glomerular contribuem para o desenvolvimento hipertensão glomerular e para o espessamento da membrana basal (MB), sendo considerados os precursores da proteinúria e microangiopatia glomerular (141).

A proteinúria é um marcador importante da injúria glomerular. A manifestação mais comum durante a proteinúria é uma alteração da permosselatividade da MB como resultado da perda de cargas fixas eletronegativas e de uma disfunção podocitária, ou da combinação destes dois mecanismos (161).

A disfunção de permeabilidade da membrana basal glomerular foi confirmada na diabetes experimental. Estudo de Remuzzi *et al.* (120) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina após 12 meses de doença, utilizando o *clearance* fracional de Ficol como traçador da filtração glomerular de moléculas, demonstrou que a disfunção da permeabilidade glomerular é resultado do aumento do tamanho dos poros da membrana glomerular e que o tratamento com antagonista de receptores de angiotensina II preserva a função e a eletrosselatividade da membrana de filtração, sugerindo desse modo a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

A hiperglicemia crônica promove uma diminuição da eletronegatividade da MB glomerular através da glicolização não-enzimática de proteínas, modificando a permeabilidade aniônica de filtração da membrana basal glomerular (127).

As alterações morfológicas genéricas glomerulares observadas na nefropatia diabética se constituem no espessamento da membrana basal glomerular e a expansão do mesângio (7) e da matriz extracelular. Embora os mecanismos precisos que conduzem à expansão mesangial não sejam conhecidos, evidências sugerem que citocinas, fatores de crescimento, e hormônios vasoativos tenham um papel significativo (36). Os produtos finais da glicolização (AGEs) estão envolvidos no espessamento da membrana basal, alterando *cross-links* de proteínas da matriz tais como: colagen IV, lamina e fibronectina, e reduzindo a suscetibilidade à degradação proteolítica destas proteínas (149).

Disfunções tubulares têm sido relatadas na nefropatia diabética numa fase precoce do *diabetes mellitus* experimental. Chouinard e Viau (30) demonstraram que a excreção urinária de β -N-acetyl-D-glucosaminidase, de dehydrogenase láctica e alanine aminopeptidase (três enzimas do parênquima renal e de baixo peso molecular) e de β_2 -microglobulina está elevada e que a poliúria não modifica a excreção urinária destas proteínas. Sugere-se assim a existência de uma disfunção tubular renal na fase inicial da diabetes experimental (7 a 20 dias após a indução da diabetes). Esses autores mostraram ainda que a perda na capacidade de reabsorção tubular, demonstrada pelo padrão da excreção urinária da β_2 -microglobulina, pode ser revertida pelo controle metabólico da glicemia. A proteinúria de baixo peso molecular (proteinúria tubular) é utilizada como um indicador da capacidade reabsortiva tubular proximal (145). Tucker *et al.* 1993 (142), relataram que microalbuminúria na fase inicial da *diabetes mellitus* experimental é resultante de dois fatores: um modesto aumento na permeabilidade glomerular da albumina e um decréscimo na capacidade de reabsorção protéica pelos túbulos renais. Todavia, em uma fase mais tardia, o decréscimo da reabsorção tubular proximal de albumina está associado à diminuição da bordadura em escova das células do túbulo proximal. Como a albumina é

reabsorvida no túbulo proximal pelo processo endocitário e requer uma capacidade da membrana luminal em formar lisossomas, estes autores sugerem que a diminuição da altura da bordadura em escova seja um indicativo de decréscimo da capacidade endocitótica destas células tubulares (142).

Alterações na reabsorção tubular de sódio têm sido observadas na nefropatia diabética e favorecem o desenvolvimento de um balanço de Na^+ positivo (162). Em ratos diabéticos experimentais, a fase inicial da diabetes é caracterizada por natriurese excessiva devido à hiperfiltração glomerular, diurese osmótica e deficiência de insulina. A depleção do volume do fluido extracelular, causada pela natriurese, estimula a secreção de mineralocorticóides, que promovem o aumento da reabsorção de Na^+ pelos segmentos tubulares distais. Mecanismos renais e extra-renais são ativados e após três semanas do início da doença, o balanço de sódio torna-se positivo com elevação significativa do volume sanguíneo (162). Brochener- Mortensen *et al.* (22) utilizando o *clearance* de lítio como um marcador da manipulação tubular renal de sódio, constataram uma elevação da taxa reabsorção fracional proximal de sódio associada à hiperfiltração glomerular e a um aporte distal absoluto de sódio similar entre pacientes diabéticos e normais. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar esse aumento da reabsorção tubular de sódio: a hiperfiltração glomerular (66), o aumento da atividade do antiporte Na^+/H^+ no túbulo proximal (46) e do co-transporte Na^+ -glicose proximal, e uma elevação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ nos segmentos tubulares proximais (114), na alça ascendente espessa cortical e medular e no ducto coletor (147).

Resumidamente, as alterações morfológicas e funcionais da nefropatia diabética resultam de uma interação de fatores metabólicos e hemodinâmicos (35). Em relação aos fatores metabólicos, sabe-se que vias dependentes de glicose são ativadas dentro do rim tais como: aumento do estresse oxidativo, formação de polióis renais e elevação de produtos finais glicolizados (proteínas e lipídios). Os fatores hemodinâmicos mais importantes nesta doença decorrem de uma elevação das pressões de ultrafiltração e da pressão arterial e sistêmica e a ativação de várias vias de hormônios vasoativos, tais como: renina-angiotensina e

endotelina (35). Estas vias, atuando de maneira independente ou conjuntamente, ativam segundos mensageiros (proteína kinase C, MAP-kinase), fatores de transcrição nuclear (NF- κ B), fatores de crescimento e citocinas (TGF β e angiogênico, VEGF), que promovem aumento da permeabilidade renal de albumina e acumulação da matriz extracelular, resultando desse modo em uma proteinúria, glomero-esclerose e fibrose túbulo-intersticial (35).

1.3 HIPERTENSÃO ARTERIAL E A *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

A hipertensão arterial diabética está associada a uma resistência vascular periférica total aumentada e ao elevado *pool* total de Na^+ corporal (47). Os mecanismos que promovem a retenção renal de sódio, e conseqüentemente a elevação do volume extracelular na diabetes, são pouco conhecidos. Todavia, tem sido observada uma elevação da atividade do co-transporte de Na^+ -glicose (114) e da atividade do trocador Na^+/H^+ (46) que contribui significativamente para reabsorção tubular renal de grandes quantidades de sódio.

Alterações no transporte transmembrana deste cátion, em músculo liso vascular, têm um importante papel na resistência vascular periférica aumentada, pois podem promover um aumento do Ca^{+2} citoplasmático livre na musculatura lisa vascular, principal determinante da contratilidade vascular.

A insulina induz um decréscimo nos níveis de cálcio intracelular, conduzindo à hiperpolarização da membrana plasmática, causando um relaxamento vascular e reduzindo a reatividade a vasoconstritores (34). Esse efeito vasodilatador da insulina é explicado pela ação da insulina sobre o trocador de Na^+/H^+ e sobre a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ nas células musculares lisas vasculares, promovendo a hiperpolarização da membrana plasmática e um conseqüente fechamento de canais Ca^{+2} -voltagem-dependentes e da ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$.

O decréscimo da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ tem sido descrito na *diabetes mellitus* tipo 1 experimental. Estudo de Michea *et al.* (99) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina mostra uma reduzida expressão e atividade da isoforma α_2 de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ no tecido vascular, conduzindo à elevação intravascular transitória de Ca^{+2} , o que contribui para uma elevação do tônus e da contratilidade vascular.

Michea *et al.* (99) relataram que a atividade do co-transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ em células vasculares lisas de vasos de condutância (aorta), de ratos diabéticos tipo 1, está aumentada. Este transporte de íons pode ser ativado por vasoconstritores

em tecido vascular (2). Logo, alterações na atividade basal deste co-transporte podem favorecer um aumento no tônus vascular na diabetes (99).

Foi demonstrado que a atividade do trocador Na^+/H^+ se apresenta aumentada em leucócitos (104) e fibroblastos (80) de pacientes diabéticos insulino-dependente (tipo 1). O pH, o volume e o crescimento celulares são regulados pelo trocador Na^+/H^+ . Estudos mostram que a atividade do trocador Na^+/H^+ sofre a influência da síntese intracelular de 1,2-diacyl-glicerol e da proteína quinase C (16).

A atividade aumentada do trocador Na^+/H^+ induz a alcalização celular, um conhecido mecanismo de estímulo de síntese protéica e de proliferação celular, e promotor da remodelação vascular, hipertrofia e aceleração da aterosclerose (47). Logo, o aumento da atividade deste antiporte no rim e no tecido vascular liso pode modular os níveis pressóricos, a proliferação celular muscular lisa e a progressiva deterioração renal.

A hiperglicemia também contribui para o desenvolvimento da hipertensão arterial diabética através dos seguintes mecanismos: 1) retenção de sódio, decorrente de elevada filtração glomerular e conseqüente elevação do co-transporte Na^+ -glicose no túbulo proximal renal; 2) estimulação da síntese de fibrinectina pelas células mesangiais, contribuindo para disfunção glomerular e 3) aumento da matriz mesangial e da celularidade desta, associada à proliferação de células musculares lisas vasculares como conseqüência de um *cross-link* entre proteínas renais e produtos finais da glicolização avançada, que induzem a hipertrofia e remodelamento vascular (47).

1.4 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido considerado um elemento importante na regulação da pressão arterial e do balanço do sódio (125). Angiotensina II (AII) é o principal efetor do SRA e desse modo está envolvida no controle hidro-salino e da pressão arterial sistêmica. Este sistema é ativado por uma cascata enzimática que inicia com a síntese e liberação de renina pelo aparelho justaglomerular (rim) em resposta às quedas da pressão arterial, da pressão de perfusão renal e da carga de sódio que atinge os segmentos distais do néfron. A renina cliva o angiotensinogênio, uma glicoproteína circulante, e libera angiotensina I, um decapeptídeo biologicamente inativo. Este peptídeo é convertido em AII (octopeptídeo), nos pulmões e tecidos periféricos, pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Em seguida, AII é clivada em angiotensina III (AIII) pela enzima angiotensinase A (125).

As respostas biológicas da AII são mediadas por receptores de membranas localizados em vários tecidos e classificados farmacologicamente em AT1 e AT2 (25). Subtipos de AT1, AT1A e AT1B, foram encontrados em tecidos de ratos (68, 77) e camundongos (122), e recentemente foi verificada a existência de AT1B em humanos (83). O mecanismo intracelular de transdução de sinal através de AT1 é acoplado à proteína G, ativando fosfolipase C, D, A2 que promovem a inibição da adenil-ciclase, causando elevação de níveis de IP3 e diacil-glicerol e mobilização citoplasmática de cálcio (129, 64). Em relação ao AT2, os mecanismos de sinalização não são claros, porém tem sido observado uma diminuição da atividade da guanil-ciclase (21), reduzindo os níveis intracelulares de GMPc.

Estudo recente (67) em ratos demonstrou receptores AT1 intra-renais em: 1) células mesangiais e podócitos, 2) membrana basolateral e bordadura de escova de túbulos proximais, 3) mácula densa, 4) membranas luminais e basolaterais de túbulos distais e dutos coletores medulares e corticais, e 5) em célula muscular lisa de vasculatura arterial renal. Essa abundância de receptores

AT1 na membrana luminal dos vários segmentos tubulares evidencia o importante papel regulador da angiotensina II para a função tubular (67).

Angiotensina II atua no controle da volemia, da pressão arterial sistêmica, e da excreção renal de sódio e água. Estes efeitos ocorrem através de sua potente ação vasoconstritora, através da modulação da atividade simpática periférica e central; promovendo uma diminuição da excreção renal de água e sódio através da liberação de aldosterona pelas células do córtex adrenal e de epinefrina pelas células da medula adrenal e aumentando a secreção central de vasopressina, que estimula a retenção de água, a ingestão hídrica e o apetite salino em áreas do sistema nervoso central. No rim, AII estimula diretamente o trocador Na^+/H^+ em túbulo proximal, aumentando o transporte transepitelial de Na^+ ; estimulando a contração de células mesangiais e da musculatura lisa das arteríolas eferentes e diminuindo o fluxo sanguíneo renal e a filtração glomerular (96, 159, 49). Recentemente, Wang e Giedisch (148) constataram, *in vitro*, que AII também estimula o transporte Na^+/H^+ em túbulo contornado distal e o transporte de Na^+ amilorida-sensível na porção inicial do túbulo coletor em néfron cortical.

Evidências indicam que o sistema renina-angiotensina tem importante papel nas complicações renais, observadas tanto em paciente diabéticos tipo 1 (7) quanto em modelos experimentais de animais diabéticos (120). Todavia, outros estudos têm mostrado que distúrbios do sistema renina-angiotensina não têm sido efetivamente relatados na diabetes experimental. Esta discordância sobre as possíveis modificações do SRA por vários estudos prévios pode estar relacionada aos níveis glicêmicos, ao estado volêmico, à duração da diabetes e à espécie ou à linhagem estudadas (33, 3).

Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, entre a 6ª e a 8ª semanas de doença, observaram-se uma concentração de renina plasmática e a atividade sérica de ECA normais (6). Porém, nesses animais foi verificada uma elevação da atividade do SRA renal, caracterizada pela: 1) elevação dos níveis de renina renal e de angiotensinogênio associada ao aumento da expressão de RNAm, 2) redistribuição da expressão da ECA nos diferentes segmentos do

néfron, com diminuição no túbulo proximal e um acréscimo nos glomérulos e vasos.

Estudo de Brown *et al.* (24) em ratos diabéticos induzidos por estreptozocina mostrou um decréscimo na densidade de receptores AT1 renal de 49% na 4ª semana para 36% na 12ª semana pós-indução da diabetes, que foi associado à diminuição de angiotensinogênio plasmático somente na 4ª semana e à elevação sérica da renina na 12ª semana pós-indução da doença.

A angiotensina II contribui para a gênese da nefropatia diabética por induzir a vasoconstrição predominantemente de arteríola eferente e, conseqüentemente, promove uma elevação da pressão de ultrafiltração. Além desses efeitos, participa da hipertrofia glomerular, proliferação mesangial e expansão da matriz extracelular, mecanismos estes que contribuem para a disfunção progressiva do néfron (19).

Estudo prévio comprova a participação da AII no controle da pressão de ultrafiltração glomerular através da modulação do tônus vascular glomerular. AII gerada no rim liga-se a receptores AT1 glomerulares causando constrição das células mesangiais e das arteríolas aferentes e eferentes, alterando desse modo o coeficiente de ultrafiltração glomerular. Estudo funcional, morfológico e molecular de Anderson *et al.* (6), em ratos diabéticos experimentais tratados, mostrou que a administração aguda e crônica de antagonista de receptores AT1 diminui a resistência arteriolar eferente e, conseqüentemente, diminui a pressão hidráulica glomerular e aumenta o coeficiente de ultrafiltração glomerular, sem alterar a taxa de filtração glomerular. O aumento da expressão de RNAm para renina e angiotensinogênio no tecido renal observado neste estudo sugere elevação da síntese de AII intra-renal que atuaria localmente, influenciando a hemodinâmica glomerular.

Há evidências, utilizando-se bloqueadores farmacológicos do SRA, que AII está envolvida na proteinúria observada na nefropatia diabética. Andersen *et al.* (5) estudando pacientes diabéticos tipo 1 e nefropatas tratados com losartan e enalapril, observaram uma redução significativa de albuminúria e da excreção urinária de IgG. Remmuzi *et al.* (120) demonstraram a participação de AII na

definição da permosselatividade a moléculas pela membrana basal glomerular em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Embora os mecanismos que conduzem à expansão da matriz na nefropatia diabética não sejam claros, evidências mostram que citocinas, fatores de crescimento, e hormônios vasoativos têm um papel revelante (35). AII estimula a expansão da matriz extracelular através da ativação do fator crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) (76), com importante papel na regulação do *turnover* da matriz extracelular. TGF $\beta 1$ estimula a síntese de proteínas da matriz (fibronectina, colágeno e proteoglicanos) e simultaneamente inibe a degradação desta aumentando a atividade de inibidores de proteases e estimulando a síntese de receptores de proteínas de armamento da matriz, tais como integrins (20).

1.5 FUNÇÃO TUBULAR NO *DIABETES MELLITUS*

Alterações na reabsorção tubular de sódio têm sido confirmadas na *diabetes mellitus* clínica e experimental. Estudos prévios mostram uma elevada reabsorção de Na^+ em túbulo proximal decorrente da elevação do co-transporte Na^+ -glicose associada à elevação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (89) e da elevação da atividade do contratransporte Na^+/H^+ (114) na membrana luminal de borda de escova.

Estudo de micropunção renal de Pollock *et al.* (114) utilizando um inibidor de co-transporte Na^+ /glicose (phlorizin) e manitol (diurético osmótico), em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, sugere que outros mecanismos independentes do co-transporte de Na^+ /glicose e da diurese osmótica estão envolvidos na hiperfiltração e na elevada reabsorção de sódio em túbulo proximal e em alça, ocorridas durante a fase inicial da diabetes. Hannedouche *et al.* (65) mostraram que ocorre um decréscimo da reabsorção tubular proximal de sódio em pacientes tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina (captopril), sugerindo algum envolvimento da AII na reabsorção tubular proximal da *diabetes mellitus* tipo 1.

Experimentos prévios demonstraram que a administração de furosemida, sem reposição volêmica desta perda urinária, causa depleção do volume extracelular em animais normais, confirmada pela queda da pressão intra-atrial direita (37). Esta depleção volêmica estimula um mecanismo compensatório antidiurético e antinatriurético através da redução da taxa de filtração glomerular e estimulação da reabsorção tubular de água e sódio (32). Furosemida estimula compensatoriamente a secreção de renina e AII (56), que teoricamente promoveriam vasoconstrição renal e a reabsorção tubular de sódio. Todavia, como descrito anteriormente, distúrbios do sistema renina-angiotensina têm sido descritos no *diabetes mellitus* e são ainda pouco conhecidos.

1.6 ATIVIDADE NEURAL DO RIM

A inervação renal apresenta uma atividade funcional sobre o controle fino de vários aspectos funcionais do rim. Tem sido demonstrada uma extensa e predominante rede de eferente inervação adrenérgica em arteríolas aferentes e eferentes glomerulares, túbulos proximais e distais, segmentos ascendentes da alça de Henle e aparelho justaglomerular (39).

Esta atividade eferente simpática renal está comprometida com a regulação de sódio através de: 1) modificações hemodinâmicas renais, 2) mudanças na secreção justaglomerular de renina com aumento da formação de angiotensina II e 3) modificações na reabsorção tubular de sódio através de um efeito direto da inervação sobre as células tubulares. Indiretamente, a AII formada a partir da estimulação renal pode afetar o fluxo sanguíneo renal por sua ação constritora sobre vasos e as células mesangiais, além de influenciar diretamente a manipulação tubular de sódio. O aumento na atividade eferente simpática renal aumenta a reabsorção tubular de Na^+ , enquanto uma diminuição nesta atividade simpática neural atenua esta reabsorção causando natriurese (84). Estas modificações na reabsorção tubular de íons ocorrem em diferentes porções do néfron, proporcionalmente à densidade da inervação do segmento, e são mediadas por receptores alfa-1 encontrados na membrana basolateral das células tubulares (8). A estimulação de receptores alfa-1 adrenérgico promove um aumento de cálcio intracelular com subsequente ativação de uma proteína calmodulina-dependente, a calnineurin, capaz de desfosforilar $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ para a sua forma ativa, a desfo- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, cujo efeito final é um aumento transepitelial no transporte de sódio.

O aumento da atividade simpática renal eleva a secreção de renina mediada por receptores beta-1 adrenérgicos localizados em células granulares justaglomerulares (84).

O reflexo reno-renal é um dos mecanismos mais importantes no controle da diurese e da natriurese. Esse reflexo é definido como uma resposta mediada por

neurônios periféricos e centrais que ocorre em um rim em resposta a intervenções no mesmo rim (ipsilateral) ou no rim contralateral. Duas classes de receptores sensoriais renais têm sido identificadas, os mecanorreceptores renais (MR) que respondem ao aumento de pressão intra-renal (elevação da pressão pélvico-uretral ou pressão venosa) (36, 85) e os quimiorreceptores renais (CR) que respondem à isquemia (R1) e/ou à perfusão pélvica renal com soluções hipertônicas de NaCl ou concentrações fisiológicas de KCl (R2) (118, 86). Estudos anteriores em ratos Sprague-Dawley demonstraram que a estimulação de MR pelo aumento de pressão uretral ou da pressão venosa renal, bem como a estimulação de CR pela perfusão pélvica renal com NaCl 0,9%, resulta em um aumento da atividade neural aferente renal (ARNA) seguido por uma diminuição da atividade neural eferente (ERNA) contralateral (86, 88), resultando em um acréscimo na excreção renal contralateral de íons e água. Esta resposta diurética e natriurética é abolida pela denervação renal ipsi ou contralateral. Desse modo, a estimulação de MR ou CR renais apresenta uma resposta reflexa inibitória contralateral sobre a atividade simpática em ratos normotensos.

Estudos anteriores demonstraram em animais acordados ou anestesiados, uma alteração na atividade simpática eferente renal durante algumas manobras que causam mudanças na pressão atrial produzidas por manobras que expandem ou depletem a volêmia (37), pela imersão em água até o pescoço ou pelo aumento da pressão intra-atrial através de um balão inflável (100, 101). Esta relação entre mecanorreceptores atriais e o rim é mediada pela inervação vagal e regula o tônus neural do rim. As modificações da pressão intratrial e a atividade simpática renal apresentam um caráter linear e bidirecional, isto é, o aumento da pressão atrial diminui a atividade simpática renal, enquanto a diminuição da pressão atrial eleva esta atividade. No rato, esta relação é de aproximadamente 20%, ou seja, a cada 1 mmHg de modificação da pressão atrial ocorre uma alteração inversa de 20% na atividade neural do rim. Estes estudos demonstram uma íntima relação entre receptores de volume central e o rim, caracterizando-se assim um reflexo cárdio-renal, importante no ajustamento da atividade neural renal ao volume circulante.

Experimentos em cães, após o aumento da pressão atrial através de balão inflável ou imersão em água até o pescoço, mostram um decréscimo na sustentação da atividade simpática renal, associado à natriurese, sem qualquer mudança na filtração glomerular (100, 101). A denervação renal ou cardíaca previnem completamente estas mudanças na excreção urinária de sódio, comprovando esta mediação neural para o controle homeostático de volume.

Confirmando tais achados, tem sido observado que a denervação renal bilateral atenua a resposta diurética durante a expansão de volume, sendo esta resposta acentuada pela restrição dietética de sódio (37;84). Estes resultados indicam que a inibição da atividade nervosa durante a expansão de volume representa um importante mecanismo de controle para a supressão da reabsorção tubular de sódio.

Experimentos realizados em ratos normais e vigis mostraram que a depleção volêmica induzida por furosemida causa um decréscimo da pressão atrial direita associada à elevação da atividade nervosa renal e à diminuição da natriurese, sem alteração da taxa de filtração glomerular (37).

Aparentemente, alterações na atividade simpática renal são importantes na regulação a longo prazo do balanço de sódio. Adaptação a dietas hipossódicas promove um aumento na reabsorção tubular deste cátion. Em modelos experimentais submetidos à dieta hipossódica, e nos quais uma insuficiência autonômica foi produzida pelo tratamento com guanetidina, foram incapazes de promover esta antinatriurese (63). Pacientes com insuficiência autonômica idiopática alimentados com dieta contendo 17 mEq/dia não conseguiram diminuir a excreção de sódio abaixo de 60 mEq/dia (152). Estes estudos apóiam a observação de que uma inervação renal intacta parece ser importante para a manutenção do balanço hidroeletrólítico em diferentes situações de aporte de sódio.

Embora sejam descritas manifestações clínicas compatíveis com uma significativa desautonomia em pacientes portadores de neuropatia diabética, a repercussão desta sobre o controle hemodinâmico e o balanço hidrossalino não tem sido adequadamente estudada. Muito menos tem sido definido o comportamento do reflexo reno-renal em modelos de *diabetes mellitus* tipo 1 (insulino-dependente). É

importante avaliar se estes mecanismos compensatórios estão comprometidos durante o desenvolvimento do *diabetes mellitus* experimental e após as modificações agudas da volemia, no caso do presente estudo após a administração aguda ou crônica de furosemida.

2. OBJETIVOS

- Estudar o efeito da administração aguda e crônica de furosemida sobre a pressão arterial e a manipulação renal de sódio em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina.
- Avaliar o efeito do bloqueio de receptor AT1 da angiotensina II sobre a pressão arterial, a função renal e o manuseio tubular de sódio em animais-controle e diabéticos induzidos por estreptozotocina, durante a administração aguda e crônica de furosemida.
- Avaliar o efeito da denervação renal bilateral sobre a pressão arterial, a função renal e o manuseio tubular de sódio em animais-controle e diabéticos induzidos por estreptozotocina, durante a administração aguda e crônica de furosemida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos experimentais

3.1.1 Animais

Os estudos foram realizados em ratos Wistar Hannover, pesando 250-300 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas - SP.

Os animais foram subdivididos em oito grupos experimentais: 1) controle (Co), 2) controle tratado com losartan (Los), 3) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina (DM), 4) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina e tratado com losartan (DM+Los), 5) controle submetido à cirurgia simulada de denervação renal bilateral (*sham*), 6) controle submetido à denervação renal bilateral (DNx), 7) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina e submetido à cirurgia simulada de denervação renal bilateral (DM+*sham*) e 8) *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina e submetido à denervação renal bilateral (DM+DNx).

Para avaliação dos estudos renais funcionais e da pressão arterial caudal, cada grupo experimental foi estudado e comparado com seu respectivo grupo-controle. Assim:

- Co *versus* Los: o grupo Co foi tratado com 1ml/100 g/dia de água-veículo e comparado ao grupo Los, ao qual foi administrado losartan 10 mg/kg/dia, por gavagem, às 17 horas.
- sham *versus* DNx: o grupo sham foi submetido à cirurgia simulada de denervação renal bilateral; enquanto o grupo DNx foi submetido à denervação renal bilateral.
- DM *versus* DM+Los: o grupo DM foi tratado com 1 ml/100g/dia de água-veículo e comparado ao grupo DM+Los, ao qual foi administrado losartan 10 mg/kg/dia, por gavagem, às 17 horas.

- DM+sham *versus* DM+DNx: o grupo DM+sham foi submetido à cirurgia simulada de denervação renal bilateral, enquanto o grupo DM+DNx foi submetido à denervação renal bilateral.

Os animais foram observados durante 21 dias, em condições adequadas de temperatura e luminosidade, em gaiolas coletivas com capacidade máxima para cinco animais, todos com livre acesso à ração (Nuvilab) e à água.

Foram seguidos os preceitos éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki durante a manipulação dos animais.

3.2 Procedimento experimental

Todos os grupos experimentais foram submetidos a um protocolo experimental único a cada sete dias, durante 21 dias. Ao final de cada período de sete dias, os animais tratados e seus respectivos controles foram submetidos a testes funcionais renais, utilizando-se como medidas funcionais os *clearances* de lítio e de creatinina. A pressão arterial caudal foi medida no 6º dia de cada período experimental e o peso corporal a cada 7 dias, imediatamente antes dos testes funcionais renais.

3.3 Bloqueio de receptor de angiotensina II (AT1)

Para verificar as consequências do bloqueio de receptores AT1 da angiotensina II sobre a manipulação tubular renal de sódio durante a administração crônica de furosemida na *diabetes mellitus* experimental, losartan (Biosintética, Brasil), antagonista não-peptídeo específico de receptor angiotensina

II (AT1) (71) foi administrado na dose de 10 mg/kg/dia, por gavagem, durante 21 dias.

No dia da realização dos *clearances*, losartan foi administrado juntamente com a primeira administração hídrica, conforme desenho experimental descrito abaixo.

3.4 Administração aguda e crônica de furosemida

Furosemida é um potente diurético, cuja ação bloqueia o co-transporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ no segmento espesso ascendente da alça de Henle, conduzindo a uma rápida natriurese e diurese (97).

Com o objetivo de induzir uma depleção volêmica aguda nos animais em experimentação, foi administrado furosemida (Ariston, Brasil) 15 mg/peso corporal total, por gavagem, aos 20 minutos prévios do início da coleta de urina, durante a realização do segundo *clearance* de lítio. (111).

A partir do 15º dia de estudo, após o segundo estudo funcional renal, todos os grupos experimentais passaram a receber furosemida 6 mg/peso corporal total, por gavagem, a cada 12 horas.

Nos dias dos estudos funcionais (segundo e terceiro *clearances*), furosemida 15 mg/peso corporal foi administrado durante a segunda sobrecarga hídrica, 20 minutos antes do início da coleta de urina

3.5 Denervação renal bilateral

Os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio 3% (Cristália, Brasil), na dosagem de 30-50 mg/kg, via intraperitoneal. Após uma tricotomia dorsal e assepsia com álcool iodado a 2%, foi realizada uma incisão cirúrgica de

aproximadamente 5 cm ao longo dos processos espinhosos da coluna lombar. Após a exposição da musculatura paravertebral, a pele foi retida e fixada por meio de fios de algodão 000 a um aro metálico posicionado sobre a região. Dessa maneira, obteve-se uma ampla exposição do campo cirúrgico retroperitoneal. Uma incisão cirúrgica ao longo da linha aponevrótica foi realizada, expondo-se o retroperitônio. O pedículo renal foi dissecado cuidadosamente, evitando-se manipulações desnecessárias, de modo a livrá-lo da gordura e do tecido conjuntivo envolvente com auxílio de um estereomicroscópio (Wild 560, Germany). A seguir, a artéria renal foi separada do feixe vâsculo nervoso e delicadamente desposada de sua adventícia. Imediatamente após, foi aplicada em torno de toda a circunferência arterial uma solução de fenol a 10% diluído em etanol a 95%. A síntese foi realizada por planos, incluindo a musculatura, o tecido celular subcutâneo e a pele. (17). Ao término da cirurgia, os animais receberam uma dose profilática de 340 mg/kg de rato, de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge, Brasil), via intramuscular. Após uma recuperação cirúrgica de seis dias, os animais foram utilizados nos experimentos.

3.6 Indução de *diabetes mellitus* experimental

Após jejum de ração de 16 horas, estreptozotocina (Calbiochem) 40 mg/kg de rato, homogeneizada em solução de citrato, com pH 4.5, foi administrada intravenosamente, pela veia peniana, estando os ratos anestesiados com éter. A *diabetes mellitus* experimental foi confirmada 72 horas após a indução, pelo teste quantitativo de glicose urinária (glicosúria $\geq 4+$), Rapignost Basis-Screen (Boehringer). Somente os animais que apresentaram glicosúria $\geq 4+$ e glicemia ≥ 300 mg/dl até o término dos experimentos foram utilizados ao final do estudo. A partir do sexto dia de indução de diabetes, os animais foram utilizados nos experimentos.

3.7 Estudo da função renal

O estudo da função renal foi estimado através do *clearance* de creatinina endógeno (filtração glomerular) e do *clearance* de lítio (manipulação tubular renal de sódio), conforme descrito a seguir.

3.7.1 Estudo da manipulação tubular renal de sódio pelo *clearance* de lítio

O *clearance* de lítio tem sido usado como um marcador da reabsorção hidrossalina pelo túbulo proximal (143). A técnica do *clearance* de lítio é um método indireto pelo qual o aporte distal de sódio e água do túbulo proximal à alça de Henle pode ser estimado. Para que o *clearance* de lítio seja um marcador adequado dos fluxos de água e sódio que deixam o túbulo proximal, algumas condições devem ser observadas: 1) o lítio ser livremente filtrado nos glomérulos; 2) o íon lítio deve ser reabsorvido isosmoticamente através do túbulo proximal, na mesma proporção que o íon sódio e a água; 3) o íon lítio não deve ser reabsorvido nem secretado nos segmentos distais; e 4) o lítio não deve alterar a função renal (82).

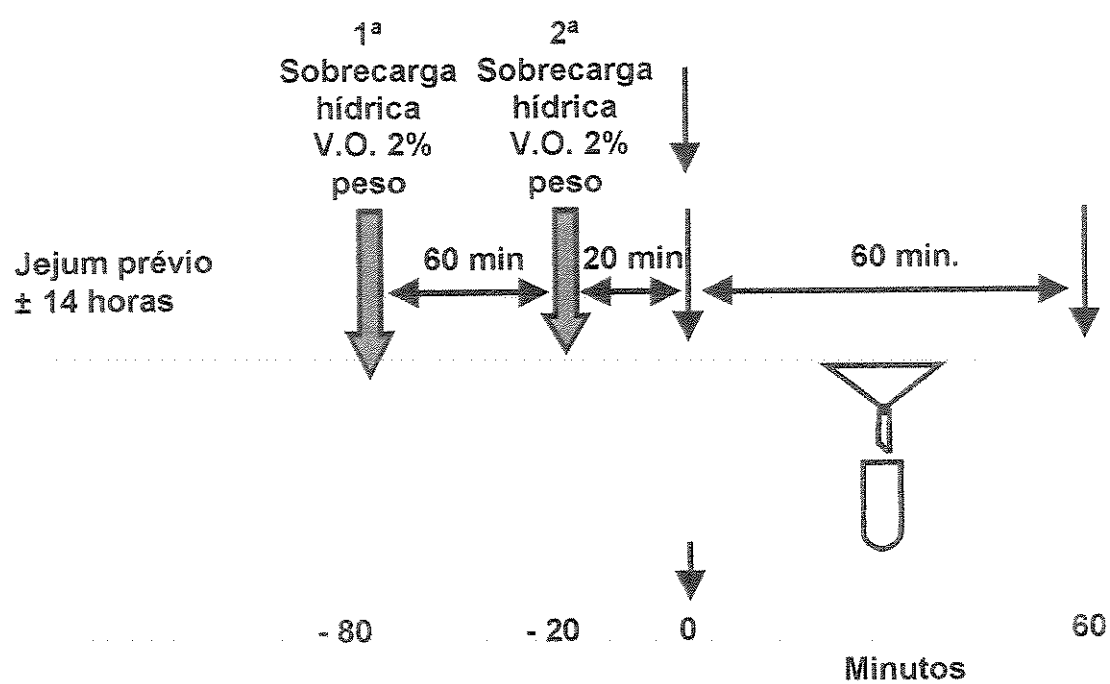
Em experimentos, nos quais os ratos foram submetidos à dieta hipossódica, uma proporção significativa da carga tubular distal de Li^+ pode ser absorvida, através de canais de sódio sensíveis à amilorida, no néfron distal (58, 126). Um mecanismo sugerido para absorção de Li^+ distal, em situação de depleção de sódio, é a hiperpolarização da membrana apical das regiões sensíveis à amilorida do duto coletor, devido ao influxo baixo de sódio facilitando a reabsorção de Li^+ (126).

Os animais foram submetidos ao estudo da função tubular pela técnica do *clearance* de lítio (59), em gaiolas metabólicas individuais (Movart, Ribeirão Preto, Brasil, ref. 306). Eles receberam LiCl 0.06 mEq/100 g de peso corporal (Merck), administrado por gavagem 14 horas antes do início do experimento. A partir desse instante, os animais foram mantidos em jejum para ração sólida por 14 horas,

ingerindo água *ad libitum*. Em estado vigil, os animais foram submetidos a um período experimental de 60 minutos. Com a finalidade de obter-se um fluxo urinário estável, foi administrado, por gavagem, uma volume hídrico correspondente a 2% do peso corporal aos 80 e 20 minutos antes do início experimental. A seguir, foi iniciada a coleta de urina durante 60 minutos, em tubos cônicos graduados a cada 0,1 ml. Finalizando a coleta da urina, amostras de sangue foram obtidas através dos vasos caudais dos animais (nos 1º e 2º CLi) ou por punção cardíaca após o 3º CLi, sob anestesia com éter etílico (Chemco). As alíquotas de soro e de urina foram congeladas (- 20°C) para dosagens posteriores.

3.7.2 Esquema experimental do *clearance*

Figura A



3.8 Massa corporal

Os animais foram pesados semanalmente, às 17 horas, em uma balança mecânica (J.B.Ind.e Com Balanças Ltda). O peso foi aferido imediatamente antes do início de qualquer tratamento ou procedimento cirúrgico e subseqüentemente nos 6º, 13º e 20º dias após o início do tratamento e ou procedimentos cirúrgicos. Nos animais diabéticos, o peso foi aferido também antes da indução de *diabetes mellitus*.

3.9 Medida da pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal (PAC) foi medida (figura B), em ratos vigis, pelo método de pletismografia de cauda (Programmed Electro-Sphygmomanometer, Pe-300, Narco Bio-Systems, USA), descrita previamente por Lovenberg (93). A medida da PAC foi realizada uma vez por semana, sendo utilizados os valores relativos à média de três medições consecutivas (figura B).

3.10 Análises bioquímicas

As concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, de potássio e de lítio foram determinadas pelo método de fotometria de chama (Micronal, modelo 262, São Paulo, Brasil).

A concentração plasmática e urinária de creatinina foram dosadas pela espectrofotometria (Micronal Espectrofotômetro Digital B34211, Brasil), utilizando o método colorimétrico do picrato alcalino (23).

A glicose plasmática foi determinada pelo método de reação enzimática, glicose oxidase (Lab teste).

3.11 Fórmulas e cálculos utilizados

3.11.1 Volume minuto urinário: V

O V foi coletado no período de uma hora e os resultados obtidos são expressos em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{ g}$.

3.11.2 Clearance de creatinina: Ccr

O Ccr foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Ccr} = \text{Ucr} \times \text{V} / \text{Pcr} \text{ (}\mu\text{l/ min/100 g de rato).}$$

Em que:

Ucr = concentração de creatinina na urina em mg/dl;

V = volume minuto urinário em $\mu\text{l}/\text{min}$;

Pcr = concentração de creatinina plasmática em mg/dl.

3.11.3 Clearance de lítio: CLi

O CLi foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{CLi} = \text{ULi} \times \text{V} / \text{PLi} \text{ (}\mu\text{l/min/100 g de rato).}$$

Em que :

ULi = concentração de lítio na urina em mEq/l;

V = volume minuto urinário em $\mu\text{l}/\text{min}$;

PLi = concentração plasmática de lítio em mEq/l.

3.11.4 Clearance de sódio: CNa

O CNa foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{CNa} = \text{UNa} \times \text{V/PNa} \text{ (}\mu\text{l/min/100 g de rato)}.$$

Em que:

UNa = concentração de sódio na urina em mEq/l;

V = volume minuto urinário em $\mu\text{l/min}$;

PNa = concentração plasmática de sódio em mEq/l.

3.11.5 Fração de excreção de sódio: FENa

A FENa foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{FENa} = (\text{UNa} \times \text{V/PNa} \times \text{Ccr}) \times 100.$$

Em que:

UNa = é a concentração de sódio urinária em mEq/l;

V = volume minuto urinário em $\mu\text{l/min}$;

PNa = concentração de sódio plasmática em mEq/l;

Ccr = clearance de creatinina;

100 = conversão em porcentagem.

3.11.6 Fração de excreção de potássio: FEK

A FEK foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{FEK} = (\text{UK} \times \text{V/PK} \times \text{Ccr}) \times 100.$$

Em que:

UK = é a concentração urinária de potássio em mEq/l;

V = volume minuto urinário em $\mu\text{l}/\text{mi}$;

PK = concentração plasmática de potássio em mEq/l ;

Ccr = *clearance* de creatinina;

100 = conversão em porcentagem.

3.11.7 Fração de excreção proximal de sódio: FEPNa

A FEPNa foi calculada pela fórmula:

$$\text{FEPNa} = (\text{CLi}/\text{Ccr}) \times 100.$$

Em que:

CLi = *clearance* de lítio em $\mu\text{l}/\text{min}$;

Ccr = *clearance* de creatinina em $\mu\text{l}/\text{min}$;

100 = conversão a porcentagem.

3.11.8 Fração de excreção pós-proximal de sódio: FEPPNa

A FEPPNa foi calculada pela fórmula:

$$\text{FEPPNa} = (\text{CNa}/\text{CLi}) \times 100.$$

Em que:

CNa = *clearance* de sódio em $\mu\text{l}/\text{min}$;

CLi = *clearance* de lítio em $\mu\text{l}/\text{min}$;

100 = conversão a porcentagem.

3.12 Análise estatística

A análise de variância *one-way* (ANOVA) foi realizada para determinar as diferenças de dados entre os grupos. O teste t-student para medidas não pareadas foi aplicado para determinar as diferenças em cada grupo. O nível de significância foi estimado $p < 0,05$. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ EPM.

Pressão arterial: método indireto

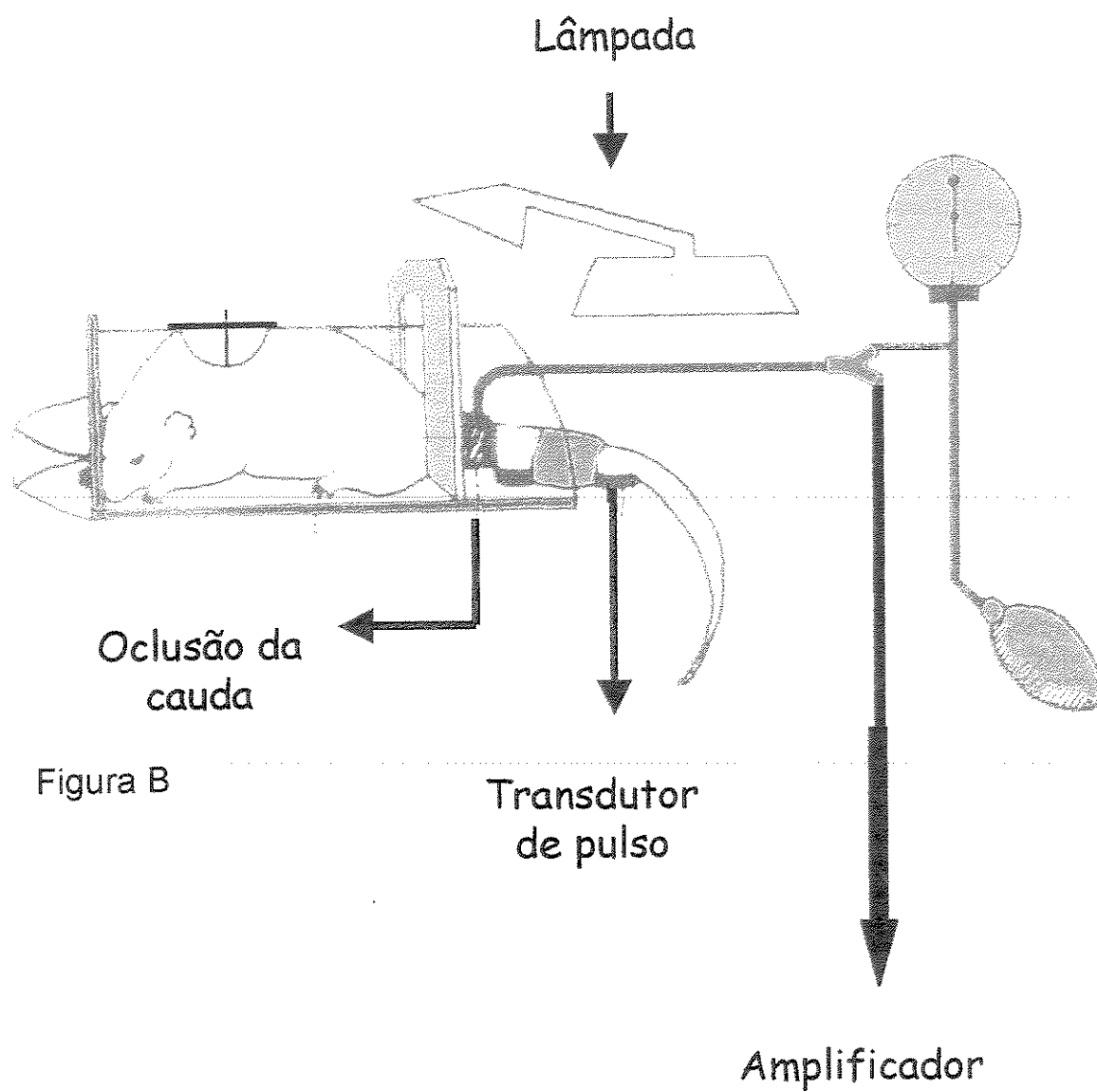


Figura B

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do bloqueio de receptores AT1 da angiotensina sobre a excreção renal de sódio e a pressão arterial em ratos tratados aguda e cronicamente com furosemida

4.1.1 Animais-controle

A tabela e a figura 1 mostraram os resultados obtidos para a pressão arterial caudal (PAC) nos grupos-controle e losartan, durante o período experimental de 21 dias. Observa-se uma queda significativa da pressão arterial nos animais tratados com losartan após sete dias de tratamento que persistiu até o 20º dia. Por outro lado, o grupo-controle apresentou uma elevação significativa da PAC após o tratamento crônico com furosemida ($p = 0,024$), em relação à sua PAC basal (0 dia).

A massa corporal dos animais dos grupos estudados foi similar durante todo o período experimental, como demonstrado na figura e tabela 2.

Durante o teste funcional renal, o volume urinário observado para os grupos Co e Los foi semelhante após sete dias de tratamento com o losartan, mesmo após a administração crônica de furosemida até o 21º dia. Verificou-se um aumento significativo do volume urinário, em ambos os grupos, após a administração aguda de furosemida no 14º dia. Interessantemente, esta elevação do volume urinário induzida por furosemida foi significativamente menor no grupo Los em relação ao grupo Co ($p = 0,046$). Após o tratamento crônico de furosemida, a diurese induzida pela administração aguda de furosemida apresentou uma menor elevação estatisticamente significativa nos animais-controle quando comparados aos valores médios obtidos nos estudos realizados nos 7º e 14º dias de experimento (figura e tabela 3).

A taxa de filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina (Ccr), foi semelhante nos grupos Co e Los durante todo o período experimental. Ambos

os grupos apresentaram um decréscimo estatisticamente significativo do Ccr com a administração aguda de furosemida no 14º dia, retornando a valores médios próximos aos basais (7º dia de tratamento) após a administração crônica de furosemida no estudo realizado no 21º dia (figura e tabela 4).

Como mostram a figura e a tabela 5, uma queda significativa da excreção urinária fracional de potássio (FEK^+) foi observada nos animais tratados durante sete dias com losartan. Os grupos Co e Los apresentaram uma elevação similar e significativa da FEK^+ após a administração aguda de furosemida. Verificou-se uma diminuição também significativa na FEK^+ após a administração crônica de furosemida naqueles animais tratados com losartan; todavia, essa diminuição não promoveu diferença importante quando comparados aos grupos estudados.

A excreção fracionária de sódio ($FENa^+$) decresceu significativamente nos animais Los ao 7º dia de tratamento com o bloqueador de AT1. A $FENa^+$ foi similar entre os grupos Co e Los durante a administração aguda e crônica de furosemida. Em ambos os grupos, verificou-se uma elevação significativa da $FENa^+$ induzida pela administração aguda, seguida por uma queda, também significativa, após o tratamento crônico com furosemida (figura e tabela 6).

A figura e tabela 7 apresentam o comportamento do *clearance* de sódio (CNa^+) do grupo Co comparado ao Los. Não houve variações significativas do CNa^+ durante o período experimental, entre os grupos estudados. Em ambos os grupos, verificou-se uma elevação significativa do CNa^+ induzida pela administração aguda de furosemida, quando comparado ao período basal (7º dia). Este estímulo natriurético foi seguido por uma queda importante desta excreção urinária de sódio após a administração tratamento crônica de furosemida.

Não foi verificada alteração significativa do *clearance* de lítio (CLi^+) entre os grupos Co e Los após sete dias de tratamento com o bloqueador de AT1 ou após a administração aguda ou crônica de furosemida. Por outro lado, losartan promoveu uma elevação estatisticamente significativa do CLi^+ , após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida, em relação ao seu período basal no 7º dia nos animais tratados com bloqueador de AT1. Os animais Co apresentaram uma elevação significativa do CLi^+ , após a

administração crônica de furosemida, em relação ao CLi^+ do período basal (figura e tabela 8).

A fração de excreção proximal de sódio (FEPNa^+) foi similar entre os grupos-controle e losartan durante todos os períodos experimentais. Ambos os grupos apresentaram uma elevação significativa da FEPNa^+ durante o tratamento agudo de furosemida, seguida de uma discreta diminuição da natriurese (porém não significativa) após administração crônica do diurético (figura e tabela 9).

O grupo Los apresentou uma diminuição significativa da excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa^+) no 7º dia pós-tratamento quando comparado ao grupo Co. Em ambos os grupos, a FEPPNa^+ elevou-se significativamente com administração aguda de furosemida, seguida por um decréscimo da natriurese distal durante a administração crônica (figura e tabela 10).

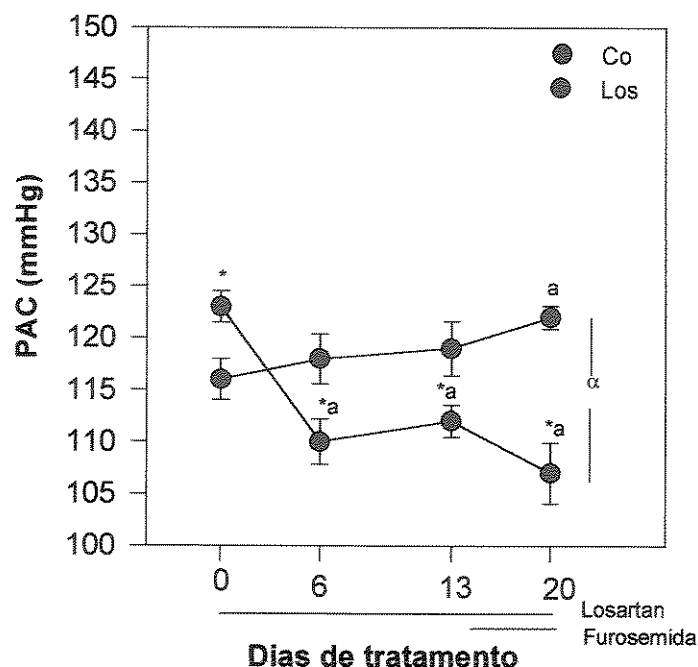


Figura 1: Efeito de losartan (10 mg/kg/dia) sobre a pressão arterial caudal (PAC) de ratos normais e após a administração crônica de furosemida 6 mg/peso corporal total de 12 em 12 horas (20º dia).

	0 dia	6º dia	13º dia	20º dia
Controle	116,2±1,96	118,4±2,4	118,7±2,65	122,1±1,13 a
n	09	09	09	08
Losartan	122,8±1,50 *	110,0±2,2 *a	111,3±1,55 *a	106,6±2,93 *a
n	10	10	09	11

Tabela 1: Valores obtidos para a pressão arterial caudal de ratos normais, nos 0, 6º e 13º dias de tratamento com losartan 10 mg/Kg/dia e após a administração crônica de furosemida.

Teste t-student - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística em cada grupo: a b c d: $p < 0,05$:

a: comparado ao 0 dia de tratamento;

b: comparado ao 6º dia de tratamento;

c: comparado ao 13º dia de tratamento;

Anova One-Way - estatística da curva de PAC entre os grupos: Co e Los - α : $p < 0,05$.

n: número da amostra.

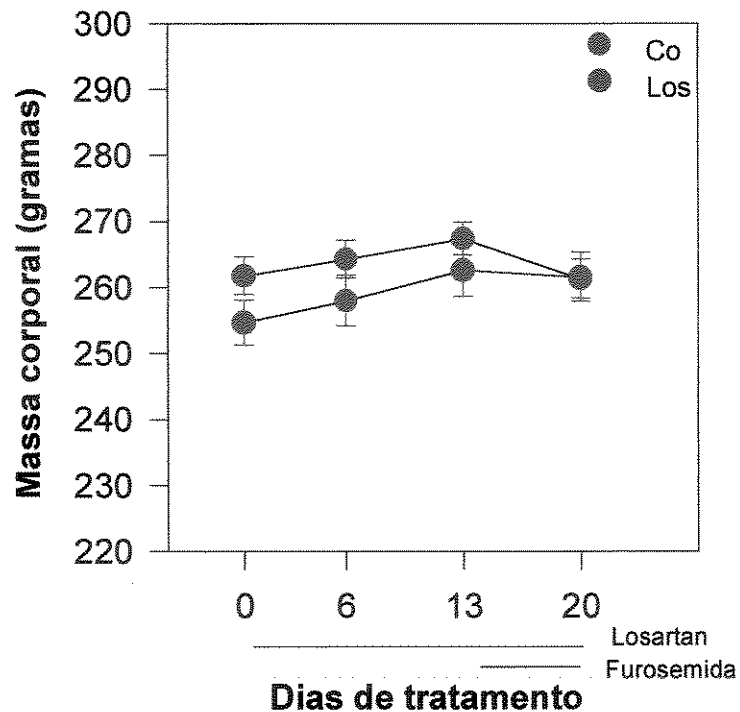


Figura 2: Massa corporal de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração crônica de furosemida 6 mg/peso corporal total de 12/12 horas (20° dia).

	0 dia	6° dia	13° dia	20° dia
Controle	254,7±3,41	258,6±3,82	262,6±3,9	262,6±3,73
n	12	13	12	12
Losartan	261,81±2,84	264,3±2,87	267,4±2,5	261,3±2,93
n	16	15	16	16

Tabela 2: Valores obtidos para a massa corporal de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração crônica de furosemida 6 mg/peso corporal de 12/12horas (20° dia)

Teste t-student - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística em cada grupo: a b c d: $p < 0,05$:

a: comparado ao 0 dia de tratamento;

b: comparado ao 6° dia de tratamento;

c: comparado ao 13° dia de tratamento;

d: comparado ao 20° dia de tratamento.

Anova One-Way - estatística da curva de peso corporal entre os grupos Co e Los - α : $p < 0,05$.

n: número da amostra.

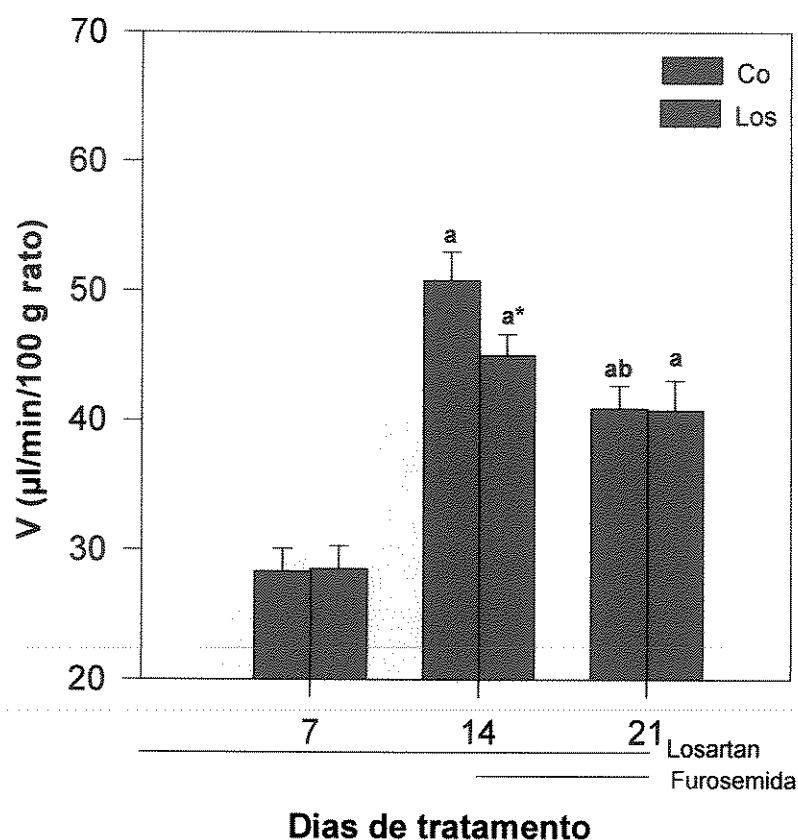


Figura 3: Variação do volume urinário de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	28,29±1,78	50,77±2,24 a	40,89±1,79 ab
n	08	10	09
Losartan	28,85±1,78	44,99±1,66 *a	40,77±2,29 a
n	11	13	08

Tabela 3: Valores obtidos para o volume urinário de ratos normais tratados com 10 mg/kg/dia e após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida.

Anova One-Way: estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Teste t-student: estatística em cada grupo: a,b: $p < 0,05$:

a: 14º ou 21º dias comparado ao 7º dia de tratamento;

b: 21º dia comparado ao 14º dia de tratamento.

Estatística válida para a avaliação do V, Ccr, CLi⁺, CNa⁺, FEK⁺, FENa⁺, FEPNa⁺ e FEPPNa⁺.

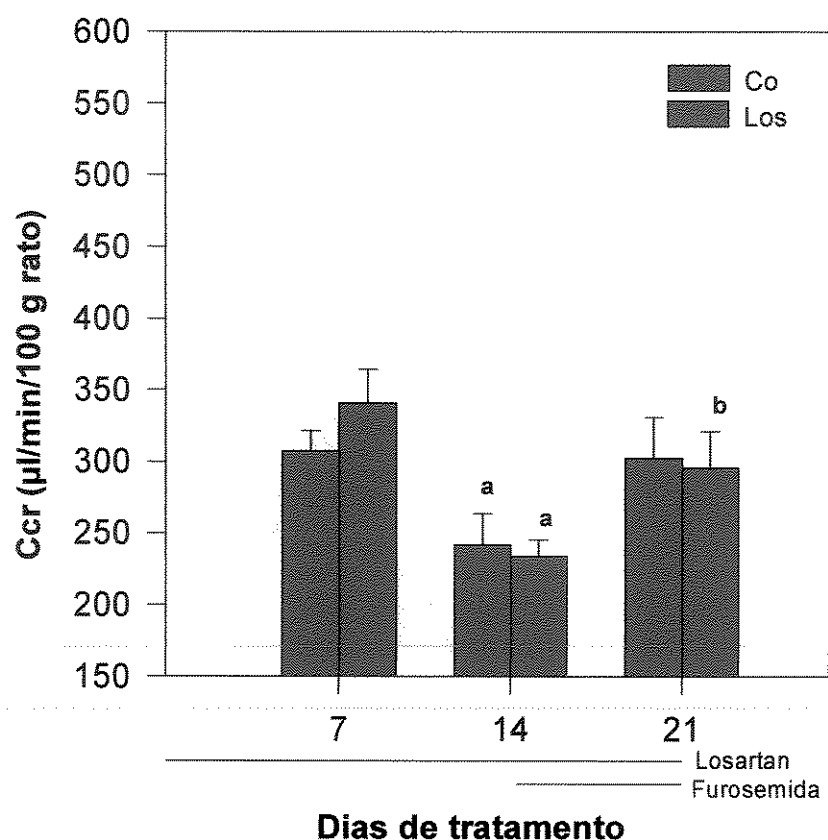
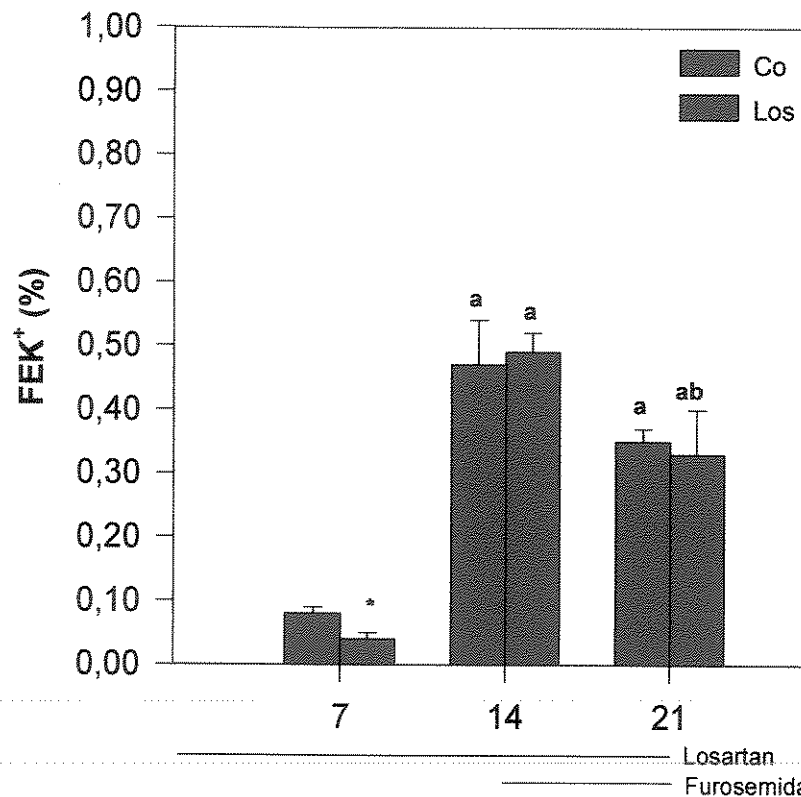


Figura 4: Efeito de losartan 10 mg/kg/dia sobre o *clearance* de creatinina (Ccr) de ratos normais e após a administração aguda e crônica de furosemida

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	307±14,64	241,84±22,05 a	302,52±28,77
n	08	10	09
Losartan	340,96±23,69	233,86±11,49 a	295,97±25,33 b
n	11	13	08

Tabela 4: Valores obtidos para o *clearance* de creatinina de ratos normais tratados com com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.



Dias de tratamento

Figura 5: Variação da fração de excreção urinária de potássio (FEK⁺) de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	0,08±0,01	0,47±0,07 a	0,35±0,02 a
n	08	10	09
Losartan	0,04±0,01 *	0,49±0,03 a	0,33±0,07 ab
n	11	13	08

Tabela 5: Valores obtidos para a fração de excreção urinária de potássio de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

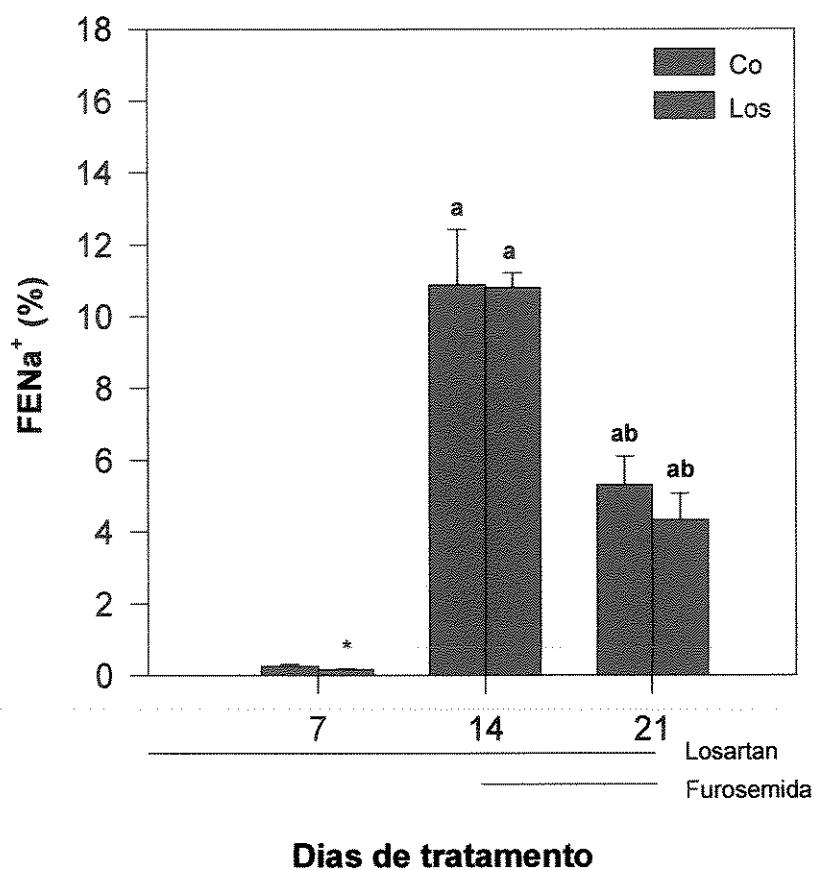


Figura 6: Variação da fração de excreção de sódio (FENa⁺) de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	0,26±0,04	10,88±1,54 a	5,30±0,80 ab
n	08	10	09
Losartan	0,17±0,02 *	10,80±0,41 a	4,32±0,75 ab
n	11	13	08

Tabela 6: Valores obtidos para a fração de excreção de sódio de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

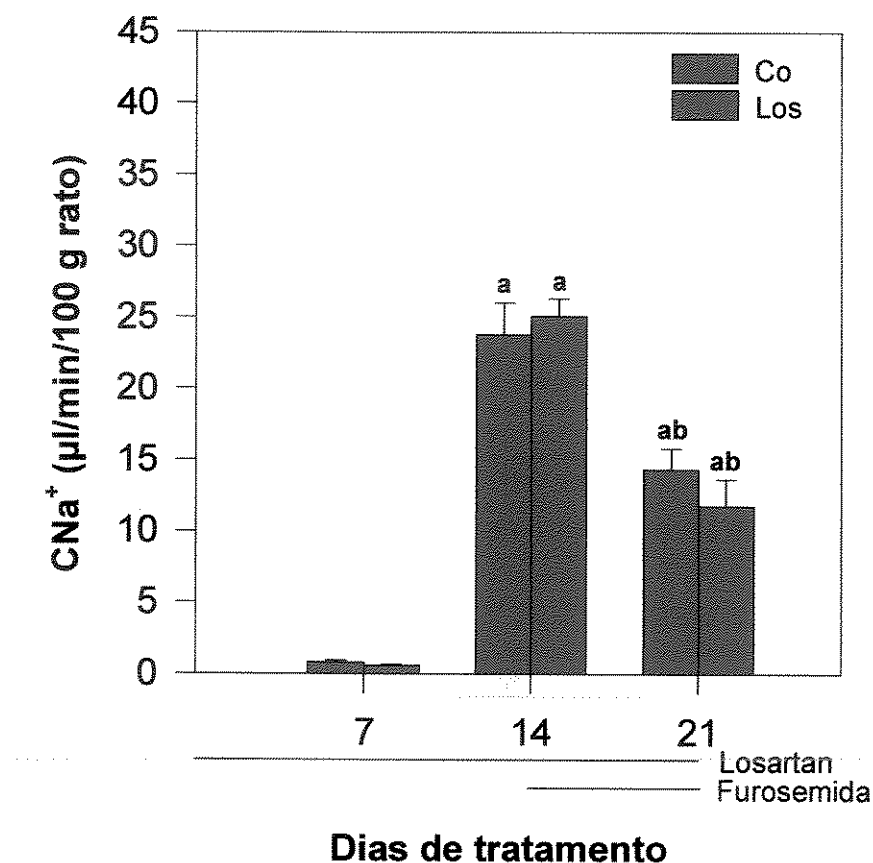


Figura 7: Clearance de sódio (CNa⁺) de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/min e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	0,82±0,13	23,80±2,25 a	14,33±1,46 ab
n	08	10	09
Losartan	0,58±0,08	25,08±1,28 a	11,76±1,90 ab
n	11	13	08

Tabela 7: Valores obtidos para o clearance de sódio de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

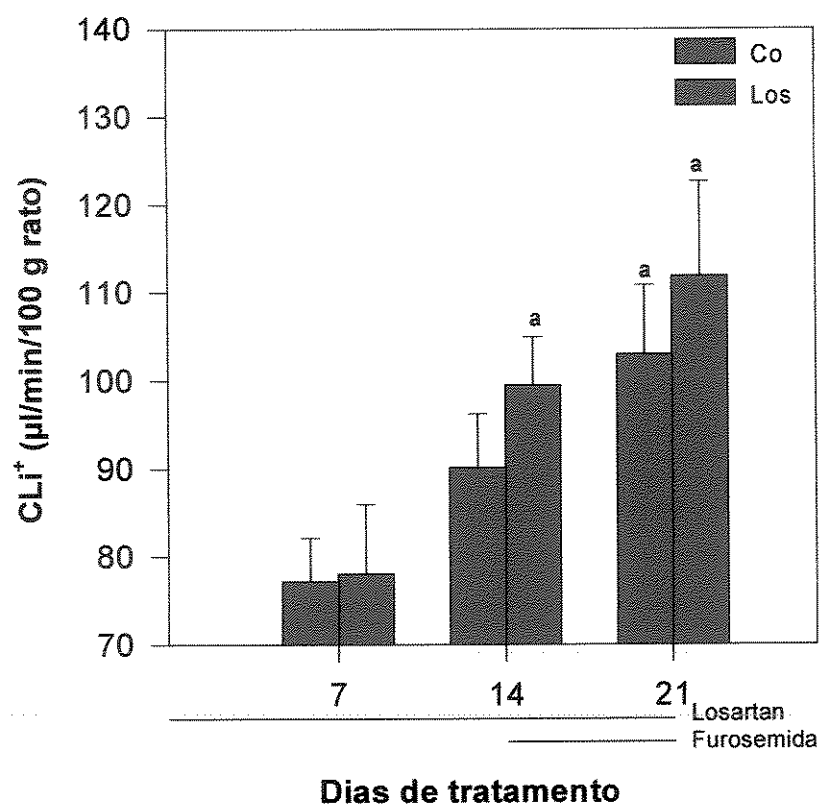


Figura 8: Clearance de lítio (CLi^+) de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	77,18±4,97	90,13±6,09	102,99±7,82 a
n	08	10	09
Losartan	78,07±4,97	99,47±5,50 a	111,83±10,78 a
n	11	13	08

Tabela 8: Valores obtidos para o clearance de lítio de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

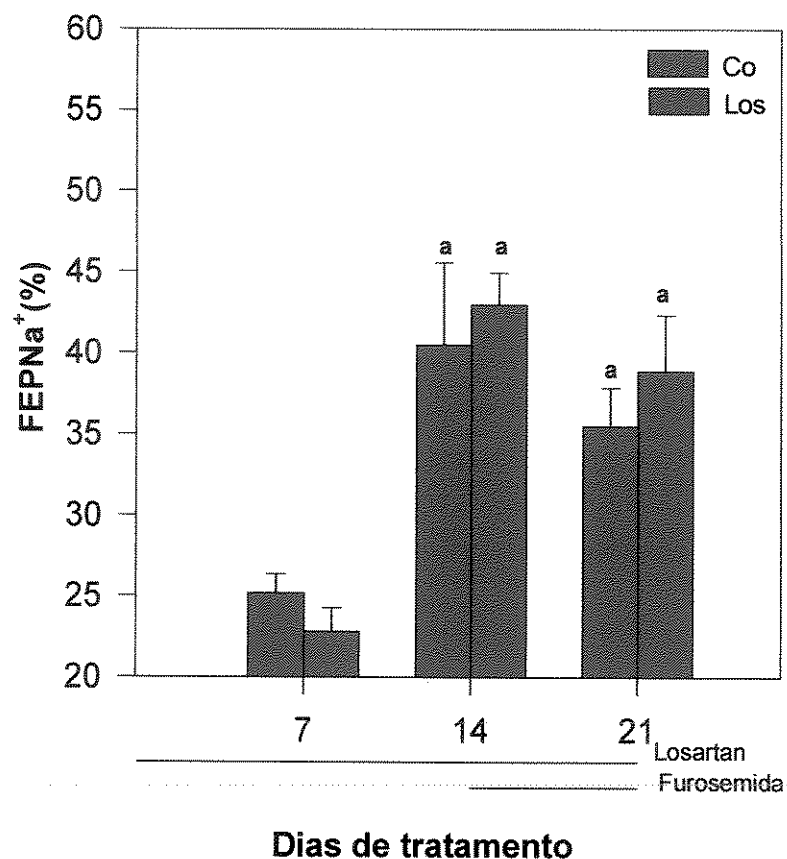


Figura 9: Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa⁺) de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	25,18±1,19	40,49±5,06 a	35,48±2,33 a
n	08	10	09
Losartan	22,80±1,46	42,97±1,97 a	38,84±3,47 a
n	11	13	08

Tabela 9: Valores obtidos para a fração de excreção proximal de sódio de ratos normais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

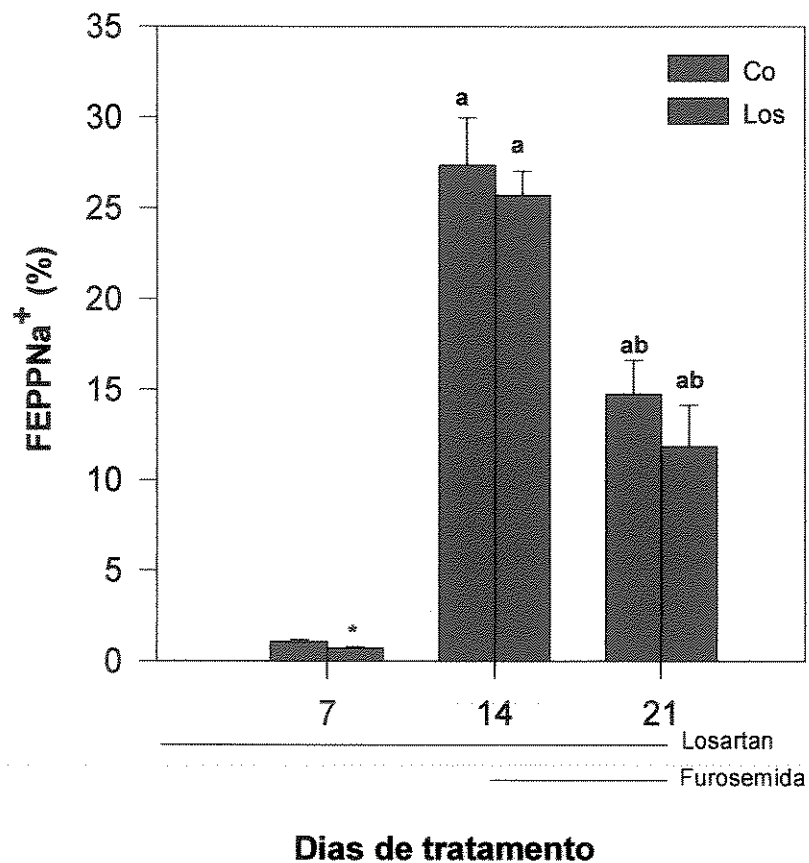


Figura 10: Variação de fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa⁺) de ratos tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Controle	1,05±0,14	27,36±2,23 a	14,74±1,87 ab
n	08	10	09
Losartan	0,72±0,08 *	25,71±1,35 a	12,66±2,24 ab
n	11	13	10

Tabela 10: Valores obtidos para a fração de excreção pós-proximal de sódio de ratos normais, tratados losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

tratados com losartan quando comparado ao seu valor basal (7º dia); porém, sem qualquer diferença em relação ao CLi^+ dos animais diabéticos não tratados. Por outro lado, a administração crônica de furosemida induziu a elevação do CLi^+ somente no grupo DM, quando comparado ao seu valor basal (7º dia).

A $FEPNa^+$ apresentou uma elevação significativa durante a administração aguda de furosemida tanto no grupo DM quanto no DM+Los. Esta elevação foi significativamente maior nos animais tratados com losartan. O tratamento crônico com o diurético nos animais diabéticos tratados com losartan promoveu um decréscimo significativo na $FEPNa^+$ (figura e tabela 20).

Ambos os grupos apresentaram uma elevação significativa da $FEPPNa^+$ após a administração aguda de furosemida, que foi significativamente inferior no grupo DM+Los (figura e tabela 21).

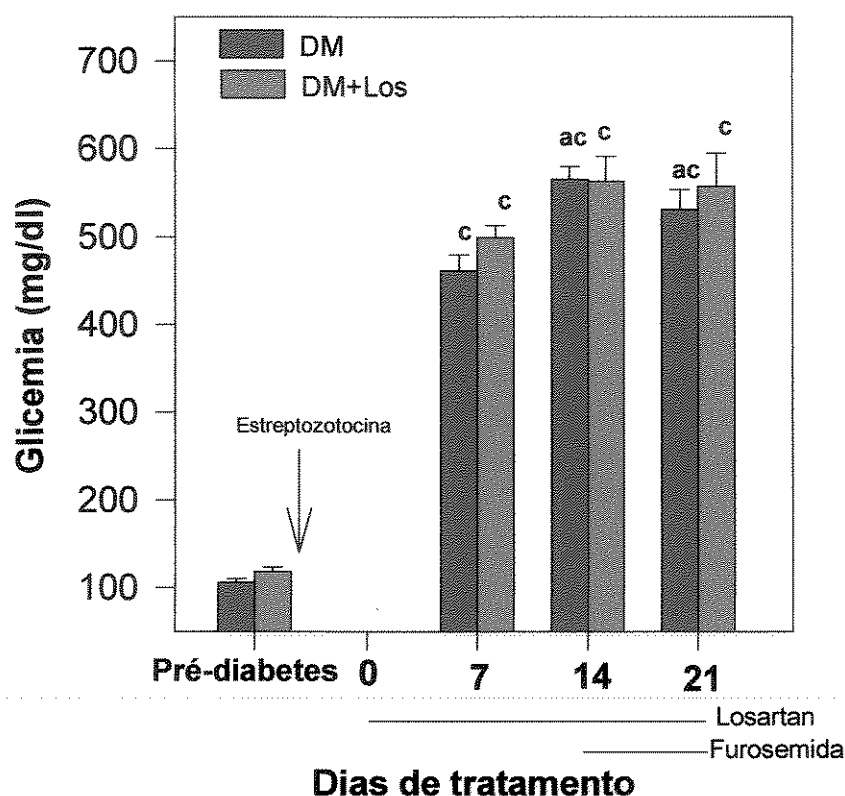


Figura 11: Glicemia de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida.

	Pré-diabetes	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes	106,3±4,12	461,1±18,41 c	564,6±14,35 ac	531,1±22,57 ac
n	10	10	10	10
Diabetes+losartan	117,7±4,89	498,6±13,71 c	562,9±28,68 c	556,8±37,93 c
n	13	12	13	13

Tabela 21: Valores obtidos para a glicemia de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica.

Teste t-student - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

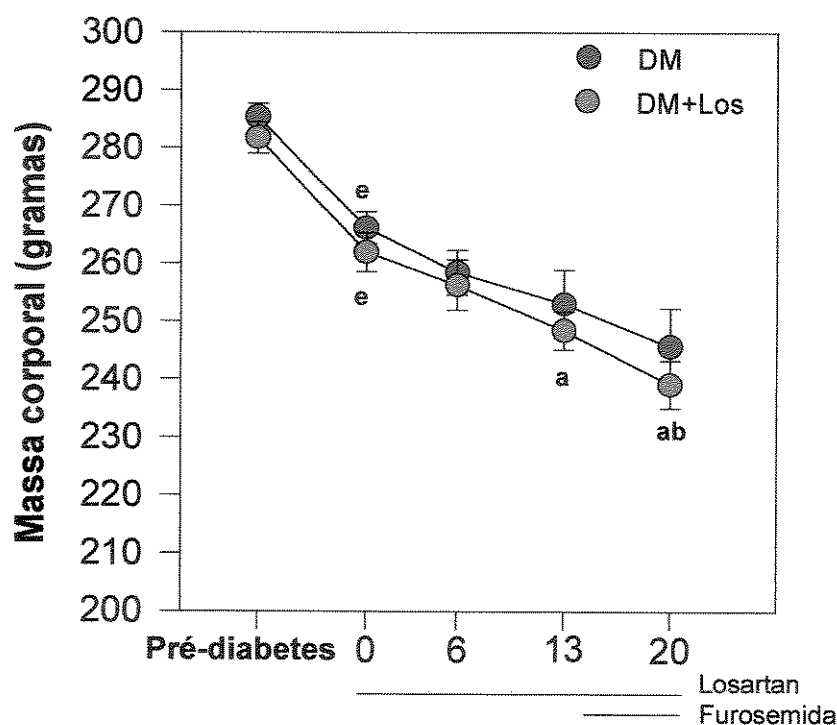
Teste t-student - estatística em cada grupo - a b c d: $p < 0,05$:

a: comparado ao 7º dia de tratamento;

b: comparado ao 14º dia de tratamento;

c: comparado ao dia pré-diabetes.

n: número da amostra



Dias de tratamento

Figura 12: Massa corporal de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração crônica de furosemida (20º dia).

	Pré-diabetes	0 dia	6º dia	13º dia	20º dia
Diabetes	285,3±2,32	266,2±2,79	258,5±3,83	253,1±5,87	245,7±6,62
n	11	11^e	10	11	11
Diabetes+ losartan	281,8±2,7	262,0±3,37	256,3±4,35	248,4±3,33^a	239,1±4,1^{ab}
n	13	13^e	13	13	13

Tabela 12: Valores obtidos para a massa corporal de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia, e após a administração crônica de furosemida.

Anova One- Way - estatística da curva de peso corporal entre os grupos - α : $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística em cada grupo: a b c d e: $p < 0,05$:

a: comparado ao 0 dia de tratamento;

b: comparado ao 6º dia de tratamento;

c: comparado ao 13º dia de tratamento;

d: comparado ao 20º dia de tratamento;

e: comparado ao dia pré-diabetes.

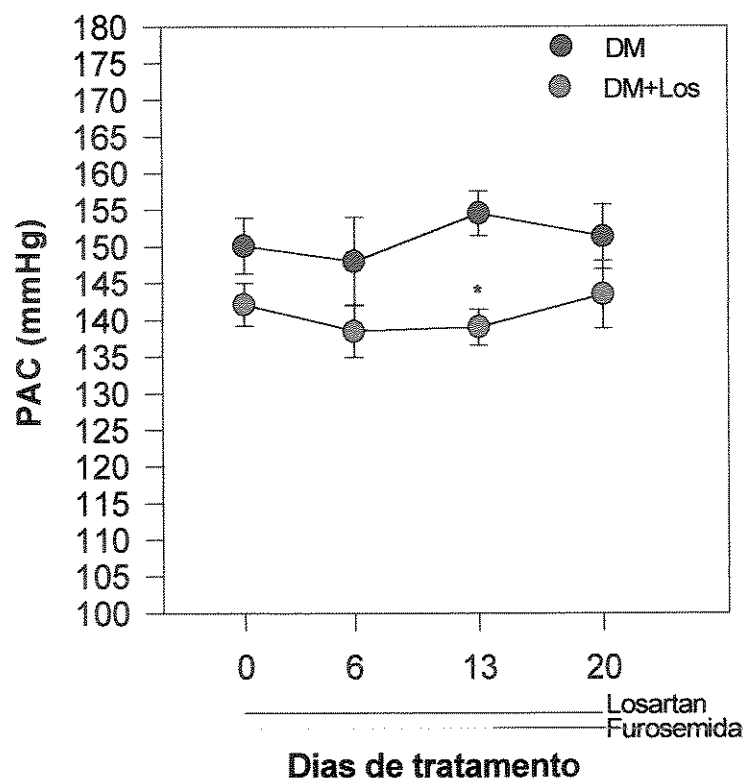


Tabela 13: Pressão arterial caudal (PAC) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia, e após a administração crônica de furosemida (20º dia).

	0º dia	6º dia	13º dia	20º dia
Diabetes	150,1±3,99	148,0±6,27	154,6±3,19	151,4±4,61
n	10	11	11	11
Diabetes + losartan	142,1±3,03	138,5±3,67	139,0±2,56 *	143,5±4,78
n	12	13	12	13

Tabela 13: Valores obtidos para a pressão arterial caudal de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração crônica de furosemida.

Test t-student- estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Test t-student- estatística em cada grupo - a, b, c, d: $p < 0,05$:

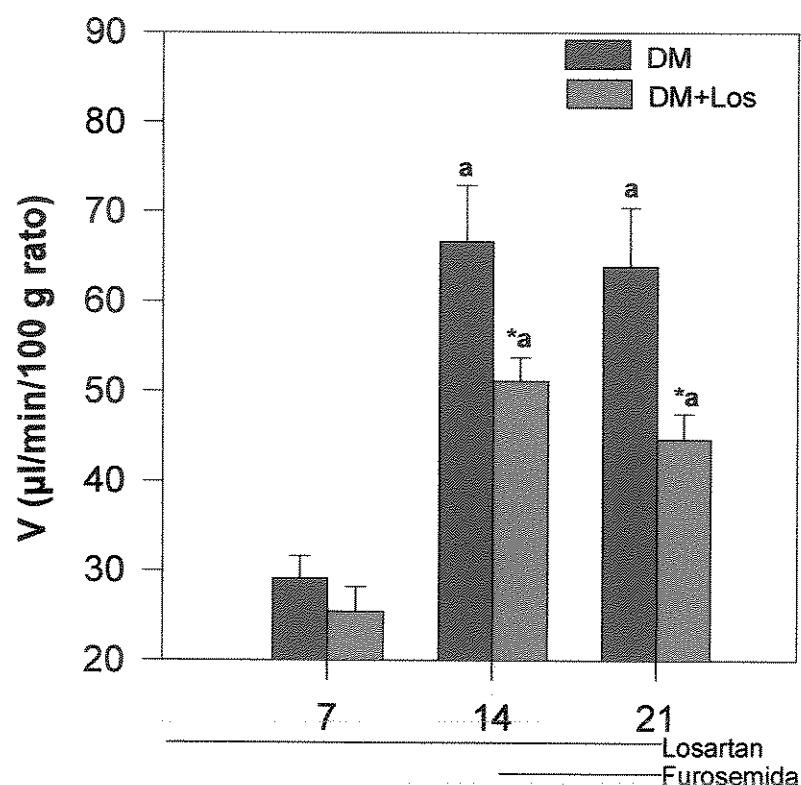
a: comparado ao 0 dia de tratamento;

b: comparado ao 6º dia de tratamento;

c: comparado ao 13º dia de tratamento;

d: comparado ao 20º dia de tratamento;

Anova One-Way: estatística da curva de PAC entre os grupos - ∞ : $p < 0,05$.



Dias de tratamento

Figura 14: Variação do volume urinário (V) de ratos diabéticos tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes n	29,18±2,74 08	66,67±6,26 a 08	63,90±6,58 a 06
Diabetes+losartan n	25,42±2,77 07	51,16±2,61 *a 10	44,68±2,82 *a 11

Tabela 14: Valores obtidos para o volume urinário de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após associação da administração aguda e crônica de furosemida.

Anova One-Way - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Test t Student - estatística em cada grupo: a, b: $p < 0,05$:

a: 14º ou 21º dias comparado ao 7º dia de tratamento;

b: 21º dia comparado ao 14º dia de tratamento.

Estatística válida para: V, Ccr, CLi⁺, CNa⁺, FEK⁺, FENa⁺, FEPNa⁺ e FEPPNa⁺.

n: número da amostra.

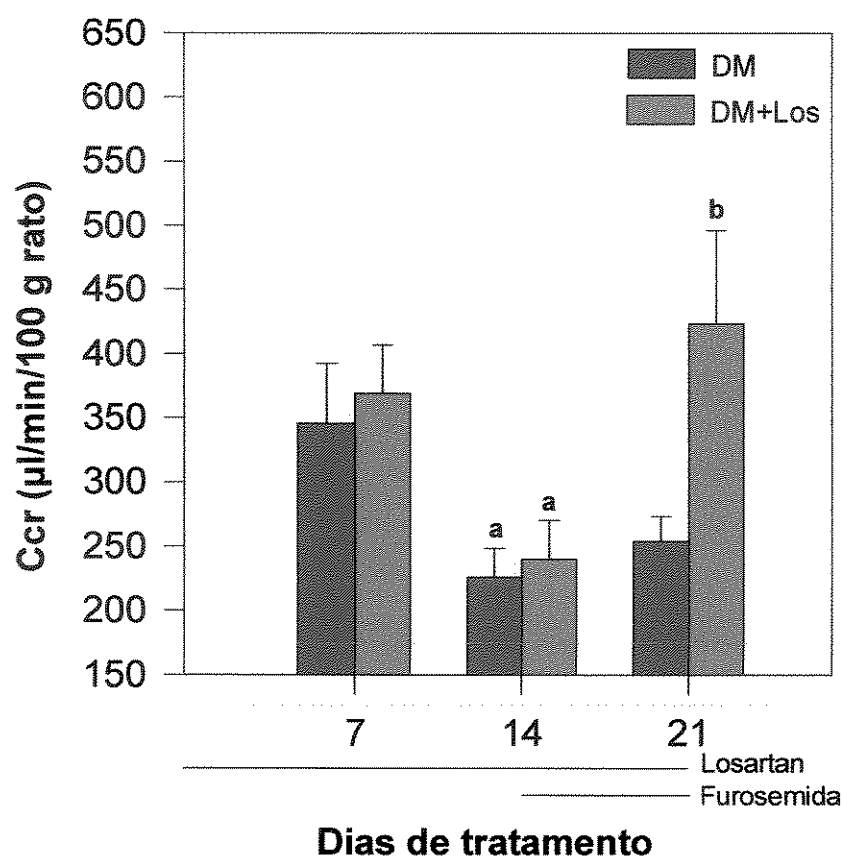


Figura 15: *Clearance* de creatinina (Ccr) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica e furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes n	345,31±47,31 08	226,28±22,35 a 08	254,26±19,16 06
Diabetes+losartan n	369,18±37,93 07	239,97±30,18 a 10	423,19±72,94 b 11

Tabela 15: Valores obtidos para o *clearance* de creatinina de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

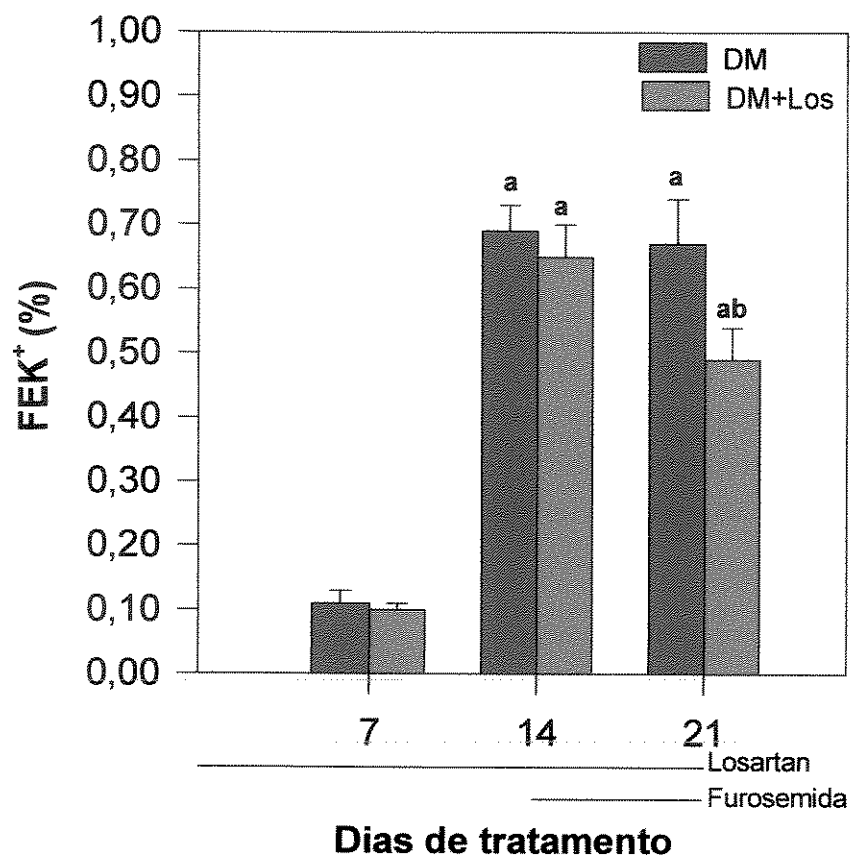


Figura 16: Fração de excreção urinária de potássio (FEK⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes n	0,11±0,02 08	0,69±0,04 a 08	0,67±0,07 a 09
Diabetes+losartan n	0,09±0,01 07	0,65±0,05 a 10	0,49±0,05 ab 08

Tabela 16: Valores obtidos para a fração de excreção urinária de potássio (FEK⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

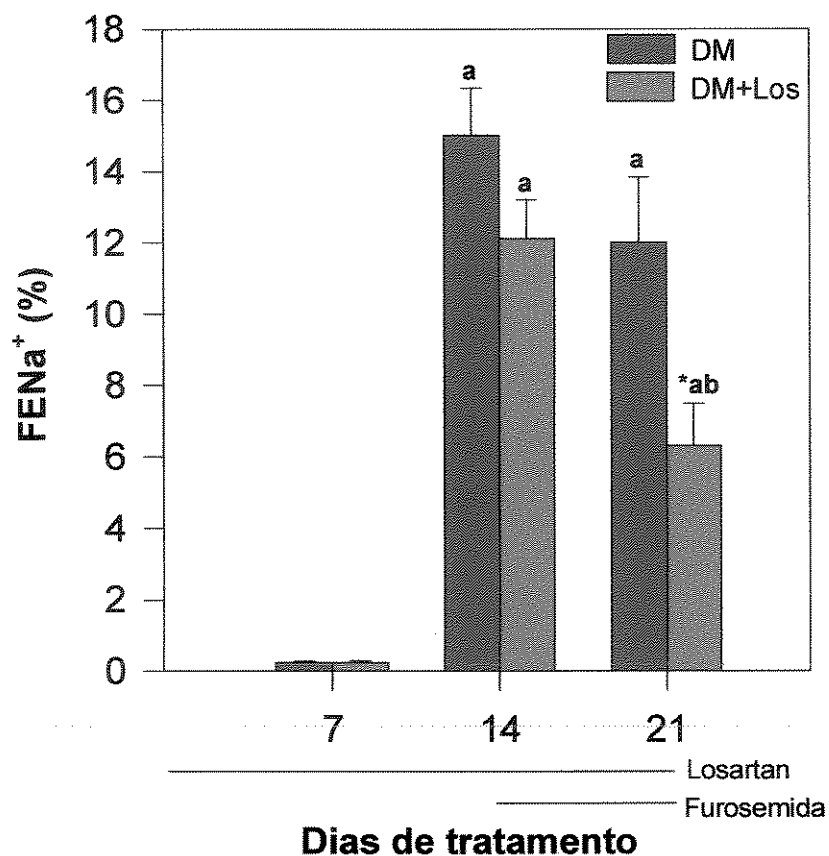


Figura 17: Variação da fração de excreção de sódio (FENa⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes	023±0,04	15,01±1,33 a	12,00±1,84 a
n	08	08	06
Diabetes+losartan	0,23±0,06	12,11±1,09 a	6,31±1,18 *ab
n	07	10	11

Tabela 17: Valores obtidos para a fração de excreção de sódio de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

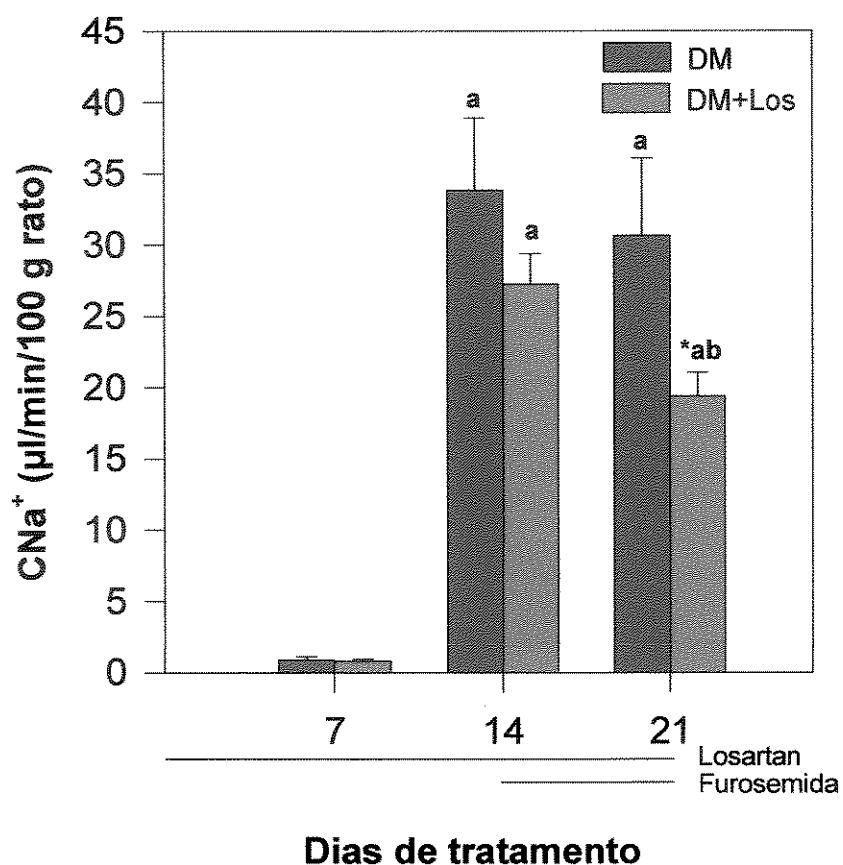


Figura 18: Variação do *clearance* de sódio (CNa⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes n	0,88±0,21 08	33,80±5,08 08	30,65±5,39 06
Diabetes+losartan n	0,77±0,15 07	27,22±2,17 ^a 10	19,39±1,66 ^{*ab} 11

Tabela 18: Valores obtidos para o *clearance* de sódio de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

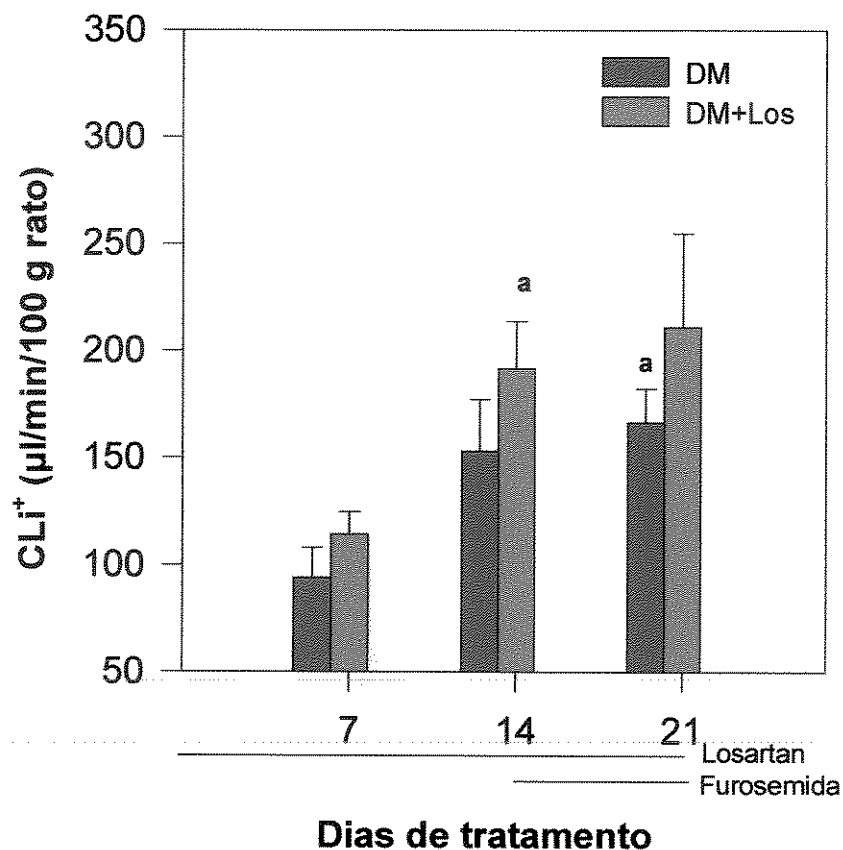


Figura 19: Clearance de lítio (CLi⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes	94,11±13,76	153,15±24,29	166,52±15,78 a
n	08	08	06
Diabetes+losartan	114,46±10,36	191,53±22,28 a	211,09±43,92
n	07	10	11

Tabela 19: Valores obtidos para o clearance de lítio de ratos diabéticos experimentais, tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

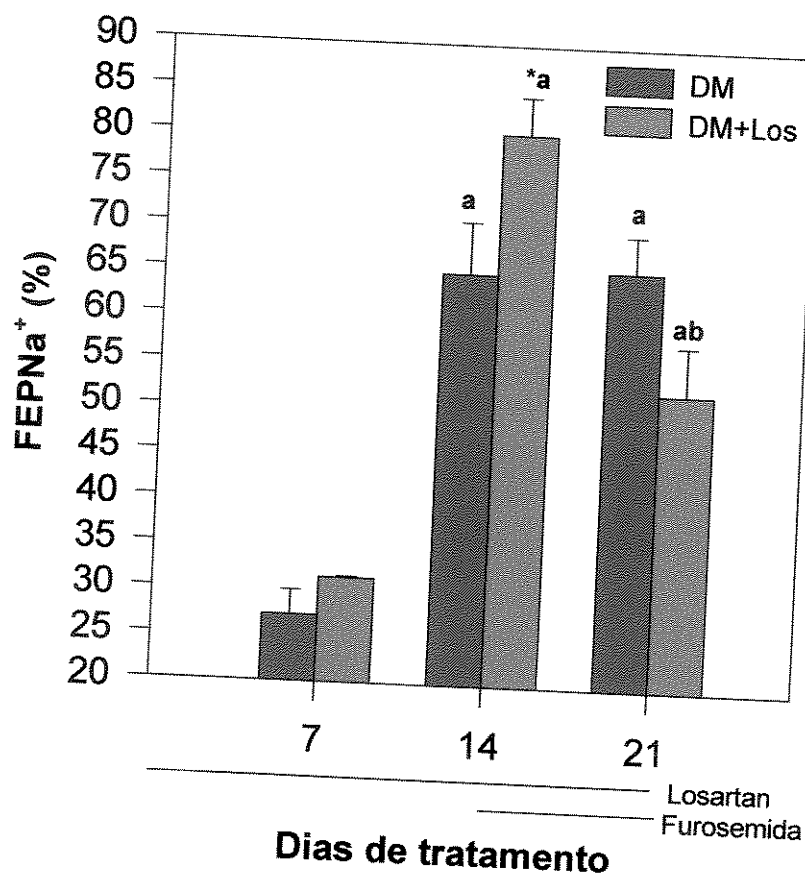


Figura 20: Variação da fração de excreção proximal de sódio (FEPNa⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes n	27,95±2,67 08	64,93±5,68 ^a 08	65,58±3,95 ^a 06
Diabetes+losartan n	31,40±1,40 07	80,31±4,14 ^{*a} 10	52,41±5,32 ^{ab} 11

Tabela 20: Valores obtidos para a fração de excreção proximal de sódio de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

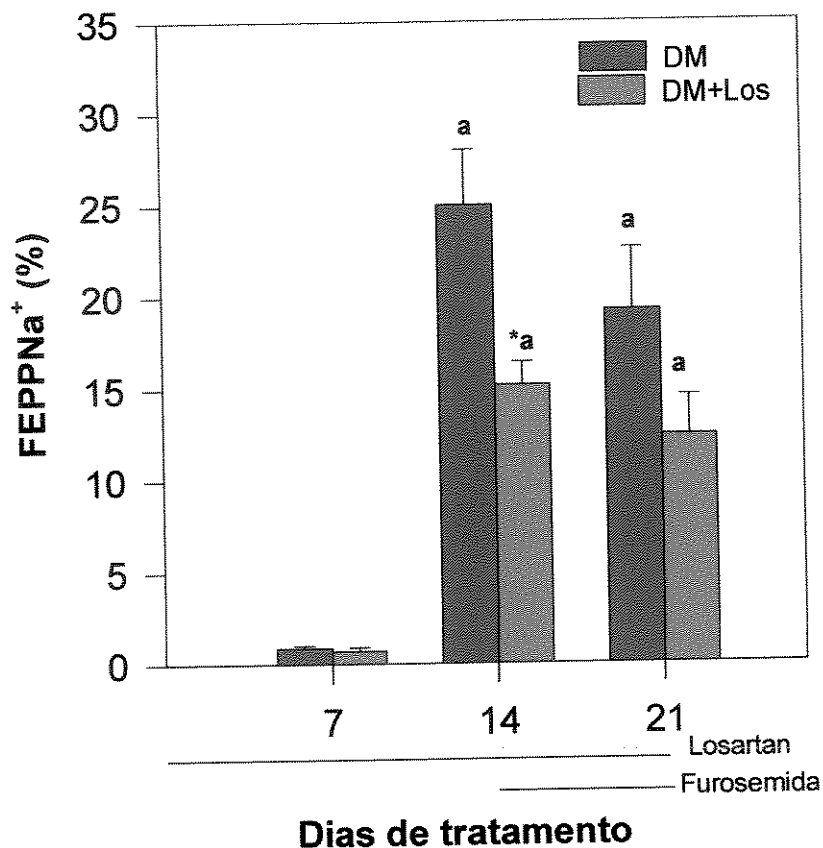


Figura 21: Variação da excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa⁺) de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia	14º dia	21º dia
Diabetes n	0,86±0,16 08	24,97±3,05 a 08	19,24±3,36 a 06
Diabetes+losartan n	0,71±0,19 07	15,16±1,27 *a 10	12,40±2,16 a 11

Tabela 21: Valores obtidos para a fração de excreção pós-proximal de sódio de ratos diabéticos experimentais tratados com losartan 10 mg/kg/dia e após a administração aguda e crônica de furosemida.

4.2 Efeito da denervação renal bilateral sobre a pressão arterial e a excreção renal de sódio de animais tratados aguda e cronicamente com furosemida

4.2.1 Animais-controle

Como demonstrado na tabela e figura 22, a massa corporal pré-operatória dos animais DNx foi estatisticamente maior que a verificada no grupo sham. Entretanto, uma queda significativa desta massa foi observada a partir do 6º dia pós-cirúrgico, contribuindo deste modo para a similitude entre as massas dos animais dos grupos estudados, a partir dessa fase até término do período experimental.

A denervação renal bilateral promoveu um decréscimo significativo e progressivo da PAC entre os 6º e 20º dias pós-operatório, quando comparado aos animais do grupo sham. A administração crônica de furosemida não alterou a PAC em nenhum dos grupos estudados (figura e tabela 23).

A figura e a tabela 24 registram a semelhança entre os volumes urinários dos grupos sham e DNx. Ambos os grupos, após a administração aguda de furosemida (14º dia pós-cirúrgico) apresentaram um aumento significativo da diurese, que se manteve elevada após o tratamento crônico com diurético (21º dia pós-cirúrgico).

O *clearance* de creatinina elevou-se significativamente nos animais submetidos à denervação renal bilateral em relação aos sham, no 7º dia pós-cirúrgico. Contudo, após o tratamento agudo ou crônico dos animais com furosemida, nenhuma diferença estatística foi verificada entre os Ccr dos grupos sham e DNx. Apesar de uma não-diferença entre os Ccr dos dois grupos experimentais, a administração aguda de furosemida diminuiu significativamente a filtração glomerular em ambos os grupos. Entretanto, observa-se uma significativa

elevação da filtração glomerular no grupo DNx após a administração crônica em relação à aguda de furosemida (figura e tabela 25).

Uma semelhança no comportamento da FEK^+ foi verificada entre os grupos *sham* e DNx durante todo o estudo. Em ambos os grupos, observou-se um aumento significativo da FEK^+ com a administração aguda de furosemida, que persistiu após o tratamento crônico desse diurético de alça (figura e tabela 26).

A figura e a tabela 27 representam o perfil da $FENa^+$ do grupo DNx comparado ao do *sham*. A denervação renal não modificou a $FENa^+$. A administração aguda de furosemida elevou a $FENa^+$ que decresceu significativamente após o tratamento crônico com o diurético, em ambos os grupos.

O CNa^+ elevou-se significativamente no grupo DNx em relação ao CNa^+ do *sham*, no 7º dia pós-cirúrgico. Furosemida administrado agudamente aumentou similarmente o CNa^+ dos grupos. Interessantemente, o tratamento crônico desse diurético promoveu um decréscimo significativo do CNa^+ nos animais *sham*, que foi abolido com a denervação renal bilateral (figura e tabela 28).

Observou-se um comportamento do CLi^+ semelhante entre os grupos *sham* e DNx, embora haja uma tendência (estatisticamente não significativa) de elevação nos animais denervados, como mostra a figura e tabela 29.

O estudo da $FEPNa^+$ não apresentou diferenças significativas entre os grupos *sham* e DNx. Ambos os grupos apresentaram uma elevação significativa da $FEPNa^+$, após a administração aguda de furosemida, seguida por uma queda discreta (mas não significativa) após o tratamento crônico com o diurético (figura e tabela 30).

Não foram documentadas alterações significativas da $FEPPNa^+$ entre os grupos *sham* e DNx ao longo deste estudo. Em ambos os grupos, furosemida administrado agudamente promoveu uma significativa elevação da $FEPPNa^+$, seguida de uma queda induzida pelo tratamento crônico com o diurético somente nos animais *sham*, sem que essa diminuição da $FEPPNa^+$ contribuisse para gerar essa diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (figura e tabela 31).

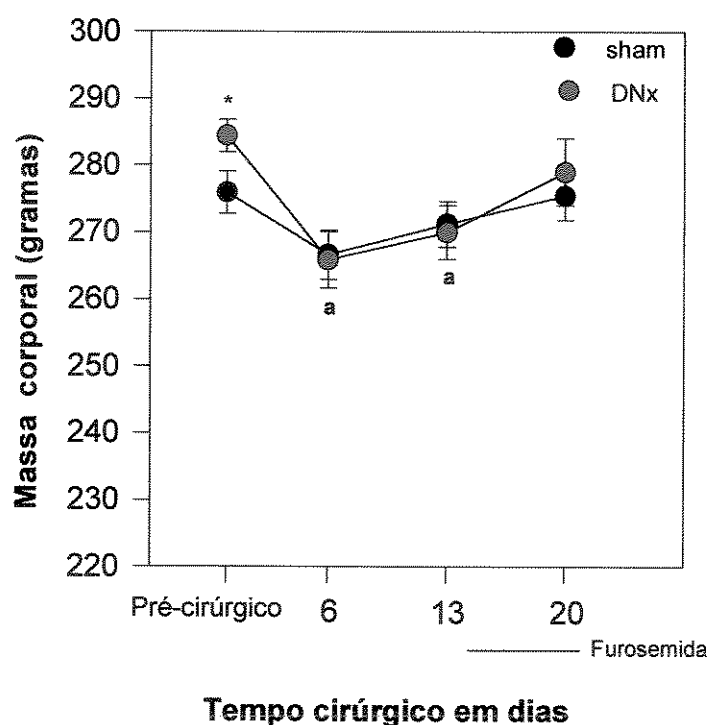


Figura 22: Efeito da denervação renal bilateral sobre a massa corporal de ratos normais e após a administração crônica de furosemida 6 mg/ peso corporal total de 12 em 12 horas (20º dia).

	Pré-cirúrgico	6º dia pós-cirúrgico	13º dia pós-cirúrgico	20º dia pós-cirúrgico
sham	275,9±3,15	266,6±3,65	271,2±3,43	275,4±3,58
n	18	18	18	18
DNx	284,4±2,46 *	265,9±4,18 a	270,0±3,99 a	279±5,02
n	15	16	15	16

Tabela 22: Valores obtidos para a massa corporal de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida 6 mg/ peso corporal total de 12 em 12 horas (20º dia pós-cirúrgico).

Anova One-Way - estatística entre os grupos: * : $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística em cada grupo- a, b, c, d: $p < 0,05$:

a: comparado ao dia pré-cirúrgico;

b: comparado ao 6º dia pós-cirúrgico;

c: comparado ao 13º dia pós-cirúrgico;

d: comparado ao 20º dia pós-cirúrgico.

Teste t-student - estatística da curva da PAC entre os grupos Co e Los - ∞ : $p < 0,05$.

n: número da amostra.

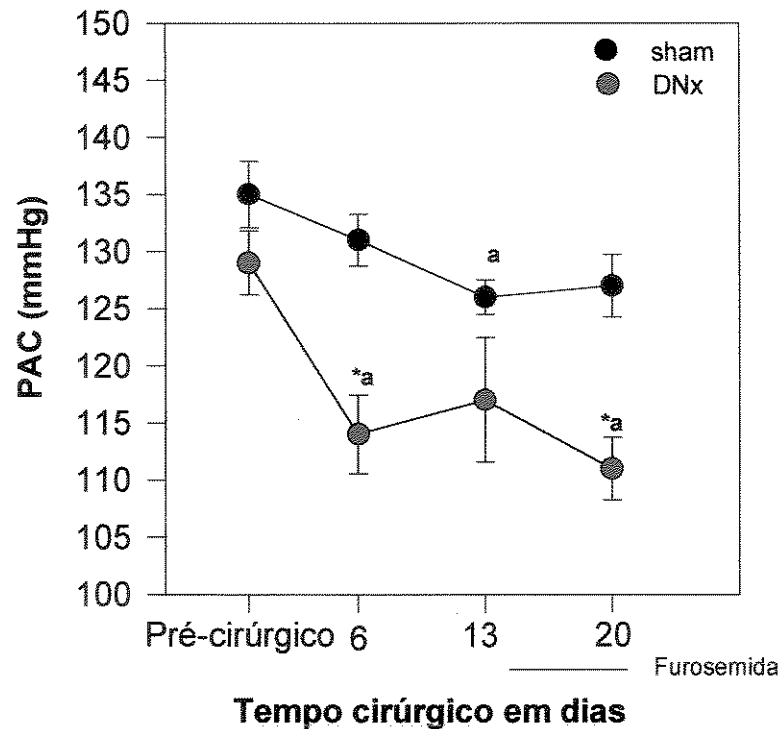


Figura 23: Pressão arterial caudal (PAC) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida (20º dia).

	Pré-cirúrgico	6º dia pós-cirúrgico	13º dia pós-cirúrgico	20º dia pós-cirúrgico
sham	134,9±2,89	130,6±2,27	126,0±1,50 a	127,1±2,74
n	17	17	16	18
DNx	128,7±2,81	114,1±3,45 *a	117,1±5,43	110,7±2,75 *a
n	15	15	16	11

Tabela 23: Valores obtidos para a pressão arterial caudal de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida.

Teste t-student - estatística entre os grupos: *: $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística em cada grupo: a, b, c, d: $p < 0,05$:

a: comparado ao dia pré-cirúrgico;

b: comparado ao 6º dia pós-cirúrgico;

c: comparado ao 13º dia pós-cirúrgico;

d: comparado ao 20º dia pós-cirúrgico.

Anova One Way - estatística da curva de PAC entre os grupos sham e DNx - ∞ : $p < 0,05$.

n: número da amostra.

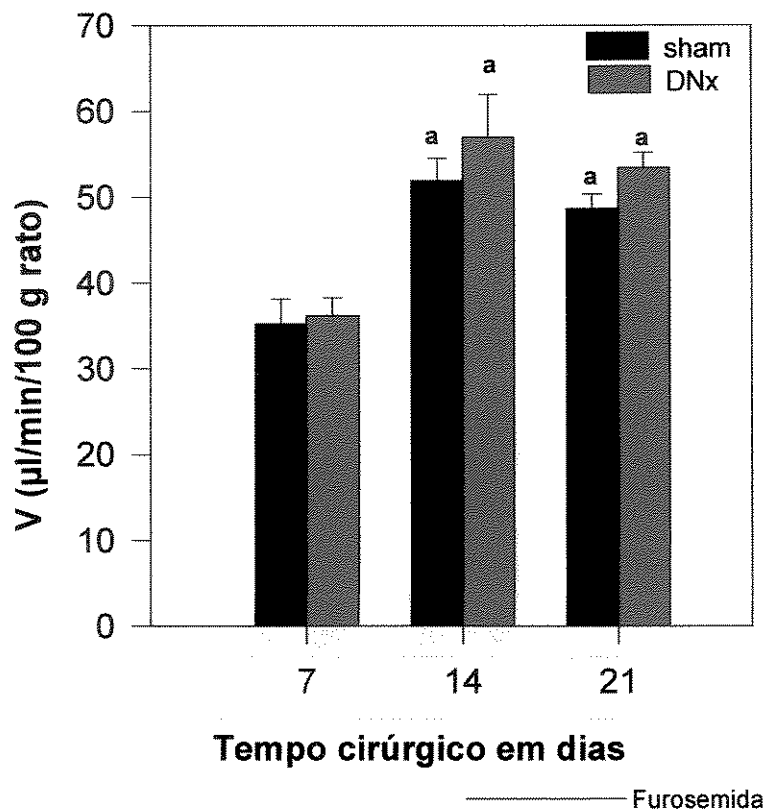


Figura 24: Volume urinário (V) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham	35,24±2,89	51,89±2,67 a	48,61±1,75 a
n	10	14	15
DNx	36,22±2,10	57,01±4,94 a	53,44±1,79 a
n	09	10	12

Tabela 24: Valores obtidos para o volume urinário de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

Anova One-Way - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Test t-student - estatística em cada grupo : a, b: $p < 0,05$:

a: 14º ou 21º dia comparado ao 7º dia pós-cirúrgico;

b: 21º dia comparado ao 14º dia pós-cirúrgico.

Estatística válida para: V, Ccr, FEK⁺, CNa⁺, CLi⁺ FENa⁺, FEPNa⁺ e FEPPNa⁺.

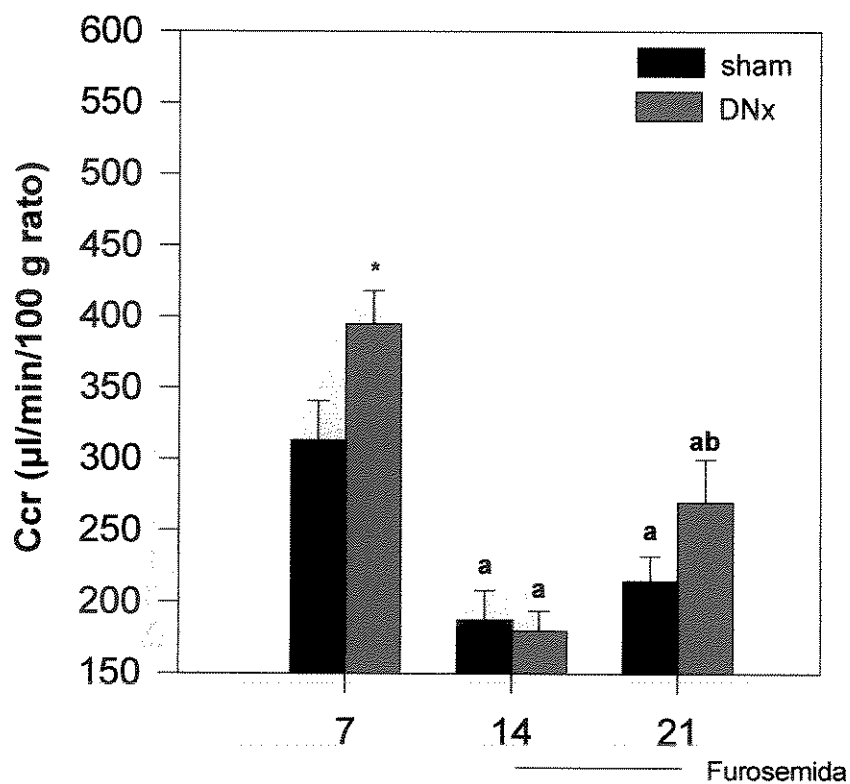


Figura 25: Efeito da denervação renal bilateral sobre o *clearance* de creatinina (Ccr) de ratos normais e após a administração aguda e crônica de furosemda.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham n	313,20±28,13 10	187,52±20,64 a 14	214,74±17,58 a 15
DNx n	394,99±23,13 * 09	179,63±14,32 a 10	269,89±23,95 ab 12

Tabela 25: Valores obtidos para o *clearance* de creatinina de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemda.

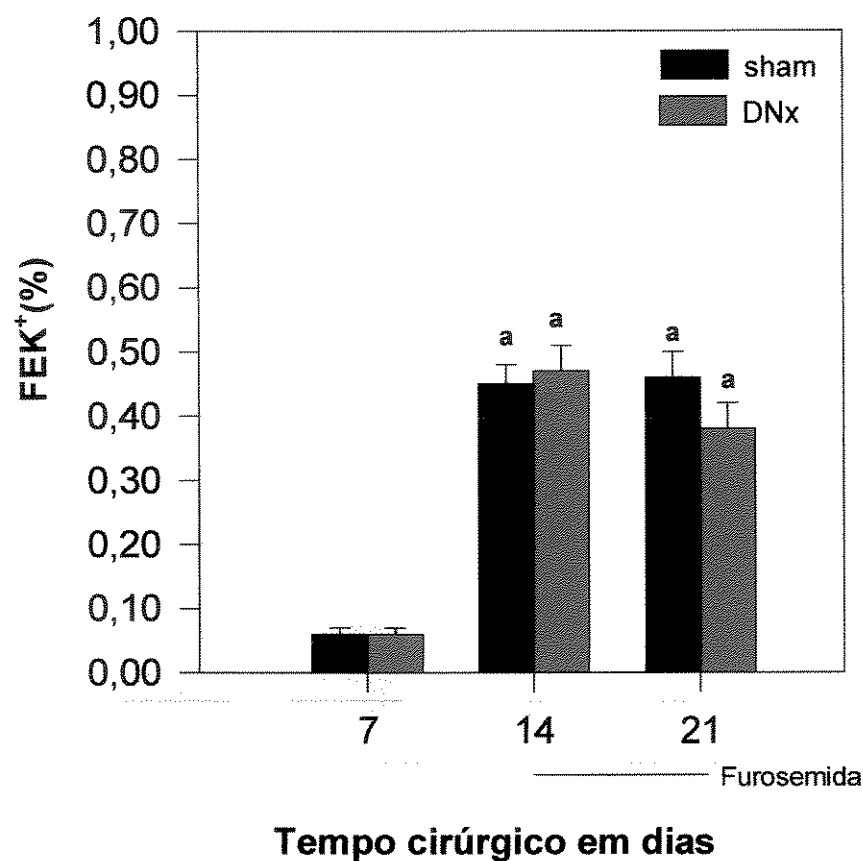


Figura 26: Fração de excreção urinária de potássio (FEK⁺) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham n	0,06±0,01 10	0,45±0,03 a 14	0,46±0,04 a 15
DNx n	0,06±0,01 09	0,47±0,04 a 10	0,38±0,04 a 12

Tabela 26: Valores obtidos para fração de excreção urinária de potássio de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

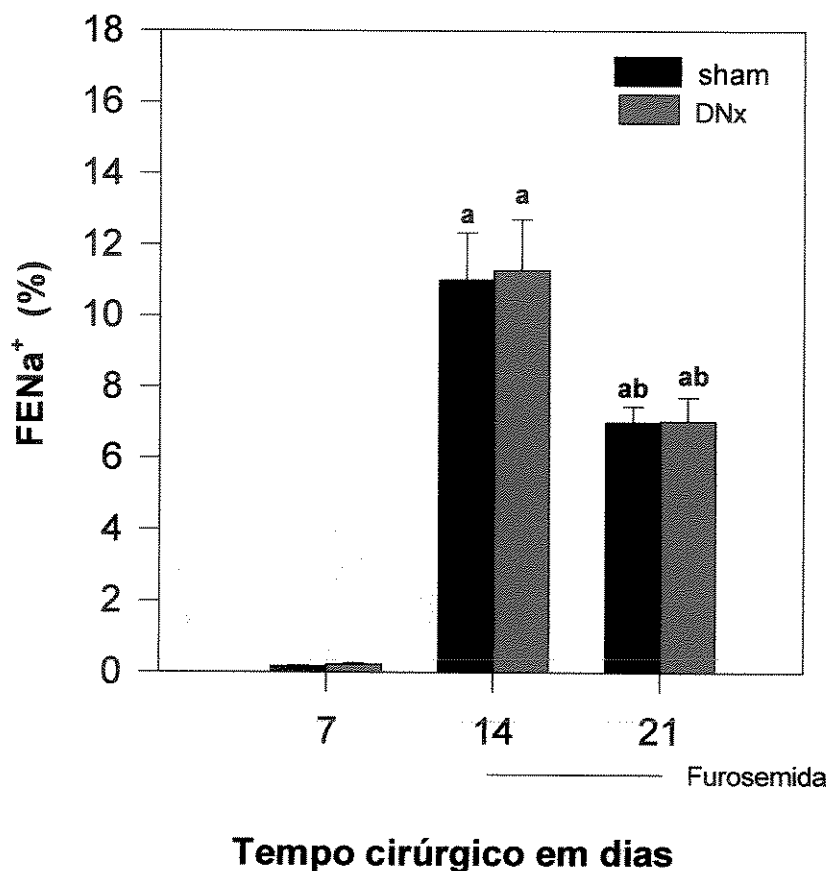


Figura 27: Fração de excreção de sódio (FENa⁺) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemda.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham n	0,16±0,02 10	11,01±1,32 a 14	7,01±0,46 ab 15
DNx n	0,22±0,03 09	11,29±1,43 a 10	7,50±0,66 ab 12

Tabela 27: Valores obtidos para a fração de excreção de sódio de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemda.

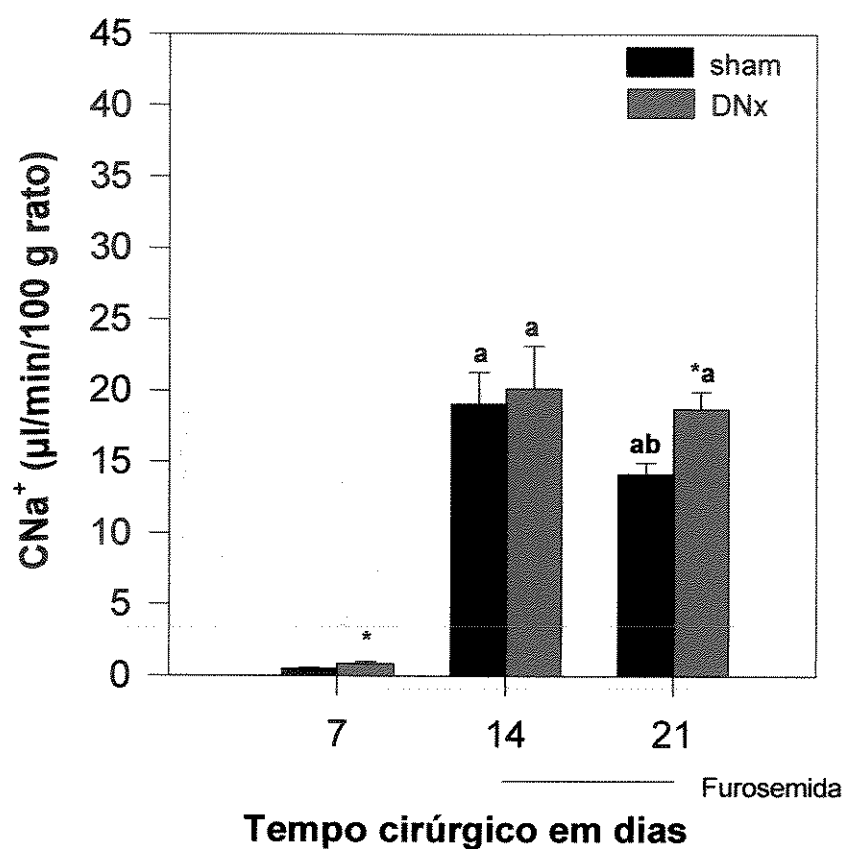
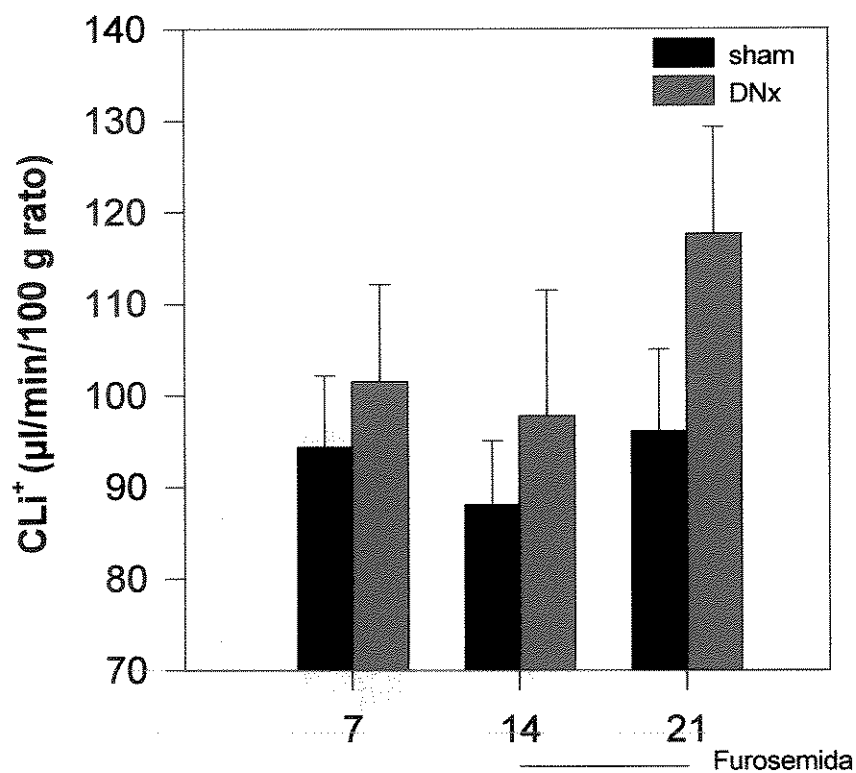


Figura 28: *Clearance* de sódio (CNa⁺) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham n	0,50±0,07 10	19,11±2,23 ^a 14	14,16±0,79 ^{ab} 15
DNx n	0,85±0,14 [*] 09	20,18±2,99 ^a 10	18,72±1,23 ^{a*} 12

Tabela 28: Valores obtidos para *clearance* de sódio de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida



Tempo cirúrgico em dias

Figura 29: *Clearance* de lítio (CLi⁺) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham	94,33±7,79	88,09±6,94	96,17±8,91
n	10	14	15
DNx	101,50±10,62	97,79±13,69	117,63±11,62
n	09	10	12

Tabela 29: Valores obtidos para *clearance* de lítio de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

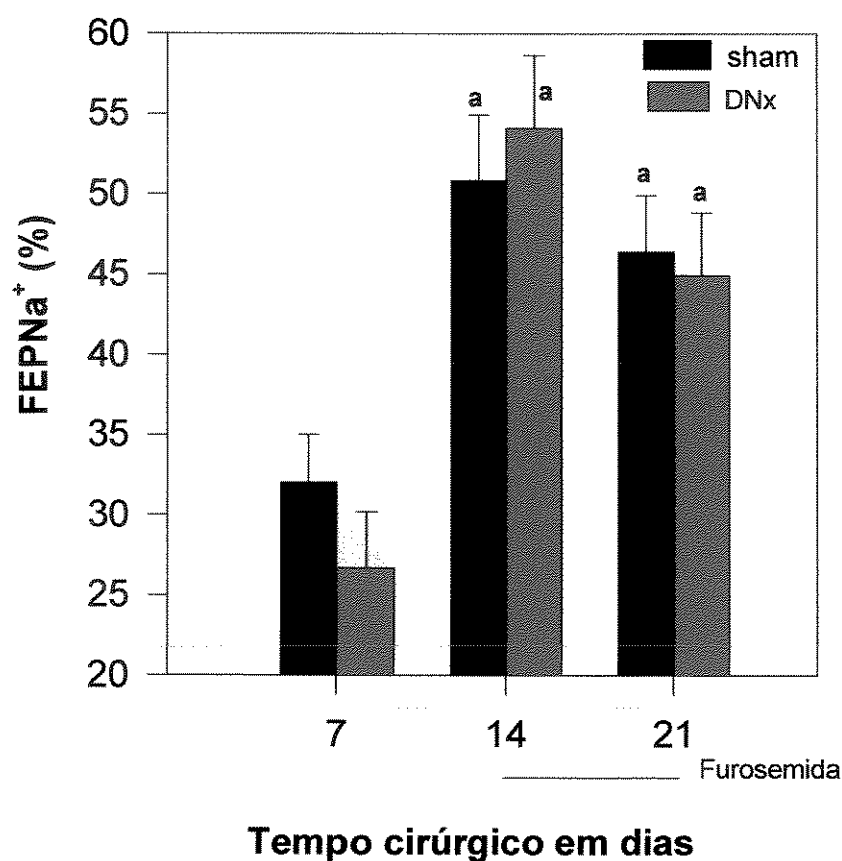


Figura 30: Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa⁺) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham n	32,02±2,99 10	50,82±54,13 a 14	46,40±3,52 a 15
DNx n	26,69±3,50 09	54,13±4,50 a 10	44,93±3,91 a 12

Tabela 30: Valores obtidos para fração de excreção proximal de sódio de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

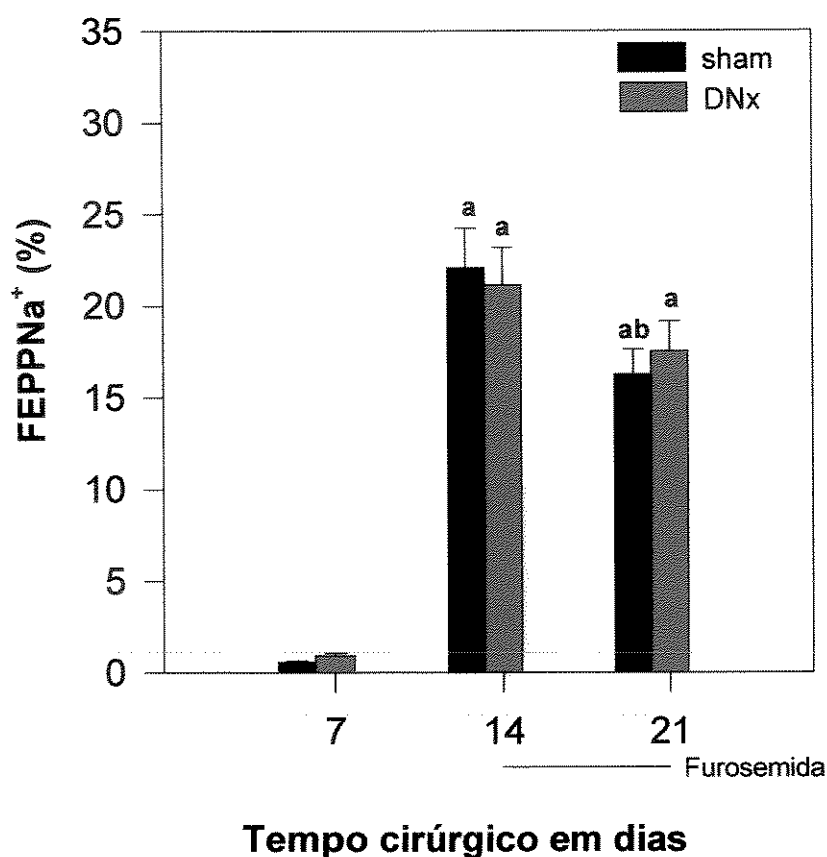


Figura 31: Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa⁺) de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
sham	0,56±0,08	22,06±2,18^a	16,24±1,37^{ab}
n	10	14	15
DNx	0,91±0,16	21,12 ±2,07^a	17,52±1,62^a
n	09	10	12

Tabela 31: Valores obtidos para fração de excreção pós-proximal de sódio de ratos normais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

4.2.2 Animais diabéticos

A denervação renal bilateral não promoveu alterações significativas da glicemia entre os grupos DM+sham e DM+DNx ao longo do estudo. Em ambos os grupos, furosemida administrado aguda ou cronicamente elevou similar e significativamente a glicemia, quando comparada aos seus valores basais (7º dia) (figura e tabela 32).

A tabela e a figura 33 mostram o perfil da massa corporal do grupo DM+sham comparado ao do DM+DNx. Ambos os grupos apresentaram uma diminuição do peso corporal semelhante induzida pela estreptozotocina, quando comparamos este peso aos seus valores no estado pré-diabético. A média da massa corporal do grupo DM+DNx foi significativamente maior que aquela evidenciada no grupo DM+sham.

Como demonstrado na tabela e figura 34, ocorreu uma queda significativa da PAC nos 6º e 20º dias pós-denervação quando comparada à dos animais submetidos à cirurgia simulada. O grupo DM+sham apresentou uma elevação significativa da PAC a partir 13º dia da cirurgia simulada em relação à PAC basal, e a manteve assim até o 20º dia experimental.

A denervação renal bilateral não alterou o volume urinário dos grupos DM+sham e DM+DNx, durante todas as fases do estudo. Em ambos os grupos, a administração aguda de furosemida promoveu uma elevação significativa da diurese. Entretanto, uma atenuação ($p = 0,005$) da resposta diurética induzida pelo tratamento crônico com o diurético foi observado somente no grupo DM+DNx. Apesar desse decréscimo, não foram observadas diferenças significativas entre os valores médios do volume urinário, quando comparados ambos os grupos experimentais (figura e tabela 35).

Nos animais DM+sham, a administração aguda de furosemida promoveu uma queda significativa do Ccr, acompanhada por uma atenuação desta queda após o tratamento crônico com o diurético. Contudo, os animais DM+DNx apresentaram um decréscimo significativo do Ccr somente no tratamento crônico

com o diurético, quando comparado ao seu período basal (7º dia cirúrgico)(figura e tabela 36).

A administração aguda de furosemida promoveu uma elevação significativa da FEK^+ nos grupos DM+sham e DM+DNx. Após o tratamento crônico com furosemida, observou-se uma diminuição significativa desta caliorese mais acentuada nos animais diabéticos submetidos à denervação renal bilateral (figura e tabela 37).

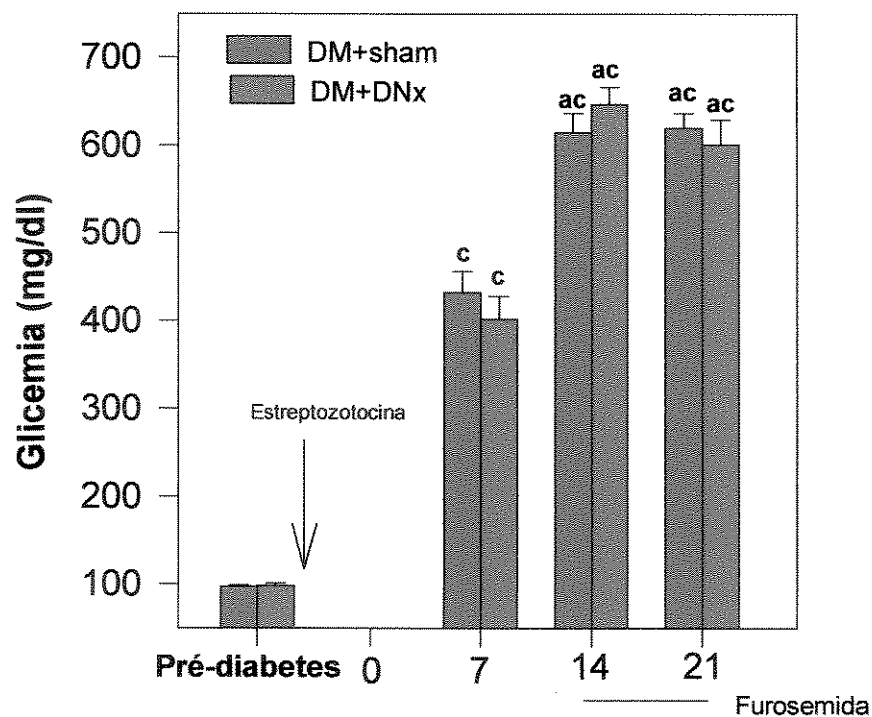
A figura e a tabela 38 apresentam um comportamento semelhante da FENa^+ nos grupos DM+sham e DM+DNx. Ambos os grupos apresentaram uma elevação da FENa^+ induzida pela administração aguda de furosemida, e uma queda dessa fração durante o tratamento crônico com o diurético.

O CNa^+ foi similar durante todas as fases do estudo, quando comparados os grupos DM+sham e DM+DNx. Em ambos os grupos, foi observada uma elevação significativa do CNa^+ após a administração aguda de furosemida, seguida por uma atenuação desta durante a administração crônica do diurético de alça (figura e tabela 39).

Não houve diferença estatisticamente significativa do CLi^+ entre os grupos experimentais estudados (figura e tabela 40).

O comportamento da FEPNa^+ foi similar nos grupos DM+sham e DM+DNx ao longo de todo o estudo. Em ambos os grupos, ocorreu uma elevação significativa da FEPNa^+ induzida pela administração aguda de furosemida. Esta elevação foi seguida por uma queda após administração crônica do diurético, somente no grupo DM+DNx. Apesar desta queda da FEPNa^+ observada nesse grupo, ela não foi suficiente para produzir diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DM+sham (figura e tabela 41).

Como demonstrado na figura e tabela 42, a denervação renal bilateral promoveu uma atenuação significativa da elevação da FEPPNa^+ induzida pelo tratamento agudo de furosemida. Verificou-se também que após a administração crônica em relação à aguda, o grupo DM+sham apresentou uma queda significativa da FEPPNa^+ , e esse fato não foi observado no grupo DM+DNx.



Tempo cirúrgico em dias

Figura 32: Glicemia de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda (14º dia) e crônica de furosemida (21º dia).

	Pré-diabetes	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham	97,7±1,87	432±24,08 c	613,9±21,88	619,2±16,59 ac
n	10	12	11	11
Diabetes +DNx	97,6±2,7	401,8±25,76 c	646,1±19,69	600,1±29,03 ac
n	10	10	09	11

Tabela 32:Valores obtidos para a glicemia de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

Teste t-student - estatística entre os grupos - *: $p < 0,05$.

Teste t-student - estatística dentro de cada grupo – a, b, c: $p < 0,05$:

a: comparado ao 7º dia pós-cirúrgico;

b: comparado ao 14º dia pós-cirúrgico;

c: comparado ao dia pré-diabetes.

n: número da amostra

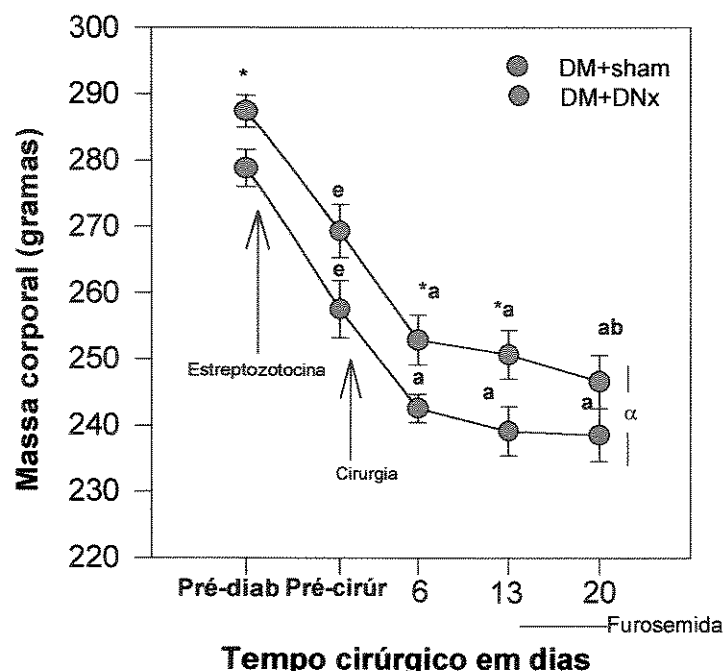


Figura 33: Variação da massa corporal de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida (20º dia).

	Pré-diabetes	Pré-cirúrgico	6º dia pós-cirúrgico	13º dia pós-cirúrgico	20º dia pós-cirúrgico
Diabetes + sham	278,8±2,90	257,5±4,52 e	242,5±2,27 a	239,1±3,88 a	238,5±4,2 a
n	12	12	11	11	11
Diabetes +DNx	287,4±2,49 *	269,3±4,19 e	252,9±3,92 *a	253,1±3,21 *a	246,6±4,2 ab
n	11	11	11	10	11

Tabela 33: Valores obtidos para a massa corporal de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida (20º).

Test t-student - estatística entre os grupos - * $p < 0,05$.

Test t-student - estatística dentro de cada grupo – a, b, c, d, e: $p < 0,05$:

a: comparado ao dia pré-cirúrgico;

b: comparado ao 6º dia pós-cirúrgico;

c: comparado ao 13º dia pós-cirúrgico;

d: comparado ao 20º dia pós-cirúrgico;

e: comparado ao dia pré-diabetes.

Anova One-Way - estatística da curva da massa corporal entre os grupos DM+sham e DM+DNx: α : $p < 0,05$.

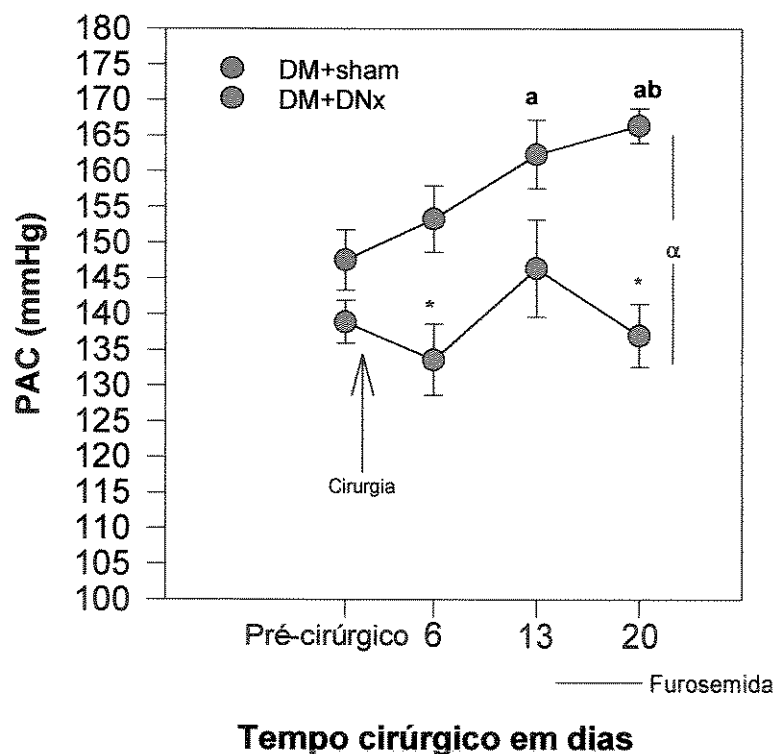


Figura 34: Variação da pressão arterial caudal (PAC) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida (20º dia) .

	Pré-cirúrgico	6º dia pós-cirúrgico	13º dia pós-cirúrgico	20º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham	147,6 ±4,22	153,3±4,68	162,5±4,82 a	166,4±2,41 ab
n	12	11	11	12
Diabetes+DNx	138,9±3,01	133,6±4,97 *	146,4±6,80	137,0±4,41 *
n	10	10	11	11

Tabela 34: Valores obtidos para pressão arterial caudal de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração crônica de furosemida.

Test t-student - estatística entre os grupos - *: $p < 0,05$.

Test t-student - estatística em cada grupo - a, b, c, d: $p < 0,05$:

a: comparado ao dia pré-cirúrgico;

b: comparado ao 6º dia pós-cirúrgico;

c: comparado ao 13º dia pós-cirúrgico;

d: comparado ao 20º dia pós-cirúrgico.

Anova One Way - estatística da curva da massa corporal entre os grupos DM+sham e DM+DNx - α : $p < 0,05$.

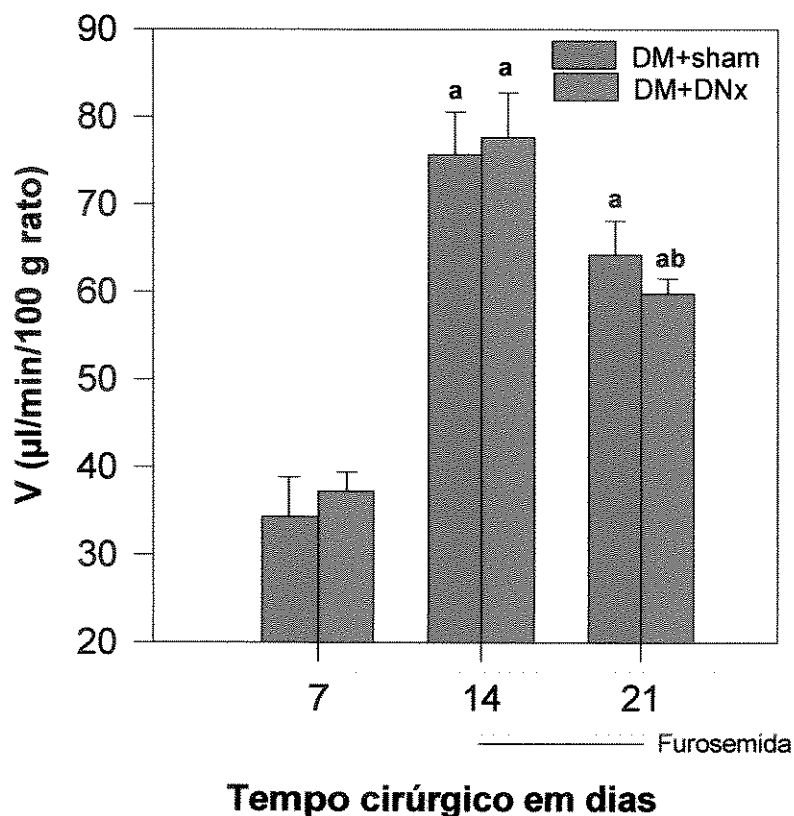


Figura 35: Volume urinário (V) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda (14º dia) e crônica (21º dia) de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham n	34,31±4,52 07	75,69±4,91 a 06	64,22±3,88 a 08
Diabetes+DNx n	37,22±2,21 08	77,69±5,06 a 08	59,74±1,752 ab 08

Tabela 35: Valores obtidos para o volume urinário de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

Anova One-Way - estatística entre os grupos: * $p < 0,05$.

Test t-student - estatística dentro de cada grupo - a, b: $p < 0,05$:

a: 14º ou 21º dia comparado ao 7º dia pós-cirúrgico;

b: 21º dia comparado ao 14º dia pós-cirúrgico.

n: número da amostra

Estatística válida para: V, Ccr, FEK⁺, CNa⁺, CLi⁺, FENa⁺, FEPNa⁺ e FEPPNa⁺.

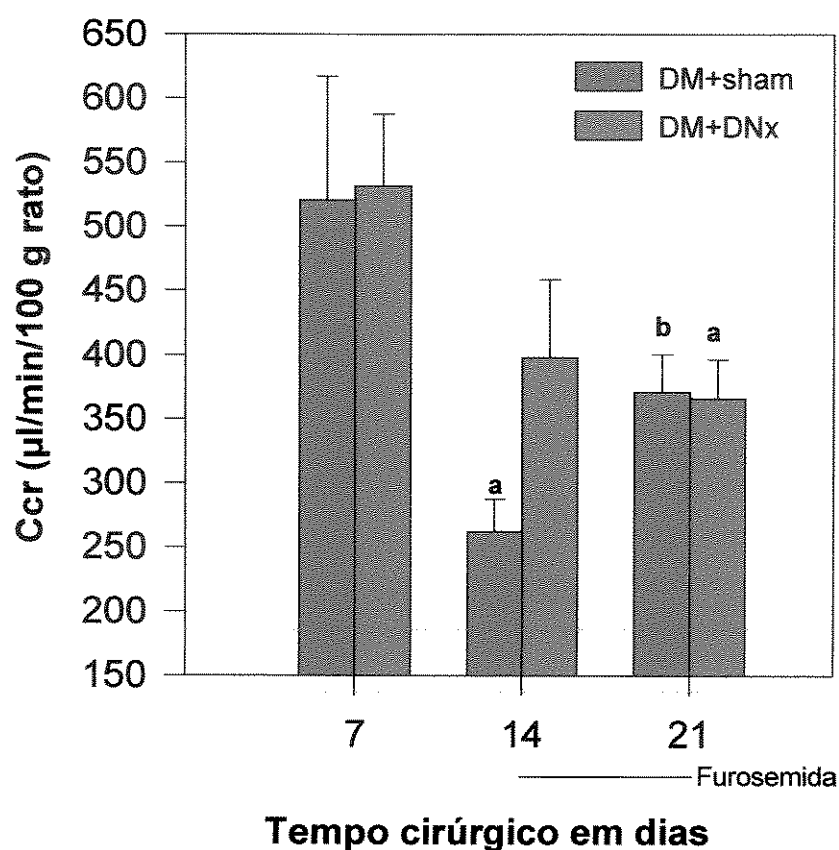


Figura 36: *Clearance* de creatinina (Ccr) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham n	515,70±94,39 07	262,31±25,18 a 06	370,93±29,01 b 08
Diabetes+DNx n	530,23±56,57 08	398,1±60,82 08	365,43±30,08 a 08

Tabela 36: Valores obtidos para o *clearance* de creatinina de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

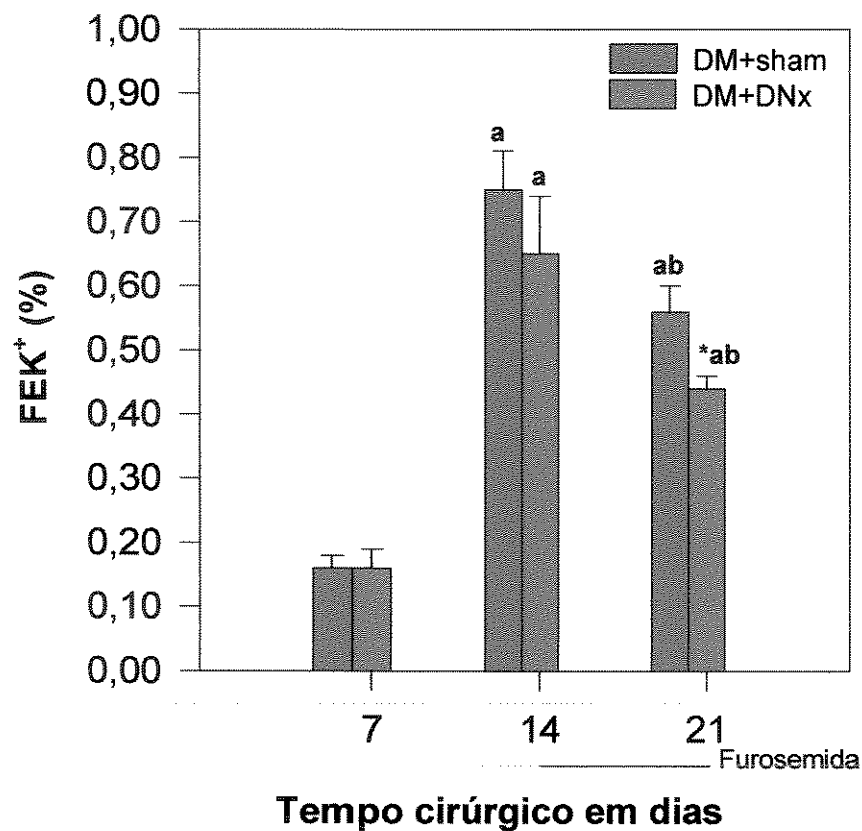
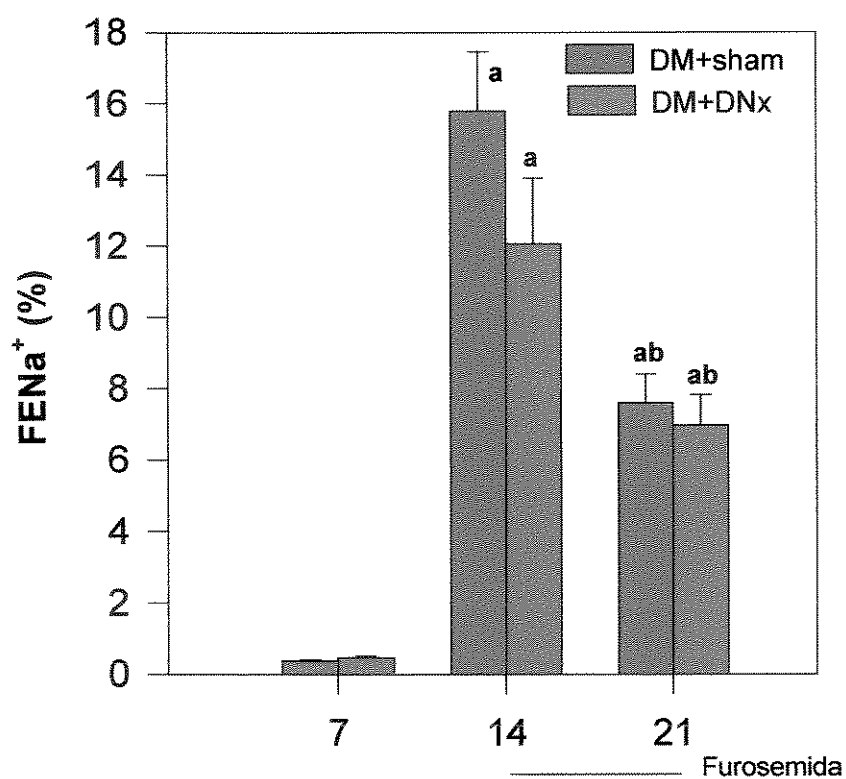


Figura 37: Fração de excreção renal de potássio (FEK^+) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham n	0,17±0,02 07	0,75±0,06 a 06	0,56±0,04 ab 08
Diabetes+DNx n	0,16±0,03 08	0,65±0,09 a 08	0,44±0,02 *ab 08

Tabela 37: Valores obtidos para fração de excreção renal de potássio de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.



Tempo cirúrgico em dias

Figura 38: Fração de excreção de sódio (FENa⁺) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral, e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham	0,38±0,04	15,79±1,67 a	7,59±0,81 ab
n	07	06	08
Diabetes+DNx	0,45±0,06	12,02±1,85 a	6,96±0,86 ab
n	08	08	08

Tabela 38: Valores obtidos para a fração de excreção de sódio de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

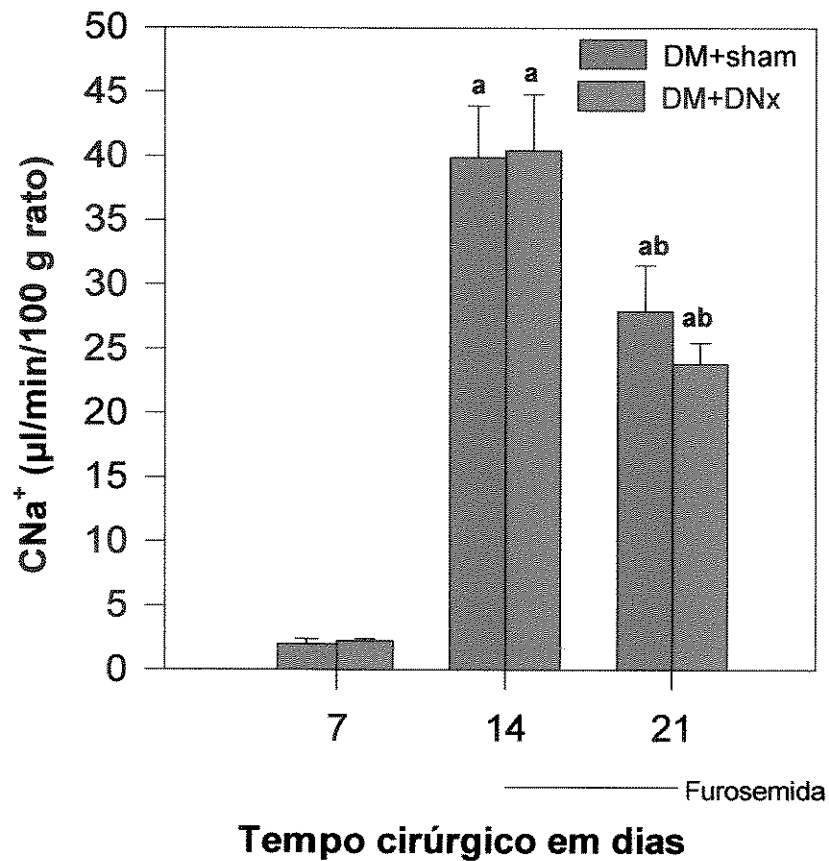


Figura 39: Clearance de sódio (CNa⁺) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham	1,98±0,42	39,88±4,01 a	27,95±3,56 ab
n	07	06	08
Diabetes+DNx	2,22±0,17	40,44±4,36 a	23,82±1,67 ab
n	08	08	08

Tabela 39: Valores obtidos para o clearance de sódio de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

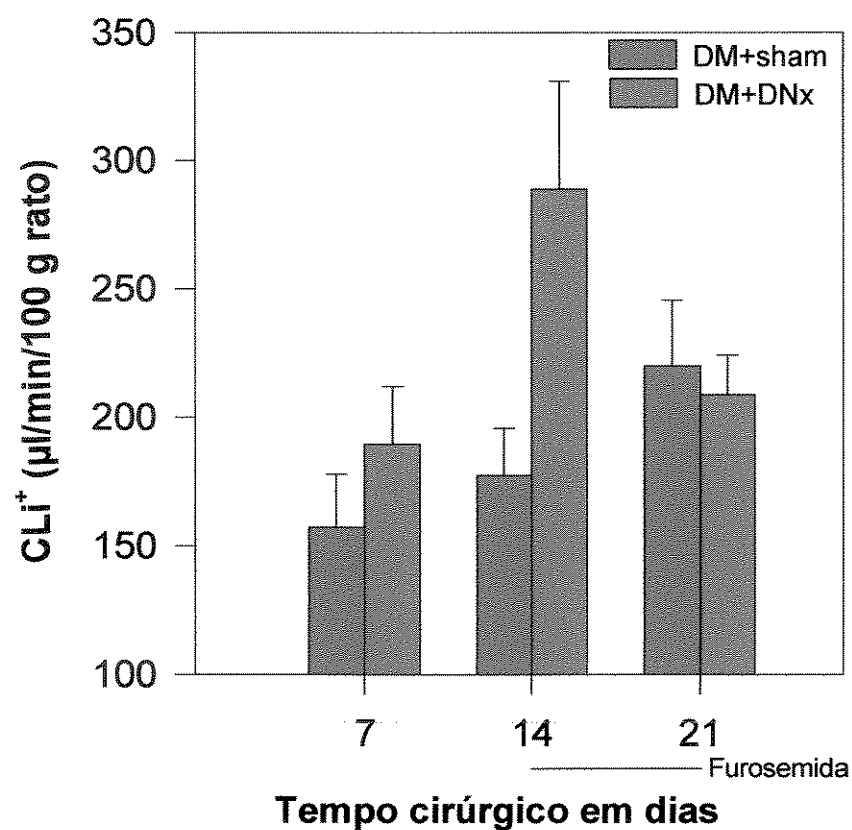


Figura 40: Clearance de lítio (CLi⁺) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham n	157,17±20,67 07	177,27±18,48 06	219,89±25,67 08
Diabetes+DNx n	189,55±22,35 08	288,93±42,09 08	208,72±15,41 08

Tabela 40: Valores obtidos para o clearance de lítio de ratos diabéticos experimentais, submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

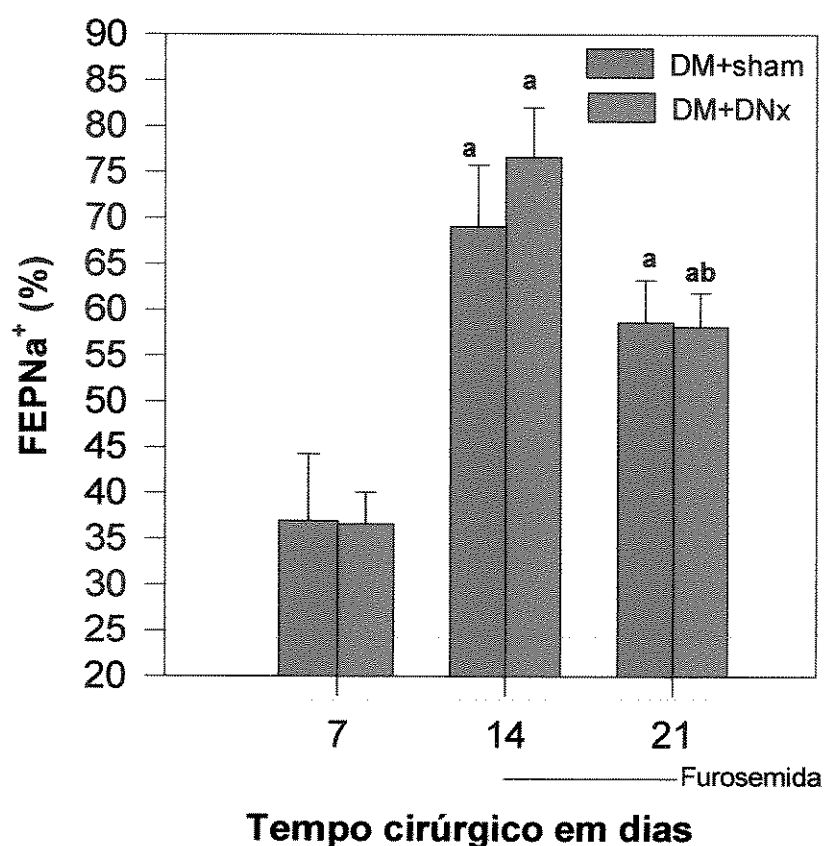


Figura 41: Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa⁺) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham	37,04±7,31	69,06±6,75^a	58,66±4,57^a
n	07	06	08
Diabetes+DNx	36,67±3,50	76,48±5,43^a	58,22±3,69^{ab}
n	08	08	08

Tabela 41: Valores obtidos para a fração de excreção proximal de sódio de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica da furosemida.

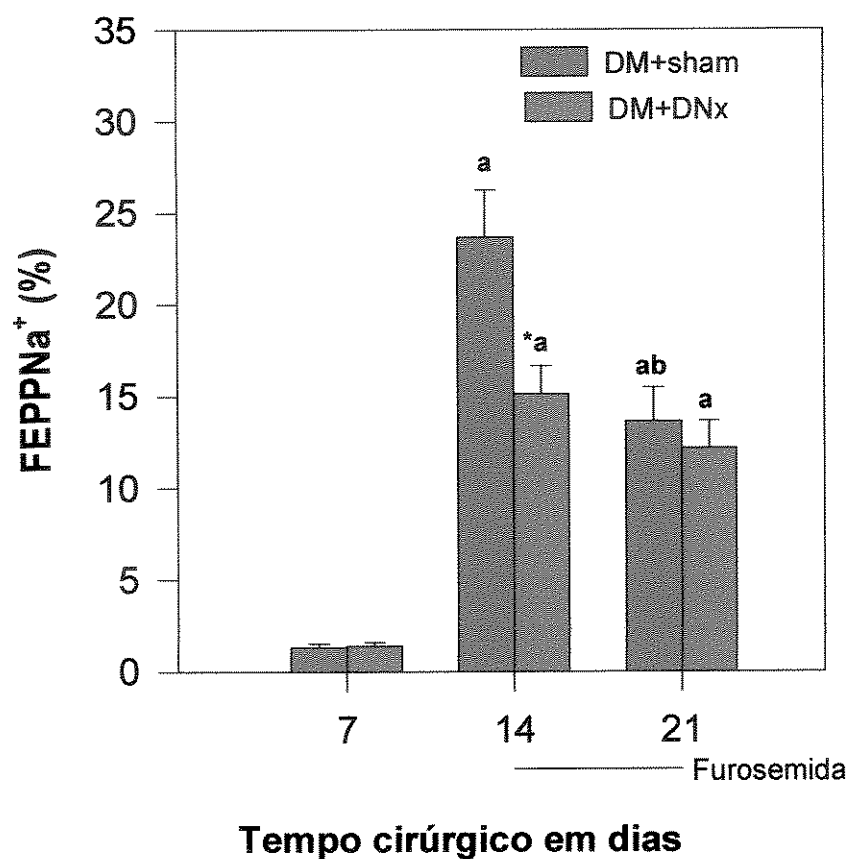


Figura 42: Variação da fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa⁺) de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica.

	7º dia pós-cirúrgico	14º dia pós-cirúrgico	21º dia pós-cirúrgico
Diabetes+sham	1,29±0,24	23,68±2,55^a	13,64±1,83^{ab}
n	07	06	08
Diabetes+DNx	1,36±0,24	15,12±1,55^{*a}	12,14±1,51^a
n	08	08	08

Tabela 42: Valores obtidos para fração de excreção pós-proximal de sódio de ratos diabéticos experimentais submetidos à denervação renal bilateral e após a administração aguda e crônica de furosemida.

5. DISCUSSÃO

5.1- Efeito do bloqueio de receptores AT1 de angiotensina sobre a excreção renal de sódio e a pressão arterial em ratos tratados aguda e cronicamente com furosemida

5.1.1 Animais-controle

Angiotensina II (All) reconhece dois tipos de receptores: AT1 e AT2. Os receptores AT1 são responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos induzidos por All, tais como: secreção de aldosterona e catecolaminas, vasoconstrição arterial e estimulação do transporte de água e sódio em túbulo proximal (Zhuo *et al.*, 1995).

Neste estudo avaliamos o efeito do bloqueio de receptores AT1 pelo losartan (previamente chamado de DuP 753) sobre a pressão arterial caudal e a manipulação tubular de sódio, em ratos normotensos e acordados, após a administração crônica de furosemida por seis dias.

5.1.1.1 – Pressão arterial caudal

Nossos resultados mostram que o tratamento com losartan (DuP 753) causa uma resposta hipotensora efetiva sobre a pressão arterial caudal em ratos normotensos, tanto nos 6° e 13° dias pós-tratamento. Este efeito hipotensor persiste após a administração de furosemida por seis dias. Estudos prévios têm demonstrado que a infusão intravenosa de All na concentração de 0,1 µg/kg em ratos normotensos causa uma elevação da pressão arterial eficientemente atenuada pelo tratamento concomitante dos animais com DuP 753 10 mg/kg por via oral (Wong *et al.*, 1990). Estudos realizados em modelos após a restrição da ingestão oral de sódio (Jover *et al.*, 1994) e com hipertensão arterial renovascular (Wong *et al.*, 1990) mostram que a resposta hipotensora ao DuP 735 é devido ao bloqueio da ação vasoconstritora de All. Observa-se nesses modelos uma paralela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Estudos prévios têm apresentado resultados conflitantes em relação ao efeito hipotensor do DuP 753 em ratos normotensos. Wong *et al.* (1990) revelaram que DuP 753 (10 mg/kg), administrado agudamente por via oral ou intravenosa, não promoveu qualquer efeito hipotensor em ratos normotensos. Da mesma forma, Barthelmebs *et al.* (1995) demonstraram que ratos Wistar normotensos medicados por três com losartan (10 mg/kg/dia) não apresentaram qualquer queda significativa da pressão arterial sistólica. Por outro lado, consistentemente com os nossos resultados, Bunkenburg *et al.* (1991) relataram um efeito hipotensor de DuP 753 administrado agudamente, por via intravenosa, ou após sete dias de tratamento em ratos normotensos.

Evidências mostrando a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) têm sido confirmadas em animais normotensos tratados com DuP 753 por sete ou cinco dias. Esta ativação é confirmada pela elevação da atividade da renina plasmática (Bunkenberg *et al.*, 1991; e Barthelmebs *et al.*, 1995), pela elevação sérica da concentração da angiotensina II e pela diminuição concentração plasmática do substrato de renina (Bunkenberg *et al.*, 1991). Desse modo, nossos resultados confirmam este efeito hipotensor de losartan em ratos normotensos, obtidos após o 6º dia de tratamento, possivelmente como resultado do bloqueio da ativação do SRAA nesses animais; todavia, o mecanismo inicial responsável pela ativação do SRAA persiste desconhecido.

No presente estudo observou-se uma elevação da pressão arterial caudal em animais-controle normotensos, durante o tratamento com o diurético. Em ratos, tem sido demonstrado que o tratamento com furosemida eleva a atividade da renina plasmática (Wong *et al.*, 1990;) e, conseqüentemente, a ativação do sistema renina-angiotensina (Lane *et al.*, 1998). O estudo também mostra que animais tratados com losartan apresentaram uma diminuição da pressão arterial caudal durante o tratamento com furosemida 6 mg/rato de 12 em 12 horas. Janssen *et al.* (1994) demonstraram que a resposta hipotensora de losartan (intravenosa) ocorreu 20 minutos após sua administração em ratos normotensos tratados com furosemida. Lane *et al.* (1998) apresentaram resultados similares da

ação hipotensora de losartan em ratos tratados cronicamente com furosemida por seis semanas.

Nossos resultados sugerem que, a despeito da espoliação hidrossalina induzida pelo furosemida, a pressão arterial manteve-se dentro de níveis normais, possivelmente por uma elevação da atividade de SRAA. O tratamento concomitante com losartan permitiu inferir a existência de uma atividade vasoconstritora periférica via AT1, o que manteria a homeostasia pressórica nestes animais.

5.1.1.2 Função renal

O bloqueio de AT1 por losartan, após sete dias de tratamento, promoveu uma queda na $FENa^+$ associada à diminuição da $FEPPNa^+$ e da FEK^+ . Nenhuma alteração da filtração glomerular (Ccr), da $FEPNa^+$ e do *clearance* de lítio foi observada neste período experimental. A AII sistêmica ou tecidual modula o transporte fluido e sódio no túbulo proximal porém, nesta fase do estudo em ratos normotensos, a administração de losartan não modificou o volume urinário e a reabsorção tubular proximal de Na^+ e de Li^+ . Barthelmebs *et al.* (1995) estudando ratos normotensos tratados com losartan por cinco dias, também constataram que o bloqueio de receptores AT1 por losartan não modificou o *clearance* de creatinina nem a manipulação renal do lítio. O efeito antinatriurético, isto é, a diminuição da $FENa^+$ e $FEPPNa^+$, verificado no presente estudo sugere a participação de mecanismos independentes dos receptores AT1, atuando nos diferentes segmentos tubulares pós-proximais, como mecanismos importantes na homeostase hidrossalina corporal.

A diminuição da FEK^+ após o bloqueio de AT1 sugere a capacidade desta substância de bloquear a excreção distal deste íon vinculada à reabsorção tubular de sódio. Vários fatores têm sido relatados como reguladores da excreção renal de K^+ (Stanton e Giedisch, 1992). A aldosterona regula a secreção de potássio nas células principais dos túbulos distais e coletores através de um aumento da

condutância dos canais de sódio na face laminar e tubular da membrana basolateral associada à estimulação de canais de potássio, e da estimulação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ na membrana basolateral (Giebisch, 1998). Dessa forma, o bloqueio de receptores AT1 no córtex adrenal por losartan poderia explicar a queda na FEK^+ nesta fase do estudo.

Furosemida administrado agudamente, por via oral, promoveu uma queda significativa da filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina. Essa queda da filtração glomerular pode estar relacionada a fatores que modificam a pressão e o coeficiente de ultrafiltração glomerular tais com: 1) modificações hemodinâmicas promovidas por vasoconstrição da arteríola renal aferente ou vasodilatação eferente; 2) diminuição da área de superfície de absorção glomerular, 3) alterações das forças de Starling e; 4) alterações da volemia.

Estudos prévios sustentam nossos resultados. Tucker e Blantz (1984) e Christensen *et al.* (1986) demonstraram, em estudos realizados através de técnica de micropunção e pelo *clearance* de inulina respectivamente, um efeito de furosemida sobre a filtração glomerular dependente do estado da volemia do animal. Nesses estudos, os animais cujas perdas urinárias não foram repostas, observou-se uma queda da filtração glomerular. Esta queda ocorre homogeneamente em todas as regiões do córtex renal (Tenstad e Williamson, 1995).

Furosemida estimula a elevação sérica de vários hormônios que podem influenciar a hemodinâmica glomerular, tais como: renina plasmática e conseqüentemente AII, catecolaminas séricas e vasopressina (Fujimara e Ebihara, 1988; Petersen e DiBona, 1995, Petersen *et al.*, 1992; e Gariépy *et al.*, 1992).

O estudo de Janssen *et al.* (1994) em ratos acordados mostrou que a resposta vasoconstritora renal, caracterizada pela elevação da resistência arteriolar e diminuição do fluxo sanguíneo renais, observadas após 60 minutos da administração de furosemida (8 mg/kg), em animais sem reposição volêmica das perdas urinárias, foi mediada pela estimulação de receptores AT1. Nesses animais, a pressão arterial sistêmica manteve-se inalterada. Bak *et al.* (1991) também relataram que a vasoconstrição induzida por furosemida foi inibida por

enalapril (inibidor de enzima conversora de angiotensina). Estes dois estudos sugerem a importância AII mediando a vasoconstrição renal em resposta à administração de furosemida. Todavia, BaK *et al.* (1991) verificaram que, apesar de enalapril inibir a resposta vasoconstritora, induzida por furosemida, a queda da filtração glomerular não foi alterada nos animais sem reposição da volemia, sugerindo desse modo que a queda da filtração glomerular foi devida à depleção volêmica daqueles animais.

Em nosso estudo, losartan não modificou a queda da filtração glomerular durante a administração aguda de furosemida, desse modo a hipovolemia e a diminuição do fluxo plasmático renal podem ter sido os fatores determinantes desta queda.

Nossos resultados mostram que a poliúria e a natriurese, induzidas agudamente por furosemida, resultaram tanto da elevação da $FEPNa^+$ quanto da $FEPPNa^+$, apesar da queda da filtração glomerular. A administração aguda de furosemida causa uma elevação da diurese e natriurese em razão da inibição do co-transporte $Na^+/K^+/CL^{-2}$ na membrana apical do segmento espesso da alça ascendente de Henle (Martinez-Maldonado e Hector, 1990). Todavia um efeito inibitório de reabsorção tubular proximal de sódio e de fluido induzido por furosemida em animais sem reposição volêmica tem sido relatado em estudos de Christensen *et al.* (1986), Petersen *et al.* (1991).

Resultados conflitantes sobre as respostas hemodinâmica, diurética e natriurética ao furosemida têm sido relatados. Christensen (1990) mostrou que o estado volêmico provavelmente seja o fator determinante para a resposta diurética e natriurética deste diurético de alça.

Em nosso estudo, uma não-modificação do CLi^+ apesar da elevação $FEPNa^+$ em resposta ao tratamento agudo de furosemida, em animais-controle, sugere uma ação direta de furosemida inibindo a reabsorção de sódio em túbulo proximal. O mecanismo responsável pelo efeito inibitório de furosemida é desconhecido. Soleiman e Bizal (1996) demonstraram que este diurético inibiu o trocador cloreto/ base que é acoplado ao trocador Na^+/H^+ em túbulo proximal. Logo, o trocador cloreto/ base pode ser a proteína alvo para o efeito inibitório de

furosemida sobre a reabsorção tubular proximal de Na^+ . Em nosso estudo, esse bloqueio na reabsorção de Na^+ pelo furosemida associado a uma queda da filtração glomerular e à diminuição do fluxo plasmático renal favoreceria a uma reabsorção de lítio, o que poderia manter em parte o CLi^+ constante.

O efeito litiurético induzido pela furosemida parece realmente ser também dependente do estado volêmico do animal (Petersen, 1991). Christensen *et al.* (1986) e Petersen *et al.* (1991) utilizaram o CLi^+ para avaliar os sítios de ação do furosemida e a manipulação tubular de sódio em ratos acordados e anestesiados respectivamente, sob condições de depleção volêmica aguda ou após a reposição volêmica aguda. Esses estudos mostraram que durante a depleção volêmica induzida pelo furosemida, os animais apresentam um elevado CLi^+ entre 0 e 30 minutos seguido por um retorno do CLi^+ para valores próximos à excreção basal aos 60 minutos.

No presente estudo mostramos que o bloqueio de AT1 causa uma elevação do CLi^+ e da FEPNa^+ durante uma suposta depleção volêmica aguda induzida por furosemida; todavia, esse aumento não foi significativo em relação ao grupo controle não tratado com losartan. Quan e Baun (1998), estudando o transporte de fluido tubular proximal, em ratos, após uma indução de depleção volêmica, pela técnica de micropunção tubular, verificaram que losartan promoveu uma queda de reabsorção tubular proximal de fluido, sugerindo que receptores AT1 da AII estejam envolvidos no controle do transporte tubular proximal de água. Nossos resultados sugerem a participação de receptores AT1 da AII na modulação da reabsorção proximal de Na^+ durante a administração aguda de furosemida.

No presente estudo, losartan promoveu uma redução da resposta diurética induzida por furosemida administrado agudamente, que não foi relacionada às alterações na filtração glomerular, na FENaP^+ e na FENAPP^+ . Gariépy *et al.* (1992) relataram uma elevação plasmática de vasopressina após 30 minutos da administração de furosemida, em coelhos, induzida por uma elevação da atividade do SRAA. Todavia, em nosso estudo, o losartan atenuou provavelmente este suposto mecanismo antidiurético, promovido pelo aumento da liberação de vasopressiva pela furosemida.

Angiotensina II estimula a ingestão hídrica em áreas do sistema nervoso central (Fregaly e Rowland, 1991). Neurônios reguladores da sede, sensíveis à AII, foram localizados na lamina terminal, em órgãos circumventriculares e em estruturas límbicas (Fitzsimons, 1997). A região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), localizada no hipotálamo anterior, e a lamina terminal possuem uma densidade elevada de receptores AT1 e está implicada na ingestão de água induzida por AII (Fitzsimons, 1997). Em ratos, losartan administrado perifericamente reduz a ingestão de água induzida pela administração também periférica de AII (Dourish *et al.*, 1992). A administração oral de losartan também inibe os mecanismos centrais induzidos pela AII durante um curto espaço de tempo (Fitzsimons, 1997).

A queda da resposta diurética induzida pelo furosemida, administrado agudamente, nos animais tratados com losartan, sugere ser resultante de uma hipovolemia mais acentuada e ou hipotensão arterial, cuja contribuição da inibição do centro da sede, parece ser importante.

Estudos prévios relatam que a administração crônica de furosemida promove uma resposta compensatória antidiurética e antinatriurética (Ellison, 1991). Utilizando o clearance de Li^+ como marcador da manipulação tubular proximal de sódio, Christensen *et al.* (1986) e Petersen *et al.* (1991), observaram que a administração aguda de furosemida, sem reposição das perdas urinárias, causou uma ativação de mecanismos compensatórios sobre a reabsorção tubular proximal e pós-proximal de Na^+ a partir de 30 minutos.

Nossos resultados, no presente estudo, demonstraram claramente uma resposta compensatória antidiurética e antinatriurética à administração crônica de furosemida, atuando ativamente em segmentos pós-proximais do néfron (decréscimo da FEPPNa^+). Esta resposta não foi inibida por losartan. Logo, nossos dados sugerem que a AII não é essencial a esta resposta absorptiva tubular de Na^+ durante a administração crônica de furosemida.

A administração crônica de diuréticos de alça tem efeitos importantes sobre a estrutura e a função do túbulo contornado distal (Reilly and Ellison, 2000). Furosemida inibe a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal (Christensen, 1986) e o

co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{CL}^-$, em alça espessa de Henle (Martinez-Maldonado e Hector, 1990), promovendo assim um aumento do aporte de Na^+ a ser reabsorvido em segmentos mais distais do néfron. Kaissling *et al.* (1985) mostraram que infusão de furosemida crônica por seis dias, em ratas, induz hipertrofia e hiperplasia celular do túbulo contornado distal. Essas alterações morfológicas são acompanhadas por um aumento no volume mitocondrial, expansão da membrana basolateral das células contornadas distais, e dos túbulos de conexão e, das células principais do túbulo distal (Kaissling e Stanton, 1988), além de uma elevação da atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ no túbulo contornado distal e no ducto coletor cortical (Sherzer *et al.*, 1987). Estas alterações morfológicas e funcionais induzidas pelo tratamento crônico de furosemida por sete dias são associadas à elevação do aporte de Na^+ aos segmentos distais do néfron. Devido ao fato de que essas alterações ocorram na presença de níveis plasmáticos normais de aldosterona, glucocorticóide e vasopressina, a elevação do aporte distal de Na^+ foi responsável pelas alterações tubulares distais adaptativas crônicas (Kaissling e Stanton, 1988; e Stanton e Kaissling, 1988).

Chen *et al.* (1990) demonstraram que furosemida administrado continuamente em ratos aumentou em 100% a densidade de sítios tubulares distais de ligação para H-metolazone. A hipertrofia tubular distal ocorreu paralelamente à elevação do transporte de NaCl nos segmentos tiazídico-sensíveis em ratos tratados cronicamente com furosemida (Ellison *et al.*, 1989). Estes dois estudos sugerem que durante a administração crônica de furosemida uma quantidade elevada de NaCl pode ser reabsorvida em segmentos distais sensíveis a tiazídicos.

Estudo de Kobayashi *et al.* (1995) em ratos tratados com furosemida 12 mg/dia/rato por seis dias sugere o envolvimento do fator de crescimento insulín-simile (IGF-1) e da proteína ligante do IGF-1 (IGFBP-1) no processo de indução da hipertrofia tubular distal associada à diurese e natriurese induzidas pelos diuréticos de alça.

As alterações morfofuncionais tubulares distais adaptativas ao aumento do aporte de Na^+ e a elevação da reabsorção de NaCl nos segmentos distais

sensíveis a tiazídicos, durante a administração crônica de furosemida, poderiam explicar a atenuação da resposta natriurética induzida pelo furosemida nos segmentos pós-proximais, observada no nosso estudo, durante o bloqueio de receptores AT1. Logo, esses mecanismos poderiam ser, pelo menos em parte, os possíveis mecanismos compensatórios de reabsorção sódica distal independentes do SRAA, observados neste estudo.

5.1. 2 Animais diabéticos

5.1. 2.1 Glicemia:

Os resultados do presente estudo mostraram que: 1) o tratamento com losartan por sete dias não interfere nos níveis glicêmicos induzidos pela estreptozotocina, 2) furosemida eleva a hiperglicemia na diabetes experimental e 3) losartan atenua a elevação glicêmica após a administração aguda e crônica de furosemida.

Estudos prévios de Remuzzi *et al.* (1993) e Anderson *et al.* (1993) confirmam nosso estudo, mostrando que o tratamento com losartan não influencia nos níveis glicêmicos de animais diabéticos experimentais, em situações basais.

A hiperglicemia induzida pela administração de furosemida tem sido observada em modelos experimentais. Em animais e humanos normais, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito diabetogênico do diurético: 1) liberação secundária de catecolaminas adrenais promovendo a glicogenólise e a hiperglicemia (Aynsley-Green e Albertei 1973; e Foy e Furman, 1973); 2) decréscimo da taxa de utilização de glicose devido à inibição da atividade das enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase, e piruvato-quinase) pelo furosemida em tecido músculo-esquelético e fígado (Dimitriadis *et al.*, 1993); 3)

diminuição do transporte de glicose na presença de níveis elevados de insulina decorrente da inativação do transportador de glicose GLUT4 em músculo-esquelético por furosemida, promovendo o desenvolvimento da resistência tecidual periférica à insulina (Dimitriadis *et al.*, 1998) e 4) diminuição dos níveis séricos de insulina durante a administração aguda de furosemida (Ray *et al.*, 1993).

Por outro lado, estudo de hepatócitos *in vitro* mostra que a All estimula a gliconeogênese, sendo esse mecanismo dependente de Ca^{2+} (Whitton *et al.*, 1978). Rao (1996) mostrou que administração exógena de doses pressoras de All (50 ng/kg/min), em ratos, aumenta a produção de glicose no fígado, via receptores AT1, e que pode antagonizar a ação de insulina sobre o metabolismo hepático de glicose. Em hepatócitos, angiotensina II liga-se a receptores AT1 e induz transdução de sinais através do *turnover* de fosfoinositol e mobilização de Ca^{2+} citosólico (Garcia-Sainz *et al.* 1995), ativando fosforilases e a adenil-ciclase, e deste modo promovendo glicogenólise. Recentemente, Machado *et al.* (1998) demonstraram, em ratos, que a administração endovenosa de angiotensina II produz hiperglicemia, e esta é completamente abolida por losartan (DuP 753), sugerindo que essa resposta é decorrente da ação de All, via AT1, em hepatócitos e sistema adrenomedular simpático. Logo esses dois últimos trabalhos sugerem que All endógena pode ter um papel relevante no metabolismo da glicose. Nossos resultados mostraram claramente que a elevação do nível glicêmico induzido pela administração aguda e crônica de furosemida, nos animais diabéticos, foi atenuada por losartan, sugerindo um possível envolvimento de All no metabolismo da glicose na diabetes experimental, durante a administração desse diurético.

5.1.2.2 Pressão arterial caudal

O resultado do presente estudo mostra que em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, losartan 10 mg/kg/dia tem um efeito hipotensor somente no 13º dia de tratamento; todavia, perde sua eficácia hipotensora após a

administração crônica de furosemida. Remuzzi *et al.* (1993), estudando ratos Sprague-Dawley após quatro a seis semanas de indução de diabetes, obtiveram também a queda da hipertensão arterial sistólica com dose 30-35 mg/kg/dia de losartan. Nossos dados sugerem que a dose utilizada (losartan 10mg/kg/dia) bloqueia o receptor AT1 e reduz a longo prazo a pressão sangüínea; entretanto, durante a administração de furosemida, que segundos relatos, ativa o sistema renina-angiotensina, essa dose perde sua eficácia.

5.1.2.3 Função renal

Evidências recentes comprovam alterações na manipulação tubular de sódio e dos componentes do sistema renina-angiotensina tecidual durante a evolução da diabetes experimental (Cassis, 1993; Anderson *et al.*, 1993; e Brown *et al.*, 1997). Brown *et al.* (1997) demonstraram que SRA intra-renal está estimulado na diabetes, e conseqüentemente a sua atividade, apesar da redução da densidade de receptores AT1 renais.

Nossos resultados mostram que o bloqueio de receptores AT1 na primeira semana (7º dia de tratamento) e segunda semana após a indução da diabetes não influenciou na taxa de filtração glomerular e na fração de excreção de sódio. Resultados controversos sobre a resposta da hemodinâmica glomerular ao bloqueio de receptores AT1 têm sido documentados. Anderson *et al.* (1993) demonstraram, em estudo de micropunção glomerular em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (seis a oito semanas de diabetes), que o bloqueio de AT1 pela administração aguda e crônica de losartan (duas a três semanas) não altera a hiperfiltração (filtração glomerular elevada) e a hiperfusão glomerular; todavia, controlam a hipertensão capilar glomerular por diminuir a resistência arterial eferente e total e aumentarem o coeficiente de ultrafiltração glomerular. Inversamente, estudo funcional de Remuzzi *et al.* (1993), em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina com quatro a seis semanas de doença, mostra que

a administração de losartan 30-35 mg/kg/dia preveniu a hiperfiltração, a elevação do fluxo plasmático renal e da fração de filtração.

No presente estudo, o efeito de losartan sobre a manipulação tubular de sódio foi avaliado por técnica de *clearance* global ou seja *clearance* de creatinina e lítio utilizados como indicadores da filtração glomerular e do aporte distal de sódio. Nenhuma alteração da $FENa^+$, da $FEPNa^+$ e da $FEPPNa^+$ em nossos resultados foi observada durante o bloqueio de AT1 por sete dias. Evidências prévias mostram que a reabsorção proximal de sódio está elevada na *diabetes mellitus* (Pollock *et al.*, 1991); e sabe-se que AII estimula diretamente o transporte tubular proximal de sódio por aumentar a atividade de trocador Na^+/H^+ e da $Na^+/K^+/ATPase$ (Férraille e Doucet, 2001). O fato de losartan não ter modificado a $FEPNa^+$ e $FENa^+$ sugere que outros mecanismos independentes de AII possam estar participando de forma significativa da reabsorção proximal de sódio na diabetes experimental, tais como: 1) elevação do co-transporte Na^+ -glicose (Pollock *et al.*, 1991) e 2) o aumento da atividade do trocador Na^+/H^+ devido a elevação de níveis de corticóides e diminuição do pH (El-Seifi *et al.*, 1987). Anderson *et al.* (1993) aventaram a hipótese de que a diminuição da atividade da enzima conversora de angiotensina em túbulo proximal, e conseqüentemente da formação de AII local, observada em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina pode ser responsável pela ausência de efeito tubular (excreção urinária de sódio), durante o antagonismo de AT1 por losartan.

Nossos resultados mostraram que, em animais diabéticos, furosemida administrado agudamente e sem reposição das perdas urinárias causa uma elevação do volume urinário, uma diminuição da taxa de filtração glomerular (Ccr) e a elevação da natriurese (CNa^+ e $FENa^+$) como conseqüência de uma elevação da $FEPNa^+$ e da $FEPPNa^+$. Evidências prévias suportam nossos resultados. O efeito diurético e natriurético de furosemida resulta de seu efeito inibitório sobre a reabsorção tubular proximal (Christensen *et al.*, 1986) e da inibição do co-transporte de $Na^+/K^+/CL^{-2}$, em alça espessa de Henle (Martinez-Maldonado e Hector, 1990). Nossos estudos sugerem que a queda da filtração glomerular pode ser decorrente principalmente de uma redução na volemia induzida pelo diurético,

uma vez que em resultados prévios em ratos normais, cujas perdas urinárias induzidas por furosemida foram repostas a filtração glomerular manteve-se inalterada (Tucker e Blantz, 1984).

A queda da filtração glomerular e o decréscimo observado na resposta diurética à administração aguda de furosemida em ratos diabéticos tratados com losartan parece ser resultante de uma hipovolemia mais acentuada nestes animais, desenvolvida por um menor estímulo central da sede associada à diurese osmótica. AII estimula a ingestão hídrica em áreas do sistema nervoso central (Fitzsimons, 1997).

Losartan elevou a $FEPNa^+$, todavia, a resposta natriurética ao furosemida manteve-se inalterada, pois a rejeição de íon sódio pelo túbulo proximal foi compensada por uma maior reabsorção desse íon nos segmentos distais do néfron.

Furosemida eleva a atividade da renina plasmática e AII (Fujimara e Ebihara, 1988). Sabe-se também que uma diminuição da densidade de receptores AT1 (*dowregulation*) renal ocorre na diabetes (Brown *et al.*, 1997). Logo, a elevação da $FEPNa^+$, em nosso estudo, sugere que houve uma sensibilidade tubular elevada ao aumento de AII sérica, induzida provavelmente pela administração aguda de furosemida e que o bloqueio de receptores AT1 promoveu diminuição adicional compensatória da reabsorção tubular proximal. Neste sentido, nossos estudos são consistentes com o papel mediador de AII sobre a reabsorção tubular proximal de sódio durante a administração aguda de furosemida.

Observamos que o bloqueio de AT1 causou uma elevação da taxa de filtração glomerular associada a uma diminuição da resposta diurética e natriurética, durante o tratamento crônico de furosemida. Em nosso estudo, esta elevação da taxa de filtração glomerular sugere que o bloqueio de AT1 promoveu uma vasodilatação maior em arteríolas aferentes e elevando conseqüentemente a pressão hidráulica e a pressão efetiva de ultrafiltração glomerular. O aumento da superfície de ultrafiltração, em razão de um relaxamento das células mesangiais, induzida por losartan, também poderia estar contribuindo para uma elevação do

coeficiente de ultrafiltração, que é considerado um importante determinante da permeabilidade seletiva glomerular.

Evidências prévias mostraram uma maior sensibilidade vascular glomerular à angiotensina na diabetes. Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (seis semanas), Kennefick *et al.* (1996) verificaram que a infusão venosa de angiotensina I ($0,166 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) e angiotensina II ($0,2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) diminuíram o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular. Esses pesquisadores postularam que esta sensibilidade vascular aumentada à infusão de angiotensina se deve a uma maior conversão de angiotensina I a angiotensina II nestes sítios. Estudos prévios mostram uma ativação do sistema renina-angiotensina renal demonstrada pela elevação de RNAm para renina e angiotensinogênio; uma redistribuição da ECA para glomérulo e vasos glomerulares; e uma diminuição em túbulo proximal (Andersen *et al.*, 1993). Esta *upregulation* do SRA renal em diabéticos poderia contribuir para uma maior formação de All intraglomerular e conseqüentemente para uma resposta vascular aumentada à All nestes animais. Assim, a elevação da sensibilidade glomerular à All observada na diabetes poderia justificar o aumento da taxa de filtração glomerular, observada em nosso estudo, durante o bloqueio de AT1 e do tratamento crônico com furosemida.

Nossos resultados mostram uma resposta antinatriurética, principalmente em segmento proximal, associada à elevação da taxa de filtração glomerular durante a administração crônica de furosemida e de losartan. Em ratos diabéticos que apresentam elevação da filtração glomerular (hiperfiltração glomerular) ocorre elevação da reabsorção tubular proximal Na^+ devido ao aumento do co-transporte Na^+ -glicose na borda luminal (Vallon, 1999) e da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ em membrana basolateral (Wald *et al.*, 1993). Körner *et al.* (1994) também demonstraram que a elevação da filtração glomerular está relacionada ao aumento da reabsorção tubular de Na^+ e ao consumo de oxigênio renal. Bank e Aynedjian (1990) demonstraram que o aumento de glicose luminal estimula absorção de sódio proximal em ratos diabéticos, via co-transporte Na^+ -glicose. Adicionalmente, Wald *et al.* (1993) sugeriram que a carga filtrada de glicose e a ativação do co-transporte de Na^+ -glicose são fatores determinantes da atividade

da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ em túbulo proximal. Sabe-se que a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ tem um papel preponderante na reabsorção tubular proximal de sódio. Esta enzima, ao transportar ativamente, através da membrana basolateral, 3 Na^+ para o interstício e 2 K^+ para o espaço intracelular, cria um gradiente eletroquímico que favorece a entrada de Na^+ na célula através de vários co-transportes e contratransportes luminiais.

Com base nessas evidências descritas acima, nossos resultados sugerem a hipótese de que a elevação da filtração glomerular induzida pelo bloqueio de AT1 aumentaria a carga filtrada de glicose e sódio, estimulando a atividade de co-transporte de Na^+ -glicose luminal e da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ basolateral, com conseqüente aumento da reabsorção tubular proximal de sódio.

Observamos uma dissociação entre a queda da FEPNa^+ e a ausência de alteração do CLi^+ , durante o bloqueio de AT1 e o tratamento crônico de furosemida. Este fenômeno poderia estar implicado: 1) a elevação da taxa de filtração glomerular favorecendo o aumento da carga filtrada de glicose e a elevação da osmolaridade intraluminal, contribuindo assim para uma dissociação entre as taxas de reabsorção Na^+ proximal e da reabsorção proximal de Li^+ e de água; 2) uma elevação concomitante e mais acentuada do Ccr, fazendo com que a razão CLi^+/Ccr tendesse à queda; e 3) a ausência de afinidade do Li^+ pelo co-transportador Na^+ -glicose.

Losartan decresceu a caliurese induzida pelo tratamento crônico com furosemida, que ocorreu paralelamente à diminuição da FEPNa^+ . Mecanismos que regulam a excreção de potássio em segmentos distais do néfron, tais como o aporte distal elevado de Na^+ , o elevado fluxo intraluminal e o maior aporte de ânions aos segmentos distais, poderiam explicar este resultado, apesar de não terem sido avaliados em nosso experimento.

Sabe-se que a secreção de potássio ocorre através das células principais, através do transporte ativo desse íon pela $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, situada na membrana basolateral; e a sua difusão passiva a favor de um gradiente eletroquímico através da membrana apical. Assim, a concentração elevada de Na^+ no lúmen tubular favorece uma difusão eletroquímica K^+ para dentro do lúmen. Inversamente, as

concentrações baixas de Na^+ na luz tubular, reduzem a secreção de K^+ por causar hiperpolarização da membrana apical. Além disso, a elevada concentração intracelular de Na^+ estimula a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, que por sua vez aumenta a captação de K^+ intracelular, favorecendo sua difusão através da membrana apical (Stanton e Giebisch, 1992).

Estudos prévios em segmentos distais mostram que a secreção de K^+ é dependente do fluxo intratubular de fluido. Assim, o aumento do fluxo intraluminal de fluido estimula a secreção K^+ devido a uma dissipação rápida da concentração luminal desse íon, favorecendo conseqüentemente a sua secreção intratubular (Malnic *et al.*, 1989; e Giedeisch, 1997)

Com base nos mecanismos descritos acima, nossos resultados aventam a hipótese de que o aumento da reabsorção proximal (decréscimo da FEPNa^+) diminuiu a carga de Na^+ e o fluxo intratubular de fluido em segmentos distais (apesar da inibição do cotransporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ em alça espessa de Henle induzida por furosemida), contribuindo assim para uma diminuição da caliurese, observada nos ratos diabéticos tratados com bloqueador de receptores AT1 .

Nossos resultados mostraram que na *diabetes mellitus* experimental, AII tem um papel importante no controle da hemodinâmica glomerular, durante tratamento crônico com furosemida; todavia, mecanismos independentes de AII influenciam na manipulação tubular proximal de sódio, promovendo uma resposta antinatriurética ao diurético de alça.

5.2 Efeito da denervação renal bilateral sobre a excreção renal de sódio e a pressão arterial em animais tratados aguda e cronicamente com furosemida

O rim tem capacidades neurosensoriais aferentes ao sistema nervoso central (DiBona e Kopp, 1997). Os mecanorreceptores e os quimiorreceptores renais enviam informações sensoriais ao sistema nervoso central através de nervos renais aferentes. Essas informações sensoriais influenciam as respostas endócrinas e a descarga simpática central, com profundo efeito sobre o controle da circulação sistêmica e da função excretória renal.

5.2.1 Animais-controle

5.2.1.1 Pressão arterial

Nosso estudo mostra uma significativa queda da pressão arterial caudal entre o 6° e o 20° dia pós-denervação renal bilateral. Yoshida *et al.* (1995) relataram também um efeito hipotensor sistólico em ratos Wistar Kyoto, normotensos, submetidos à denervação renal bilateral, associado à diminuição do nível plasmático de epinefrina. Estes autores aventaram a possibilidade de que tal efeito fosse decorrente de uma provável injúria da medula adrenal durante o procedimento cirúrgico. Em nosso experimento, o nível plasmático de epinefrina não foi dosado, porém a resposta hipotensora pode estar associada, pelo menos em parte, à natriurese verificada durante os *clearances* de sódio no 7° e 21° dias de experimento.

5.2.1.2 Função renal

Nosso estudo mostrou que a denervação renal bilateral (7º dia pós-operatório) promoveu uma elevação da taxa de filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina. Concomitante à elevação da taxa de filtração glomerular, observamos uma natriurese, estimada pela elevação *clearance* de Na^+ . Pelo fato de não serem verificadas alterações na FEPNa^+ e FEPPNa^+ , nossos dados sugerem que a natriurese foi resultante de alterações hemodinâmicas glomerulares, e não devido à manipulação tubular renal de Na^+ .

Os nervos renais simpáticos inervam extensivamente componentes vasculares e tubulares renais (DiBona e Koppa, 1997). Em ratos, a vasoconstrição glomerular aferente e eferente são mediadas por receptor α_1 adrenérgico (Yuan *et al.* 1990). Norepinefrina, liberada da terminação nervosa simpática e epinefrina secretada pela medula adrenal causam vasoconstrição através do estímulo de receptores α_1 adrenérgicos. As modificações da resistência arteriolar aferente e eferente são mediadas por alterações humorais que modulam a taxa de filtração glomerular. Nossos experimentos sugerem que a denervação renal bilateral causa uma perda do tônus vasoconstrictor simpático, promovendo uma vasodilatação arteriolar aferente, elevando o fluxo plasmático sanguíneo e a pressão de ultrafiltração e a pressão hidrostática peritubular. Também, um aumento da área de ultrafiltração glomerular após a denervação simpática glomerular poderia contribuir com a elevação da taxa de filtração glomerular. Fan *et al.* (1994) já haviam demonstrado, em carneiros, que a denervação renal bilateral eleva o fluxo sanguíneo renal com pressão de perfusão renal normal, todavia sem alteração da taxa de filtração glomerular.

A inervação simpática do túbulo proximal, da alça ascendente espessa de Henle, do túbulo distal contornado e do túbulo conector distal foi revisada recentemente por DiBona e Koppa (1997). A atividade nervosa renal influencia diretamente a reabsorção tubular de sódio e água, uma vez que a denervação renal diminuiu a reabsorção tubular proximal de sódio e água (Abildgaard *et al.*

1986) provavelmente devido à diminuição da atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ em túbulo proximal (Ohtomo *et al.*, 1994).

Nossos resultados não confirmaram alterações na reabsorção tubular de sódio após denervação renal crônica (7º dia pós-operatório), mas revelaram que a natriurese (elevação do CNa^+) foi exclusivamente resultante da elevação da taxa de filtração glomerular. Desse modo, o presente estudo sugere a importância dos nervos renais no controle salino, modulando a taxa de filtração glomerular em animais normais.

Furosemida ativa reflexamente a atividade nervosa renal eferente simpática (ERSNA) em ratos vigis e anestesiados (DiBona e Sawin, 1985; e Petersen e DiBona, 1994). Essa ativação reflexa pode ser decorrente de uma depleção volêmica, dependente ou independente. Como consequência principal, altas doses de furosemida causam hipovolemia decorrente de uma elevação da diurese e natriurese. A resposta humoral e autonômica simpática à hipovolemia é provavelmente devido a vários mecanismos tais como: 1) aferência nervosa de barorreceptores arteriais (quando a hipotensão ocorre associada com a hipovolemia), 2) aferência nervosa de receptores de volume cárdiopulmonares, 3) aferência de receptores sensoriais renais e 4) ativação de sistemas humorais tais como: renina-angiotensina, vasopressina e catecolaminas (Fitch e Weiss, 2000). DiBona e Sawin (1985) demonstraram que uma elevação da atividade simpática neural renal está associada a um decréscimo da pressão do átrio direito, após a administração de furosemida em ratos acordados. Devido à ausência de alteração da pressão arterial média no estudo, foi sugerido que hipovolemia induzida por furosemida conduziu uma elevação reflexa da atividade simpática renal por estimulação de barorreceptores cárdiopulmonares de baixa pressão. Estudos de Fitch e Weiss (2000) e Fitch *et al.* (2000), utilizando a expressão gênica de c-fos como um indicador de ativação neuronal, demonstraram que furosemida ativa neurônios do sistema nervoso central através de nervos renais aferentes (via direta) e da ativação do sistema renina-angiotensina (via indireta). Genovesi *et al.* (1993) demonstraram também que furosemida estimula a atividade nervosa aferente renal e que a resposta simpático-excitatória imediata à administração

endovenosa de furosemida pode ser mediada pelo reflexo reno-renal elicitado por alterações na pressão pélvica e intra-renal e/ou alterações na composição urinária. Tem sido demonstrado que furosemida estimula síntese de prostaglandinas e bradicininas renais (Weimer *et al.*, 1994), que são potentes estimuladores da atividade nervosa aferente renal (Koop e Smith, 1993). Com base nos estudos relatados anteriormente, a administração de furosemida sem reposição das perdas urinárias pode ter estimulado a atividade aferente e eferente renal em nosso experimento.

A administração aguda de furosemida causa uma poliúria e natriurese como consequência de uma inibição do co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{CL}^-$ na membrana apical do segmento espesso da alça de Henle (Martinez-Maldonado e Hector, 1990). Também um efeito inibitório de reabsorção tubular proximal de fluido e sódio pelo furosemida, em animais sem reposição volêmica, foi relatado em estudos prévios de Christensen *et al.* (1986) e Petersen *et al.* (1991)

Uma queda na taxa de filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina, pode estar relacionada a fatores que modificam a pressão e o coeficiente de ultrafiltração glomerular, tais como: 1) modificações na hemodinâmica glomerular promovidas por vasoconstrição renal aferente e eferente, ou ambas; 2) diminuição da área de superfície de absorção glomerular; 3) alterações das forças de Starling; e 4) alterações da volemia. Estudos prévios confirmam nossos resultados. Tucker e Blantz (1984) e Christensen *et al.* (1986) demonstraram por estudos de micropunção e *clearance* global que o efeito de furosemida sobre a taxa de filtração glomerular depende do estado volêmico dos animais. Nos animais, cujas perdas urinárias não foram repostas, observou-se uma queda da filtração glomerular. Tenstad e Williamson (1995) demonstraram também que a redução da filtração glomerular induzida por furosemida ocorreu homogeneamente em todo o córtex renal.

A furosemida estimula a elevação sérica de vários hormônios que podem influenciar a hemodinâmica glomerular, tais como renina plasmática e consequentemente Angiotensina II, catecolaminas séricas e vasopressina (Petersen e DiBona, 1995, e Petersen *et al.*, 1992). Janssen *et al.* (1994), em ratos acordados,

demonstraram que a resposta vasoconstritora renal, a elevação da resistência arteriolar renal e a diminuição do fluxo sanguíneo renal observadas após 60 minutos da administração de furosemida 8 mg/kg, sem reposição volêmica das perdas urinárias, foram mediadas por receptores AT1 sem alterações significantes da pressão arterial. Esses pesquisadores também estudaram o possível envolvimento dos nervos renais na elevação da resistência arteriolar renal ao furosemida, em ratos com um rim intacto em relação ao rim denervado contralateral, e verificaram que a denervação renal não altera a resposta vasoconstritora renal induzida por furosemida.

Em ratos, administração aguda de furosemida promove elevação de 50% dos níveis séricos de noradrenalina e 70% de adrenalina após três horas de sua administração (Petersen *et al.*, 1992). Todavia, a queda da filtração glomerular, em nosso estudo, foi avaliada somente uma hora após administração do diurético, o que poderia justificar a ausência de modificações da filtração glomerular e a improvável elevação da atividade nervosa simpática sistêmica modulando a hemodinâmica glomerular.

A atividade neural simpática tem sido relacionada com a reabsorção tubular proximal de sódio durante a depleção volêmica induzida por furosemida. Em nosso estudo, a denervação renal não modificou o volume urinário, nem a manipulação tubular segmentar de Na^+ (FEPNa^+ e FEPPNa^+) em todos os períodos experimentais após a administração aguda de furosemida. Estes resultados são contrários aos observados por Petersen *et al.*, (1991), que utilizaram também a técnica de *clearance* de Li^+ , em ratas, submetidas à denervação farmacológica induzida por guanetidina. Estes autores demonstraram que a atividade neural renal estimula a reabsorção tubular proximal de Na^+ após a depleção volêmica induzida por furosemida, a despeito de uma inalterada hemodinâmica glomerular. Verificaram também que a denervação farmacológica atenuou a resposta natriurética proximal e elevou a reabsorção pós-proximal, mantendo inalterada a natriurese durante infusão intravenosa de furosemida 7,5 mg/kg. Estas diferenças em relação aos nossos resultados podem ser atribuídas a dois fatores importantes: 1) aos diferentes desenhos experimentais utilizados e 2)

à variabilidade evidenciada no *clearance* de lítio, de tal forma que esta aboliu a significância de análise estatística em nosso estudo. Em relação às diferenças no desenho, podemos enumerar : 1) a diferença de gênero dos animais, uma vez que os ciclos de oostros modificam a função renal e o balanço hidrossalino (Forsling *et al.*, 1996); 2) a diferença entre os tempos experimentais durante o *clearance* de lítio; 3) a via intravenosa de administração e a solução-veículo utilizadas, solução hipotônica (NaCL 30 mM e glicose 60 mM); sendo que, em nosso estudo, utilizamos a via oral (por gavagem) e a administração da água como o veículo para promover um adequado volume urinário; e 4) o tipo de denervação; enquanto Petersen *et al.* (1991) utilizaram a denervação farmacológica com guanetidina, nós utilizamos a denervação mecânica e química.

Smith *et al.* (1996) estudaram em carneiros recém-nascidos o papel dos nervos renais sobre a resposta renal e endócrina à administração aguda do furosemida (2 mg/kg). Estes autores verificaram que a denervação renal bilateral crônica não modificou a queda da taxa de filtração glomerular e o incremento do volume urinário, da natriurese e da atividade da renina plasmática. Entretanto, observaram uma elevação significativa de aldosterona sérica pré e pós-furosemida associada à hiperpotassemia. Eles especulam que, na ausência da inervação renal, a aldosterona poderia atuar compensatoriamente na regulação da homeostasia hidrossalina.

Como já relatado anteriormente, a administração crônica de furosemida estimula uma resposta antidiurética e antinatriurética compensatória (Ellinson, 1991). Utilizando o *clearance* de Li^+ como marcador da manipulação tubular proximal de sódio, Christensen *et al.* (1986) e Petersen *et al.* (1991) observaram que na administração aguda de furosemida, sem reposição das perdas volêmicas, ocorre ativação de mecanismos antinatriuréticos compensatórios em segmentos proximais e pós-proximais do néfron, a partir de 15-30 minutos após a administração do diurético de alça.

Nosso estudo mostrou claramente uma resposta antinatriurética compensatória à administração de furosemida após o tratamento crônico por seis dias, atuando ativamente em segmentos pós-proximais do néfron. Tem sido

demonstrado que furosemida administrado cronicamente induz a hipertrofia e hiperplasia celular em segmentos distais do néfron, relacionadas a uma elevação do aporte de Na^+ a estes segmentos e de fatores de crescimento e à elevação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e da reabsorção de NaCl nos segmentos distais sensíveis a tiazídicos (Kaissling e Stanton, (1988); Stanton e Kaissling (1988); Kobayashi *et al.* (1995); e Chen *et al.* (1990). Esses mecanismos poderiam explicar a resposta antinatriurética induzida pela administração crônica de furosemida. No presente estudo observamos que a denervação renal bilateral atenuou esta resposta antinatriurética compensatória. A elevação do CNa^+ observada após o tratamento crônico de furosemida pode ser explicada por uma elevação da filtração glomerular provavelmente devida à perda do tônus simpático glomerular e a uma elevação de síntese de prostaglandinas renais induzidas por furosemida (Fujimara *et al.* 1994), que aumentaria a rejeição tubular pós-proximal de sódio.

O sistema ciclooxygenase é a mais importante via de metabolização do ácido araquidônico no rim. As isoformas de ciclooxygenase 1 e 2 metabolizam o ácido araquidônico gerando prostaglandinas vasodilatadoras (PGE_2 , PGI_2 e PGF_2) e vasoconstritoras (tromboxane A_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$), que têm um papel importante na regulação do tônus vascular renal, da filtração glomerular e de mecanismos reabsortivos tubulares (Navar *et al.* 1996).

Chatziantoniou e Arendshorst (1992) demonstraram em ratos que a administração intra-renal de PGE_2 e PGI_2 causa vasodilatação renal e atenua o efeito vasoconstritor de angiotensina II, noradrenalina e tromboxane A_2 , sugerindo assim a importância dessas prostaglandinas modulando o tônus vascular renal na presença de substâncias vasoconstritoras. Do mesmo modo, um relaxamento das células mesangiais e o aumento do espaço de filtração elicitada pela PGE_2 atenuando a ação local de angiotensina II (Navar *et al.*, 1996).

Evidências prévias demonstraram a participação de prostaglandinas sobre a taxa de filtração glomerular contra-regulando a ação do sistema renina-angiotensina e da atividade adrenérgica. Turull *et al.* (2001), estudando ratos hipovolêmicos induzidos por furosemida (12 mg/dia por cinco dias) e tratados com

inibidor seletivo de ciclooxigenase-2 (flusolide) e de ciclooxigenases (indomecetina), mostraram uma redução da fluxo plasmático e da taxa de filtração glomerular renal, suportando a hipótese de que a inibição da ciclooxigenase-2 e conseqüente decréscimo da síntese de prostaglandina ($\text{PGF1}\alpha$) produziriam uma vasoconstrição de arteríolas aferentes renais, reduzindo o fluxo plasmático e a filtração glomerular renal.

Estudos prévios mostrando a elevação da produção de prostaglandinas renais após o tratamento com furosemida têm sido apresentados. Fujimaira e Ebihara (1988) demonstraram que furosemida eleva concomitantemente a concentração plasmática de All e a excreção urinária de PGE_2 em humanos 60 minutos após a administração intravenosa deste diurético. Fujimara *et al.* (1994) mostraram que o efeito de furosemida sobre a produção da PGE_2 é mediada pela ativação de receptores AT1. Kammerl *et al.* (2001) verificaram que ratos tratados com furosemida 12 mg/kg por cinco dias, apresentam elevação da atividade da renina plasmática, de RNAm de renina e de ciclooxigenase-2 renal, e da produção de PGE_2 , $\text{PGF1}\alpha$ e tromboxane B_2 . Essas observações mostram que em estado hipovolêmico a liberação de angiotensina II causa ativação da fosfolipase C e A_2 mediada por receptores AT1 e libera ácido araquidônico, que em tecido vascular renal é convertido em prostaglandinas renais, com efeitos parácrinas que podem atenuar, em parte, a vasoconstrição aferente (Turull *et al.*, 2001) e a contração mesangial induzidas por All (Navar *et al.*, 1996). Resumidamente, o aumento da síntese de prostaglandinas vasodilatadoras renais, na presença de substâncias vasoconstritoras, pode auxiliar a preservação da taxa de filtração glomerular através de três mecanismos: 1) diminuição da resistência vascular renal, 2) relaxamento das células mesangiais, e aumentando a área e o coeficiente de ultrafiltração (K_f), e 3) modulação da secreção de renina.

Logo, nossos dados sugerem a importância da atividade nervosa renal no controle da homeostasia sódica, durante a administração crônica de furosemida, atuando na hemodinâmica glomerular e influenciando a reabsorção tubular pós-proximal de sódio.

Petersen e DiBona (1992) estudaram a resposta natriurética ao tratamento crônico de furosemida (por cinco dias) em ratos normais submetidos à dieta hipossódica e à denervação renal bilateral. Usando a técnica de *clearance* de lítio para avaliar a manipulação proximal de sódio e amiloride para inibir a reabsorção de sódio nos segmentos pós-proximais, esses pesquisadores demonstraram que os nervos renais não são essenciais para a resposta compensatória tubular reabsortiva de sódio, observada durante a administração crônica de furosemida. Pelo fato de a manipulação renal de lítio manter-se inalterada, estes autores demonstraram não haver reabsorção de lítio nos segmentos do néfron sensíveis à amiloride.

A divergência entre nosso estudo e o de Peterson e DiBona (1992) pode estar relacionada ao tipo de protocolo experimental usado. As diferenças entre estes protocolos relacionam-se: 1) ao tipo de dieta oferecida aos animais; 2) ao tipo e à via de administração da solução utilizados para a produção de diurese durante o *clearance* (dextrose a 5%); 3) à via de administração do diurético durante o *clearance* de lítio; 4) ao tipo de alojamento dos ratos em caixas individuais, que difere das gaiolas coletivas (com capacidade máxima de cinco ratos) utilizadas em nosso experimento; e 5) ao tempo de duração do *clearance* maior (180 minutos) utilizado por aqueles pesquisadores.

Concluindo, nossos estudos sugerem a importância da atividade nervosa renal no controle da homeostasia sódica, durante a administração crônica de furosemida, atuando principalmente sobre a hemodinâmica glomerular.

5.2.2 Animais diabéticos

5.2.2.1 Glicemia

Nosso resultado mostrou que o tratamento agudo e crônico com furosemida causa elevação da glicemia na diabetes experimental e que a denervação renal bilateral não modifica essa situação.

A hiperglicemia induzida por furosemida tem sido observada em modelos experimentais. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito diabetogênico deste diurético: 1) liberação secundária de catecolaminas adrenais, promovendo a glicogenólise e hiperglicemia (Aynsley-Green e Albertei, 1973, e Foy e Furman, 1973); 2) decréscimo da taxa de utilização de glicose devido à inibição da atividade das enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase) pela furosemida em tecido músculo-esquelético e fígado (Dimitriadis *et al.*, 1993); 3) diminuição do transporte de glicose na presença de níveis elevados de insulina decorrente da inativação do transportador de glicose GLUT4 em músculo-esquelético, promovendo o desenvolvimento da resistência tecidual periférica à insulina (Dimitriadis *et al.*, 1998); e 4) diminuição dos níveis séricos de insulina durante a administração aguda de furosemida (Ray *et al.*, 1993).

5.2.2.2 Pressão arterial

Nossos estudos mostraram que a denervação renal bilateral causou uma queda da pressão arterial caudal nos 6º e 20º dias em animais diabéticos. Yoshida *et al.* (1995) relataram também um efeito hipotensor sistólico em ratos normais Wistar Kyoto, normotensos, submetidos à denervação renal bilateral, que foi associado à diminuição do nível plasmático de epinefrina decorrente de

provável injúria da medula adrenal durante o procedimento cirúrgico. Em nosso experimento, o nível plasmático de epinefrina não foi dosado, assim como não se observou uma natriurese de denervação. Desse modo, os possíveis mecanismos hipotensores da denervação renal não ficaram claros em nossos estudos.

5.2.2.3 Função renal

O principal achado durante esta fase do presente estudo mostra que a denervação renal bilateral causa uma menor resposta natriurética à administração aguda de furosemida e que este efeito sobre a excreção de sódio é atenuado após o tratamento diurético crônico. Esta atenuada ação natriurética aguda foi acompanhada por uma total ausência de alteração na filtração glomerular, como previamente havíamos demonstrado para animais-controle normais (*sham*). Também comprovamos que esta menor resposta natriurética induzida agudamente foi causada, em predominância, por uma diminuição da reabsorção de sódio nos segmentos pós-proximais do néfron. Outra interessante observação do presente estudo mostra que durante as três semanas de acompanhamento ocorre uma progressiva e significativa elevação da pressão arterial nos animais diabéticos. Esta elevação pressórica foi totalmente abolida pela denervação renal bilateral nestes animais.

Os resultados funcionais renais obtidos após sete dias de tratamento dos animais diabéticos com furosemida não apresentaram diferenças significativas com àqueles observados previamente a qualquer tratamento, seja agudo ou crônico, sugerindo que o efeito renal deste diurético foi completamente compensado durante o estudo. Este resultado não necessariamente significa uma perda de resposta ao furosemida uma vez que persistiu o efeito hipotensor desta droga durante todo o período avaliado.

Como vimos, após o tratamento crônico com diuréticos, a natriurese induzida por este é geralmente de curta duração. Os resultados prévios do presente trabalho evidenciaram que as depleções de volume induzidas pelos diuréticos de alça promovem a ativação de mecanismos compensatórios que estimulam a retenção tubular renal de sódio nos segmentos proximais e pós-proximais do néfron. Esta reabsorção compensatória de sódio atenuou significativamente a perda renal deste íon, no entanto, os mecanismos intrínsecos deste fenômeno são ainda pouco entendidos em animais normais e no homem e praticamente desconhecidos em modelos experimentais de *diabetes mellitus*.

Muitos trabalhos têm mostrado a participação da atividade neural renal e do sistema renina-angiotensina-aldosterona neste fenômeno compensatório, embora, a despeito do aumento dos níveis séricos de noradrenalina, angiotensina II e aldosterona durante a administração de furosemida, não tem sido possível demonstrar a participação essencial destes sistemas através da utilização de bloqueadores adrenérgicos e de inibidores da enzima conversora de AI (Petersen *et al.*, 1992; e Bak *et al.*, 1993). Esta dificuldade de implicar receptores adrenérgicos e a ECA no processo compensatório pode ser devida às inúmeras ações sistêmicas ou extra-renais destes.

No presente estudo, os mecanismos compensatórios limitantes de uma persistente resposta natriurética à ação do furosemida foram semelhantes àqueles observados por Petersen e DiBona (1992), Christensen *et al.* (1986), infundindo por via intravenosa respectivamente 0.5 e 40 mg/kg/dia de diurético. Por outro lado, a atenuação da resposta natriurética promovida pela denervação renal após a administração aguda de diurético nos animais diabéticos sugere que nestas condições experimentais vários mecanismos compensatórios não neurais, estejam já ativados no sentido de diminuir o balanço negativo de sódio, possivelmente, como consequência de uma vultosa depleção hidrossalina durante o elevado fluxo urinário osmótico observado nestes animais diabéticos não tratados. Adicionalmente, a menor elevação pressórica nestes animais também poderia atenuar uma provável natriurese pressórica induzida por mecanismos hemodinâmicos intra-renais. Assim, o efeito nulo da DNx sobre o balanço de sódio

durante o tratamento crônico com furosemida pode ser devido a uma ativação compensatória e redundante de mecanismos que se tornaram superativados na ausência de uma inervação renal intacta.

Loon *et al.* (1989) examinaram a resposta natriurética à administração aguda de furosemida em pacientes, utilizando, durante um período prolongado, este diurético para o tratamento de hipertensão arterial sistêmica. Estes autores encontraram uma atenuada resposta excretora de sódio a administração aguda de furosemida, efeito este abolido pelo tratamento concomitante com hidroclortiazida. Estes resultados sugeriram a estes investigadores que o fenômeno contra-regulatório à depleção volêmica demonstrava uma grande contribuição de segmentos distais do néfron com canais de sódio sensíveis a tiazídicos. Em suporte a nossos resultados, Stanton e Kaissling (1988) demonstraram uma efetiva participação dos segmentos distais do néfron na reabsorção de sódio durante a administração crônica de furosemida. Adicionalmente, DiBona *et al.* (1998) caracterizaram em modelos experimentais com excessiva retenção volêmica, tais como insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática e síndrome nefrótica (DiBona *et al.*, 1996), um aumento da atividade simpática neural do rim mesmo após a expansão volêmica com a infusão de salina isotônica. A atividade neural em animais diabéticos não é conhecida.

Como outros órgãos o rim é amplamente innervado. Estudos eletrofisiológicos em rins de mamíferos tem identificado uma inervação simpática bem definida e duas classes de receptores neurosensoriais, os químicos (CR) e os mecanorreceptores (MR). Os CR renais respondem à isquemia renal e a alterações da composição eletrolítica da urina (Barber e Moss, 1990; e Recordati *et al.*, 1980). Por outro lado, os MR são estimulados pela pressão de perfusão arterial, venosa e ureteropélvica (Genovesi, *et al.* 1993).

Seres humanos e animais diabéticos desenvolvem anormalidades estruturais e funcionais em diversos órgãos e sistemas. A alteração da homeostase hidrossalina é evidenciada pelas variações osmóticas, elevação do volume extracelular sangüíneo, filtração glomerular e pela excreção renal de proteínas. Neuropeptídeos e outras taquicininas têm sido implicadas na

transmissão neurosensorial renal. Alterações estruturais renais incluem um aumento da massa renal que envolve o glomérulo, túbulo e vasos sangüíneos, deposição de colágeno e massiva fibrose túbulointersticial (Ziyadeh e Goldfarb, 1991). Assim, as características morfológicas e funcionais das terminações nervosas renais podem ser afetadas como resultado das alterações homeostáticas, estruturais e neuropáticas associadas ao *diabetes mellitus*. Suportando a implicação da atividade neural sobre a função renal no diabetes, Matsuoka (1993) demonstrou que a inervação renal promove alguma proteção contra a progressão da nefropatia diabética. A perda deste efeito protetor pode ser um dos mecanismos pelo qual a disfunção autonômica diabética pode agravar a progressão da doença renal. Por outro lado, observamos no presente estudo que a denervação renal efetivamente promove uma significativa atenuação da elevação pressórica em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Tem sido observado que diuréticos de alça estimulam a secreção de renina de diferentes maneiras: inibindo o transporte de cloro através da mácula densa, estimulando a síntese intra-renal de prostaglandinas e aumentando a atividade simpática renal (Lorenz *et al.*, 1991; Schricker *et al.*, 1995, e Stella e Zanchetti *et al.*, 1977, Osborn *et al.* 1981). Thames e DiBona (1979) demonstraram que a estimulação neural renal com estímulos de baixa frequência não afeta a secreção renal de renina, no entanto, potencializa a secreção deste peptídeo induzida pela administração aguda de furosemida. Por sua vez, Petersen e DiBona (1992) observaram que a administração crônica de furosemida em ratos denervados não promoveu modificações significativas na já elevada atividade de renina plasmática nestes animais, quando comparados a animais inervados. Estes achados sugerem que mecanismos não-neurais estejam predominando na manutenção dos elevados níveis de atividade do SRA durante a administração prolongada de diuréticos de alça.

Em conclusão, nós demonstramos que a denervação renal bilateral atenua a elevação da pressão arterial observada em animais diabéticos, assim como a queda na filtração glomerular e a excreção urinária de sódio após a administração aguda de furosemida. Estes resultados não se mantiveram após sete dias de

tratamento crônico dos animais com diurético de alça, sugerindo que a atividade neural do rim não seja um mecanismo essencial para a manutenção da homeostase hidrossalina durante a depleção volêmica através de um aumento induzido da reabsorção tubular renal de sódio. A atenuação da resposta natriurética em ratos denervados implica na existência de mecanismos compensatórios não-neurais redundantes que poderiam estar envolvendo alterações hemodinâmicas intra-renais e vias humorais entre as quais o sistema renina-angiotensina-aldosterona. No entanto, reciprocamente ao efeito tônico retentor de sódio, o presente trabalho demonstra que a hipertensão arterial desenvolvida durante o diabetes é significativamente atenuada pela denervação renal.

6. CONCLUSÃO

1. O presente estudo avaliou a importância de receptores AT1 da angiotensina e da atividade neural renal para o restabelecimento da homeostase hidrossalina em animais normais e diabéticos induzidos pelo tratamento com estreptozotocina. O desequilíbrio hemodinâmico foi promovido pela administração aguda ou crônica de furosemida em dose suficiente para promover uma depleção volêmica e queda na pressão arterial sistêmica.
2. Os resultados mais pertinentes obtidos demonstram que em animais normais e em ratos diabéticos o bloqueio dos receptores AT1 promoveu uma queda significativa da pressão arterial sistêmica, avaliada pela pressão caudal, acompanhada por uma também significativa diminuição da excreção urinária de sódio, principalmente por um aumento da reabsorção pós-proximal deste íon. Estes resultados sugerem a existência de mecanismos renais compensatórios que minimizam a queda pressórica, ativados independentemente do bloqueio de receptores para angiotensina.
3. A maior reabsorção pós-proximal de sódio possivelmente ocorra no segmento espesso da alça de Henle, uma vez que não ocorreu um aumento concomitante da secreção ou excreção urinária de potássio nos animais estudados.
4. A administração oral aguda de furosemida em animais-controle e animais diabéticos, promoveu um significativo aumento do fluxo urinário e da excreção renal de sódio. Este aumento na natriurese foi associado a uma concomitante rejeição dos segmentos proximais e pós-proximais à reabsorção deste íon, a despeito de uma inalterada filtração glomerular. No entanto, a resposta diurética foi atenuada nos animais-controle e nos diabéticos pelo bloqueio AT1.
5. O tratamento crônico com furosemida tanto nos animais-controle quanto nos diabéticos causou, após 7 dias, uma redução significativa da excreção urinária de sódio, fundamentalmente por um aumento da reabsorção tubular deste íon nos segmentos proximais e distais do néfron. Esta atenuação da resposta natriurética após o tratamento crônico com furosemida não foi

modificada pelo tratamento concomitante destes animais com bloqueadores AT1.

6. Por outro lado, a denervação renal bilateral causou uma significativa queda da pressão arterial em animais-controle, enquanto a significativa elevação pressórica verificada nos animais diabéticos foi totalmente abolida por este procedimento.
7. A denervação renal nos animais diabéticos também teve como consequência uma menor resposta natriurética à administração aguda de furosemida, essencialmente por uma redução da fração de excreção pós-proximal de sódio nestes animais. A denervação nestes animais também preveniu a queda da filtração glomerular evidenciada após a administração aguda de furosemida.
8. Metabolicamente, a administração de losartan atenua a elevação da glicemia induzida adicionalmente pelo furosemida.

Em conclusão, este trabalho mostra que os animais diabéticos apresentam uma elevação progressiva da pressão arterial sistêmica significativamente atenuada pelo tratamento com bloqueadores AT1 ou pela denervação renal bilateral. Apresenta também uma significativa resposta diurética e natriurética nos animais-controle e diabéticos após a administração aguda por via oral de furosemida por uma rejeição ao fluxo transtubular de sódio e água em vários segmentos do néfron. Este efeito é significativamente atenuado por mecanismos contra-reguladores após o tratamento por sete dias de com diurético de alça. Estes mecanismos, no entanto, parecem ser pelo menos em parte independentes da ação tubular da angiotensina ou da atividade neural sobre a função do néfron.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abildgaard, U.; Holstein-Rathlou, N-H. and Leyssac, P. P. Effect of renal nerve activity on tubular sodium and reabsorption in dog kidneys as determined by the lithium clearance method. *Acta Physiol. Scand.* 126: 251-257, 1986.
2. Akar, F.; Skinner, E.; Klein, J. D.; Jena, M.; Paul, R. J. and O'Neill, W. C. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporte in rat aorta. *Am. J. Physiol.* 276 (Cell Physiol 45): C1383- C1390, 1999.
3. Allen, T. J.; Cooper, M. E.; O'Brien, C.; Bach, L. A.; Jackson, B. and Jerums, G. Glomerular filtration rate in streptozocin-induced diabetic rats. Role of exchangeable sodium, vasoactive hormones, and insulin therapy. *Diabetes* 39 (10): 1182-1190, 1990.
4. Andersen A. R.; Christian J. S.; Andersen, J. K.; Kreiner, E. R e Deckert, T. Diabetic nephropaty in type 1 (insulin dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 25:496-501, 1983.
5. Andersen, S.; Tarnow, L.; Rossing, P.; Hansen, B. V. and Parving, H-P. Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type diabetic patients with diabetic nephropaty. *Kidney Int.* 57: 601-606, 2000.
6. Anderson S.; Jung, F. F. and Ingelfinger, J. R. Renal renin-angiotensin sistem in diabetes: functional, imunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am. J. Physiol.* 265 (Renal Fluid Electrolytice Physiol. 34): F477-F486, 1993.
7. Anderson, S.; Rennke, H. G.; Diego, D. L. and Brenner, B. M. Short and long term effects of antihypertensive therapy in the rat diabetic. *Kidney Int.* 36: 526-536, 1989.

8. Aperia, A.; Ibarra, F.; Svensson, L. B.; Klee, C. and Greengard, P. Calcinerin mediates alfa-adrenergic stimulation of Na⁺, K⁺, ATPase activity in the renal tubules cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89: 7394-7397, 1992.
9. Atkinson, M. A. and Maclaren, M. Mechanisms of disease: The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 24: 1428-1436; 1994.
10. Aynsley-Green, A and Alberti, K. G. Diuretics and carbohydrate metabolism: The effects of furosemide and amiloride on blood glucose, plasma insulin and cations in the rat. *Diabetologia* 9: 34-42, 1973.
11. Bak, M.; Shalmi, M.; Petersen, J. S.; Poulsen, L. B. and Christensen, S. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on renal adaptations to acute furosemide administration in conscious rats¹. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 33-40, 1993.
12. Bank, N. and Aynedjian, H. S. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hypertension. *Kidney Int.* 43: 1306-1312, 1993.
13. Bank, N. e Aynedjian, H. S. Progressive increase in luminal glucose stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 86:309-316, 1990.
14. Barber, J. D. e Moss, N. G. Reduced renal perfusion pressure causes prostaglandin-dependent excitation of the R2 chemoreceptors in rats. *Am. J. Physiol.* 259: R1243-R1249, 1990.
15. Barthelmebs, M.; Alt-Tebacher, M.; Madonna, O.; Grima, M. and Imbs, J-L. Absence of a losartan interaction with renal lithium excretion in the rat. *British Journal of Pharmacology* 116: 2166-2169, 1995.

16. Bautif, H. Inositol lipid signalling of compensatory renal growth. *Nephron* 55: 173-241, 1990.
17. Bello-Reuss, E.; Colindres, R.E.; Pastoriza-Munõs, E.; Mueller, R.A., and Gottschalk, C. W. Effects of acute unilateral renal denervation in the rat. *J. Clin. Invest.* 56: 208-217, 1975.
18. Blantz, R. C.; Peterson, O. W.; Gushwa, L. and Tucker, B. J. Effects of modest hyperglycemia on tubuloglomerular activity. *Kidney Int.* 22, Suppl. 12: S 206, 1982.
19. Boinm M. A, Teixeira, V.P.C. e Schor, N. Rim e compostos vasoativos. In: Roberto Katz (ed.): *Fisiopatologia Renal*. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2000.
20. Border, W. A and Ruoslahti, Transforming growth factor - β in disease: The dark side of tissue repair. *J.Clin Invest* 90: 1-7, 1992.
21. Bottari, S. P. *et al.* The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 206-211, 1992.
22. Brochner-Mortensen, J.; Stockel, M.; Sorensen, P. J.; Nielsen, A. H. and Ditzel, J. Proximal glomerulo-tubular balance in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 27: 189-192, 1984.
23. Brod, J. and Sirota, J. H. The renal clearance of endogenous creatinine in man. *J. Clin. Invest.* 27: 645-651, 1948.

24. Brown, L.; Wall, D.; Marchant, C. and Sernia, C. Tissue-specific change in angiotensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Journal. Endocrinology* 154: 355-362, 1997.
25. Bumpes, *et al.* Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Research. *Hypertension* 17: 720-721, 1991.
26. Bunkenburg, B.; Schnell, C.; Baum, H-P.; Cumin, F. and Wood, J.M. Prolonged angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats. Hemodynamic and biochemical consequences. *Hypertension* 18: 278-288, 1991.
27. Cassis, L. A. Downregulation of the renin-angiotensin system in streptozotocin-diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 262 (Endocrinol Metab 25): E105-E109, 1992.
28. Chatziantoniou, C. and Arendshorst, W. Prostaglandin interactions with angiotensin, norepinephrine, and thromboxane in rat renal vasculature. *Am. J. Physiol.* 262 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 31): F68-F76, 1992.
29. Chen, Z.; Vaughn, A.; Beaumony, K. and Fanestil, D. D. Effects of diuretics treatment and of dietary sodium on renal binding of ³H-metolazone. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 91-98, 1990
30. Chouinard, S. and Viau, C. Reversibility of renal tubular dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 70 (7): 977-982, 1992.
31. Christensen, S. Furosemide effect during volume expansion: evidence against lithium transport in the loop. *Kidney Int.* 37 (S28): S45-S51, 1990.

32. Christensen, S.; Steiness, E. and Christensen, H. Tubular sites of furosemide natriuresis in volume-replaced and volume-depleted conscious rats¹. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239: 211-218, 1986.
33. Christlieb, A. R. and Boston, M. D. Renin, Angiotensin, and Norepinephrine in alloxan diabetes. *Diabetes* 23: 962-970, 1974.
34. Cleland, S. J.; Petrie, J. R.; Ueda, S.; Elliot, H. L. and Connel, J. M. Insulin as a vascular hormone: implications for the pathophysiology of cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25: 175-184, 1998.
35. Cooper, M. E. Interaction of metabolism and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 44: 1957-1972, 2001.
36. DiBona, G. F. The function of the renal nerves. *Physiol. Biochem. Pharmacol.* 94: 75-181, 1982.
37. DiBona, G. F. and Sawin, L. L. Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am. J. Physiol.* 248: F15-F23, 1985.
38. DiBona, G. F.; Sawin, L. L. and Jones S. Y. Characteristic of renal sympathetic nerve activity in sodium retaining disorders. *Am. J. Physiol.* 271: R295-R302, 1996.
39. DiBona, G. F. and Koppa, U. C. Neural control of renal function. *Physiological Reviews*: 77(1) 75-196, 1997.
40. DiBona, G. F.; Jones, S. Y. and Sawin, L.L. Angiotensin receptor improves cardiac reflex control of renal sodium handling in heart failure. *Am. J. Physiol.* 274: H636-H641, 1998.

41. Dimitriadis, G.; Leighton, B.; Parry-Billings, M.; Tountas, C.; Raptis, S. and Newsholmes, E.A. Furosemide decreases the sensitivity of glucose transport to insulin in skeletal muscle *in vitro*. *European Journal of Endocrinology* 139: 118-122, 1998.
42. Dimitriadis, G.; Tegos, C.; Golfinopoulou, L.; Roboti, C. and Raptis, S. Furosemide-induced hyperglycaemia: the implication of glycolytic kinases. *Horm. Metab. Res.* 25: 557-559, 1993.
43. Dourisch, C. T.; Duggan, J. A e Banks, R. J. Drinking induced by subcutaneous injection of angiotensin II in the rat is blocked by selective AT1 receptor antagonist DuP but not by the selective AT2 receptor antagonist WL. 19. *Eur. J. Pharmacol.* 211: 113-116, 1992.
44. Ellison, D. H.; Velasques, H. e Wright, F. S. Adaptation of distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J. Clin. Invest.* 83: 113-126, 1989.
45. Ellison, D. H. The physiologic basis of diuretic synergism: its role in treating diuretic resistance. *Ann. Inter. Med.* 114: 886-894, 1991.
46. El-Seifi, S.; Freiberg, J. M.; Kinsella, J.; Cheng, L. and Sacktor, B. $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange and Na^+ -dependent transport systems in streptozotocin diabetic rat kidneys. *Am. J. Physiol.* 252 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 21): R40-R47, 1987.
47. Epstein, M. and Sowers, J. R. Diabetes mellitus and hypertension. *Hypertension* 19: 403-418, 1992.

48. Fan, L.; Mukaddam-Daher, S.; Gutkowska, J.; Nuwayhid, B. S. and Quillen, E. W. Jr. Renal perfusion pressure and renin secretion in bilaterally renal denervated sheep. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 782-787, 1994.
49. Féraillé, E. and Doucet, A. Sodium-Potassium-Adenosinetriphosphate-dependent sodium transport in the kidney: Hormonal control. *Physiological Reviews* 81 (1): 345-418, 2001.
50. Fitch, G. K. and Weiss, M. L. Activation of renal afferent pathways following furosemide treatment II. Effect of angiotensin blockade. *Brain Res.* 861:377-389, 2000.
51. Fitch, G. K.; Patel, K. P. and Weiss, M. L. Activation of renal afferent pathways following furosemide treatment I. Effects of survival time and renal denervation. *Brain Res.* 861:363-376, 2000.
52. Fregly, M. J. e Rowland, N. E. Effect of a nonpeptide angiotensin II receptor, DuP 753, on angiotensin-related water intake in rats. *Brain Res. Bull.* 27: 97-100, 1991.
53. Forsling, M. L.; Zhou, Y. and Windle, R. J. The natriuretic actions of vasopressin in the female rat: variations during the 4 days of the oestrous cycle. *Journal Endocrinology* 148: 457-464, 1996.
54. Fitzsimons, J. T. Angiotensin, Thirst, and sodium appetite. *Physiological Reviews* 78 (3): 583-686, 1998.
55. Foy, J. M. e Furman, B. L. Effect of single dose administration of diuretic on blood sugar of alloxan-diabetic mice or mice rendered hyperglycaemic by acute administration of diazoxide. *Br. J. Pharmac.* 47: 124-132, 1973.

56. Fujimara, A. and Ebihara, A. Role of angiotensin II in renal prostaglandin E₂ production after furosemide administration. *Hypertension* 11: 491-494, 1988.
57. Fujimara, A.; Sudoh, T. and Ebihara, A. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on urinary prostaglandin E₂ excretion following furosemide in rats. *Life Sciences* 55 (9): 707-711, 1994.
58. Garcia, W. E.; Gontijo, J. A. R. e Figueiredo, J. F. Clearance de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados, estudados em gaiolas metabólicas. *J. Bras. Nefrol.* 13(3): 89-94, 1991.
59. Garcia-Sainz, J. A.; Gonzalez-Espinosa, C. and Oliveres-Reyes, R. Differences between rapid and longer-term actions of angiotensin II in isolated rats hepatocytes. Effects on phosphorylase a activity and *c-fos* expression¹. *Archives of Medical Research* 26: S189-S193, 1995.
60. Gariépy, L.; Larose, P.; Bailey, B. E. and Souich, P. Effect of lignocaine on arginine-vasopressin plasma levels: baseline or induced by frusemide. *Br. J. Pharmacol.* 106: 470-475, 1992.
61. Genovesi, S.; Pieruzzi, F.; Wijnmaalen, P.; Centonza, L.; Golin, R.; Zanchetti, A. and Stella, A. Renal afferents signaling diuretic activity in the cat. *Cir. Res.* 73: 906-913, 1993.
62. Giebisch, G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am. J. Physiol.* 274 (5): F817-F833, 1998.
63. Gill, J. R and Bartter, F. C. Adrenergic nervous system in sodium metabolism II. Effects of guanethidine on the renal response to sodium deprivation in normal man. *N. Eng. J. Med.* 275: 1466-1471, 1966.

64. Griendling, *et. al.* Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 261: 5901-5906, 1986.
65. Hannedouche, T. P.; Delgado, A. G.; Gnionsahe, D. A.; Boitard, C; Lacour, B. and Grünfeld, J-P. Renal hemodynamics and segmental tubular reabsorption in early type diabetes. *Kidney Int.* 37: 1126-1133, 1990.
66. Hostetter, T. H.; Troy, J. L. and Brenner, B. M. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 19: 410-415, 1981.
67. Harrison-Bernard, L.; Navar, L. G.; Ho, M. M.; Vinson, G. P and El-Dahr, S. S. Immunohistochemical localization of Ang II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am. J. Physiol.* 273 : F170-177, 1997.
68. Iwai, N. and Inagami, T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin receptor. *FEBS Letters* 298: 257-260, 1992.
69. Jaffa, A. A.; Rust, P. F. and Mayfield, R. K. Kinin, a mediator of diabetes-induced glomerular. *Diabetes* 44: 156-160, 1995.
70. Janssen, B. J. A.; Eerdmans, H. A. and Smits, J. F. M. Mechanisms of renal vasoconstriction following furosemide in conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349: 528-537, 1994.
71. Jonhston, C. I. Angiotensin receptor antagonists: focus in losartan. *Lancet* 346: 1403-1407, 1995.
72. Jover, B.; Saladani, D.; Nafrialdi, N.; Dupont, M. and Mimran, A. Effect of losartan and enalapril on renal adaptation to sodium restriction in rat. *Am J Physiol* 267 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 36): F281-F288, 1994.

73. Kaissling, B. and Stanton, B. A Adaptation of distal tubule and collecting to increasead Na delivery. I. Ultrastructure. *Am. J. Physiol.* 255 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24): F1256-F1268, 1988.
74. Kaissling, B.; Bachmann, S. and Kriz, W. Structural adaptation of the distal convoluted tubule to prolonged furosemide treatment. *Am. J. Physiol.* 248 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 17): F374-F381, 1985.
75. Kammerl, M. C; Nüsing, R. M.; Richthammer, W.; Krämer, B. K. e Kurtz, A. Inhibition of COX-2 counteracts the effects of diuretics in rats. *Kidney Int.* 60: 1684-1691, 2001.
76. Kagami, S.; Border, W. A; Miller, D. E. e Noble, N. A Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 93:2431-2437, 1994.
77. Kakar, S.; Riel, K.; and Neil, J. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 688-692, 1992.
78. Kennefick, T. M.; Oyama, T. T.; Thompson, M. M.; Vora, J. P. e Anderson, S. Enhanced renal sensitivity to angiotensin actions in diabetes mellitus in the rat. *Am. J. Physiol.* 271 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 40): F595-F602, 1996.
79. Klein, R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 18: 258-268, 1995.
80. Kinsella, J. L and Aronson, P. S. Properties of the Na⁺/ H⁺ exchanger in renal microvillus membrana vesicles. *Am. J. Physiol.* 241: F461-469, 1980.

81. Kobayashi, S.; Clemmons, D. R.; Nogami, H.; Roy, A K. and Venkatachalam, A. Tubular hypertrophy due to work load induced by furosemide is associated with increases of IGF-1 and IGFBP-1. *Kidney Int.* 47: 818-828, 1995.
82. Koomans, H. A *et. al.* Editorial review. Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. *Kidney Int.* 36:2, 1989.
83. Konishi, H.; Kuroda, S.; Inada, Y. and Fujisawa, Y. Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor: cDNA cloning and expression. *Biochem Res. Commun.* 1992 (2): 467-474, 1994.
84. Kopp, U. C. and DiBona, G. F. The neural control of renal function. In: *The Kidney - Physiology and Pathophysiology*. DW Seldin and G Gieblich (eds), N.Y., Raven, 1992, pages:1157-1204.
85. Kopp, U. and Smith, L. A. Role of prostaglandins in renal sensory receptor activation by substance P and bradykinin. *Am. J. Physiol.* 265 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 34): R544-R551, 1993.
86. Koop, U. C.; Olson, L. A. and DiBona, G. F. Renorenal reflex: responses to mechanoreceptor and chemoreceptor stimulation in the dog and rat. *Am. J. Physiol.* 246: F67-F77, 1984.
87. Koop, U. C and Smith, L. A. Role of prostaglandins in renal sensory receptor activation by substance P and bradykinin. *Am J. Physiol.* 265: R544-R551, 1993.
88. Koop, U. C.; Smith L. A.; and DiBona, G. F. Renorenal reflexes: neural components of ipsilateral and contralateral renal responses. *Am. J. Physiol.* 249: F101-F117, 1985.

89. Körner, A.; Eklöf, A.; Celsi, G. and Aperia, A. Increased renal metabolism in diabetes mechanism and functional implications. *Diabetes* 43: 629-633, 1994.
90. Lane, P. H.; Tyler, L. D. and Schmitz, P. G. Chronic administration of furosemide augments renal weight and glomerular capillary pressure in normal rats. *Am. J. Physiol.* 275 (Renal Physiol. 44): F230-F234, 1998.
91. Loon, N. R.; Wilcox, C. S. and Unwin, R. J. Mechanism of impaired natriuretic response to furosemide during prolonged therapy. *Kidney Int.* 36: 682-689, 1989.
92. Lorenz, J. N.; Weihprecht, H.; Schnermann, J.; Skott, O and Briggs, J. P. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am. J. Physiol.* 486: F486-F493, 1991.
93. Lovenberg, W. Techniques for the measurement of blood pressure. *Hypertension* (suppl): I5-I6, 1987.
94. Machado, L. J. C.; Marubayashi, U.; Reis, A. M. and Coimbra, C. C. The hyperglycemia induced by in rats is mediated by AT1 receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 1349-1352, 1998.
95. Malnic, G.; Berliner, R. W. and Giebisch, G. Flow dependence of K^+ secretion in cortical distal tubules of the rat. *Am. J. Physiol.* 256: F932-F941, 1989.
96. Marsden, P.A.; Brenner, B.M. and Ballermann, B.J. Mechanisms of angiotensin action on vascular smooth muscle, the adrenal, and the kidney. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Eds: J. L. Laragh and B.M. Brenner, Raven Press, Ltd, New York, 1990

97. Martinez-Maldonado, M. and Hector, R. C. Cellular and molecular aspects of the renal effects of diuretic agents. *Kidney Int.* 38: 632-641, 1990.
98. Matsuoka, H. Protective role of renal nerve in the development of diabetic nephropathy. *Diabetes Res.* 23 (1): 19-29, 1993.
99. Michea, L.; Iribarra, V.; Goecke, A. and Marusic, E. T. Reduced Na-K pump but increased Na-K-2Cl cotransporter in aorta of streptozotocin-induced diabetic rat. *Am. J. Physiol.* 280: H 851-H858, Feb, 2001.
100. Miki, K.; Hayashi, Y. and Shiraki, K. Cardiac-renal reflex plays a major role in natriuresis induced by left atrial distension. *Am.J. Physiol.* 264: R369-R375, 1992.
101. Miki, K.; Hayashi, Y.; Sagawa, S. and Shiraki, K. Renal sympathetic nerve activity and natriuresis during water immersion in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 256: R299-R305, 1989.
102. Mitchell, K. D. and Navar, L. G. The renin-angiotensin-aldosterone system in volume control. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 3 (2): 393-430, 1989.
103. Navar, G. L.; Inscho, E. W.; Aajid, S. A.; Imig, J. D.; Harrison-Bernard, L.M. and Mitchell, K. D. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 76 (2): 425-536, 1996.
104. Ng, L. L.; Simmons, D. e Frighi, V. Leucocytes Na^+/H^+ antiport activity in type I diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia* 33: 371-377, 1990.

105. Ohtomo, Y.; Meister, B.; Hökfelt, T. and Aperia, A. Coexisting NPY and NE synergistically regulate renal tubular Na^+ , K^+ -ATPase activity. *Kidney Int.* 45: 1606-1613, 1994.
106. Ortola, F. V.; Ballermann, B.J.; Anderson, S.; Mendez, R.E. and Brenner, B. M. Elevated plasma atrial peptide levels in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 80: 670-674, 1987.
107. Osborn, J. L.; DiBona, G. F. and Thames, M. D. Beta-1-receptor mediation renin elicited by low- frequency renal nerve stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216 (2): 256-259, 1981.
108. Perfetti, R.; Barnett, O. S.; Mathur, R. and Egan, J. M. Novel Therapeutic Strategies for the treatment of type 2 Diabetes. *Diabetes/ Metabolism Reviews* 14: 207-225, 1998.
109. Petersen, J. S. and DiBona, G. F. Furosemide elicits immediate sympathoexcitation via a renal mechanism independent of angiotensin II. *Pharmacology & Toxicology* 77: 106-113, 1995.
110. Petersen, J. S. and DiBona, G. F. Effects of renal denervation on sodium balance and renal function during chronic furosemide administration in rats¹. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 1103-1109, 1992.
111. Petersen, J. S. and DiBona, G. F. Reflex control of renal sympathetic nerve activity during furosemide diuresis in rats. *Am J Physiol* 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 35): R537-R545, 1994.
112. Petersen, J. S.; Shalmi, M.; Abildgaard, U.; Christensen, N. J. and Christensen, S. Renal effects of α - adrenoreceptor blockade during furosemide diuresis in conscious rats. *Pharmacology & Toxicology* 70: 3-12, 1992.

113. Petersen, J. S.; Shalmi, M.; Lam, H. R. and Christensen, S. Renal response to furosemide in conscious rats: Effects of acute instrumentation and peripheral sympathectomy. *J. Pharmac. and Exp. Ther.* 258: 1-7, 1991.
114. Pollock, C.; Lawrence, J. R. and Field, M. J. Tubular sodium handling and tubuloglomerular feedback in experimental diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* F946-F952, 1991.
115. Quan, A. and Baum, M. Endogenous angiotensin II modulate rat proximal tubule transport with acute changes in extracellular volume. *Am. J. Physiol.* 275: F74-F78, 1998.
116. Ray, K.; Sahana, C. C.; Chaudhuri, D. B.; Das, D. N.; Mondal, S.; Sarkar, D.; Roy, G.; Chowdhury, M. K. and Maity, C. R. Frusemide-induced diabetes mellitus in insulin pretreated rabbits as an experimental model. *Indian J. Med. Res. (B)* 98: 37-39, 1993.
117. Rao, R. H. Pressor dose of angiotensin II increase hepatic glucose output and decrease insulin sensitivity in rats. *Journal of Endocrinology* 148: 311-138, 1996.
118. Recordati, G. M.; Moss, N. G.; Giovanesi, S. and Rogenes, P. R. Renal receptors in the rat sensitive to chemical alterations of the environment. *Circ. Res.* 46:395-405,1980.
119. Reilly, R and Ellison, D. Mammalian distal tubule: Physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiology Reviews* 80: 277-313, 2000.
120. Remuzzi, A.; Perico, N.; Amuchastegui, C. S.; Malanchini, B.; Mazerska, C. B.; Bertani, T. and Remuzzi, G. Short- and long-term effect of angiotensin II

- receptor blockade in rats with experimental diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4: 40-49, 1993.
121. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183, 1997.
 122. Sasamura, H. et al. Cloning, characterization and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 253-259, 1992.
 123. Scherzer, P.; Wald, H. and Popovtzer, M. M. Enhanced glomerular filtration an $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ with furosemide administration. *Am. J. Physiol.* 252 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 21): F910-F915, 1987.
 124. Schricker, K.; Hamann, M. and Kurtz, A. Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am. J. Physiol.* 269: F825-F830, 1995.
 125. Sealey, J. E. and Laragh, J. H. The renin-angiotensin-aldosterone for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In Brenner, B. M. e Laragh, J. H. (eds): *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. J.H. Haven Press, New York, 1990.
 126. Shalmi, M.; Jonassen, T.; Thomsen, K.; Kibble, J. D.; Bie, P. and Christensen, S. Model explaining the relation between distal nephron Li^+ reabsorption and urinary Na^+ excretion in rats. *Am. J. Physiol.* 274 (Renal Physiol. 43): F445-F452, 1998.
 127. Shimonura, H. and Spiro, R. G. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes: decreased

- levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. *Diabetes* 36: 374-381, 1987.
128. Smith, F.G.; Strack, A. M. and Wildt, S. N. Renal nerves do not modulate the renal and endocrine responses to furosemide in conscious lambs. *Can. J Physiol. Pharmacol.* 74: 614-620, 1996.
129. Smith, R. D et al. Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.* 32: 135-165, 1992.
130. Soleimani, M. and Bizal, G. L. Functional identity of a purified proximal tubule anion exchanger protein: Mediation of choride/formate and chloride/bicarbonate exchange. *Kidney Int.* 50: 1914-1921, 1996.
131. Stanton, B. A and Giebisch, H. G. Renal potassium transport. In: *Handbook of Physiology: renal physiology*. Eds: Erich E. Winddhanger, New York, Oxford University Press, 1992.
132. Stanton, B.A and Kaissling, B. Adaptation of distal tubule and collecting to increased Na delivery. II. Na⁺ and K⁺ transport. *Am. J. Physiol.* 255 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24): F1269-F1275, 1988.
133. Stella, A and Zanchetti, A . Effects of renal denervation on renin release in response to tilting and furosemide. *Am. J. Physiol.* 232 (5): H500-H507, 1977.
134. Tenstad, O. and Williamson, E. Effect of furosemide on local and zonal glomerular filtration rate in rat kidney. *Acta Physiol. Scand.* 155, 99-107, 1995.
135. Thames, M. B. and DiBona, G. F. Renal nerves modulation the secretion of renin by nonneural mechanisms. *Cir. Res.* 44 (5): 645-52, 1979.

136. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA_{1c}) to the risk of development and progression of nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int.* 47: 1703-1720, 1995.
137. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: Effect of intensive diabetes therapy of development and progression of neuropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Ann. Intern. Med.* 122: 561-568, 1995.
138. Thomsen, K. and Shirley, D. G. The validity of lithium clearance as an index of sodium and water delivery from the proximal tubules. *Nephron* 77: 125-138, 1997.
139. Tisch, R. and McDevitt, H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-297, 1996.
140. Tucker, B. J. and Blantz, R. C. Effect of furosemide administration on glomerular and tubular dynamics in rat. *Kidney Int.* 26: 112-121, 1984.
141. Tucker, B. J.; Collins, R. C.; Ziegler, M. G. and Blantz, R. C. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int.* 39: 1176-1183, 1991.
142. Tucker, B. J.; Rasch, R. and Blantz, C. R. Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in preproteinuric and proteinuric diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 92: 686-694, 1993.
143. Turull, A.; Piera, C. and Queralt, J. Acute effects of the anti-inflammatory cyclooxygenase-2 selective inhibitor, flosulide, on renal plasma flow and glomerular filtration rate in rats. *Inflammation* 25 (2): 119-128, 2001.

144. Vallon, V.; Richeter, K.; Blantz, R. C.; Thomson, S. and Osswald, H. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2569-2576, 1999.
145. Viau, C., Bernard, A. and Lauwerys, R. Determination of $\beta 2$ - microglobulin in urine and in serum. II. Application of its urinary measurement to selected models. *J. Appl. Toxicol.* 6: 191-195, 1986b.
146. Viberte, G. C. and Wiseman, M.J. The natural history of proteinuria in insulin dependent diabetes mellitus . *Diabetic Nefropaty* 2: 22-25, 1983.
147. Wald, H.; Scherzer, P.; Rasch, R. and Popovtzer, M. Renal tubular $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in diabetes mellitus: relationship to metabolic abnormality. *Am. J. Physiol.* 265 (Endocrinol. Metab. 28): E96-E101, 1993.
148. Wang, T. and Giebisch, G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early end distal tubule in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 271 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 40): F143-F149, 1996.
149. Wautier, J. L. and Guillausseau, P. J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab.*: 27: 535-542, 2001.
150. Whitton, P. D.; Rodrigues, L. M. and Hems, D. A. Stimulation by vasopressin, angiotensin and oxytocin of gluconeogenesis in hepatocyte suspensions. *Biochemical Journal* 176: 12761-12768, 1978.
151. Wiemer, G.; Fink, E.; Linz, W.; Hropot, M.; Schölkens, B. A and Wohlfart, P. Furosemide enhances the release of endothelial kinins, nitric oxide and prostacyclin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 1611-1615.

152. Wilcox, C. S.; Aminoff, M. J. and Slater, J. D. H. Sodium homeostasis in patients with autonomic failure. *Clin. Sci.* 53: 321-328, 1977.
153. Wiseman, M.; Mangili, R.; Alberetto, M.; Keen, H. and Viberti, G. Glomerular response to glycemic changes in insulin-dependent diabetics. *Kidney Inter* 31: 1012-1018, 1987.
154. Woods, L. L.; Mizelle, H. L., and Hall, J. E. Control of renal hemodynamics in hyperglycemia: possible role tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiol.* 252 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 21): F65-F73, 1987.
155. Wong, P. C.; Price, W. A.; Chiu, A. T.; Duncia, J. V.; Carini, D. J.; Wexler, R. R.; Johnson, A. L. and Timmermans, P. B. M. W. M. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII.¹ Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol and Exp Ther.* 252:719-725, 1990.
156. Wong, P. C.; Price, W. A.; Chiu, A. T.; Duncia, J. V.; Carini, J.; Wexler, R. R.; Johnson, A. L. and Timmermans, P. B. M. W. M. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX.¹ Antihypertensive activity in rat of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol and Exp Ther* 252: 726-732, 1990.
157. Yuan, B. H.; Robinette, J. B. and Conger, J. D. Effects of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am. J. Physiol.* 258: F741-F750, 1990.
158. Yoshida, M.; Yoshida, E. and Satoh, S. Effect of nerve denervation on tissue catecholamine content in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 22: 512-517, 1995.

159. Zhuo, J.; Allen, A. M.; Alcorn, D.; Aldred, G. P.; MacGregor, D. P. and Mendelsohn, F. A. O. The distribution of angiotensin II receptors. In: Brenner, B. M. and Laragh, J. H. (eds): *Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Raven Press Ltd. N.Y., 1995.
160. Zatz, R. Distúrbios da filtração glomerular. In: Roberto Zatz (ed): *Fisiopatologia Renal*. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2000.
161. Zatz, R. Proteinúria. In: Roberto Zatz (eds): *Fisiopatologia Renal*. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2000.
162. Ziyadeh, F. N. and Goldfarb, S. The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 39: 464-475, 1991.